

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 625**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24 (2006.01)

A61P 5/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/EP2016/058358**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166288**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16719315 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3283097**

54 Título: **FSH para el tratamiento de la infertilidad**

30 Prioridad:

17.04.2015 EP 15164043

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

29.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ARCE SAEZ, JOAN CARLOS;
HELMGAARD, LISBETH y
KLEIN, BJARKE MIRNER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 784 625 T3

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

DESCRIPCIÓN

FSH para el tratamiento de la infertilidad

5

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

10

Las técnicas de la tecnología de reproducción asistida (TRA) tales como la fertilización in vitro (FIV) son muy conocidas. Estas técnicas de TRA requieren por lo general un paso de estimulación ovárica controlada (EOC), en la que una cohorte de folículos se estimula hasta conseguir la madurez completa. Los regímenes estándar de EOC incluyen la administración de gonadotropinas tales como la hormona estimuladora del folículo (FSH, por sus siglas en inglés) sola o combinada con la actividad de la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) para estimular el desarrollo folicular, normalmente con la administración de un análogo de GnRH antes de y/o durante la estimulación para evitar la formación de LH premadura. Las composiciones farmacéuticas utilizadas por lo general para la EOC incluyen la hormona estimuladora del folículo recombinante (rFSH), FSH urinaria, preparados de LH + FSH recombinante, menotropina urinaria [gonadotropina menopáusica humana (hMG, por sus siglas en inglés)] y gonadotropina menopáusica humana altamente purificada (HP-hMG, por sus siglas en inglés). La FIV se puede asociar con el riesgo de desarrollar el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), que puede resultar letal en casos graves.

15

20

Como se ha indicado anteriormente, los protocolos estándar de EOC implican por lo general la administración de FSH. La dosis de FSH depende por lo general de una serie de factores, que incluyen la edad, cualquier respuesta previa a la estimulación con FSH, el nivel basal de FSH, el recuento del folículo de Graaf y más recientemente la hormona antimulleriana (AMH, por sus siglas en inglés). El médico esperará que se produzca un desarrollo multifolicular ovárico como respuesta a una dosis dada, junto con un aumento del 17-β-estradiol en circulación.

25

Si la respuesta (desarrollo multifolicular ovárico, aumento del 17-β-estradiol en circulación) a una dosis dada es adecuada o como era de esperar, esto indica una función ovárica normal, a la cual también se hace referencia como reserva ovárica normal. Los pacientes que no responden bien a la estimulación con FSH producen pocos folículos y, como consecuencia, sus niveles de 17-β-estradiol durante la estimulación aumentan lentamente y alcanzan unos niveles comparativamente bajos. Se hace referencia a estos pacientes como «respondedores bajos» y se puede decir que tienen una reserva ovárica reducida. Se cree que hay varios factores implicados en una respuesta baja, que incluyen una edad cada vez más elevada, adhesiones pélvicas, enfermedad ovárica y factores inmunológicos.

30

35

La capacidad para predecir el potencial de respuesta de las mujeres a la estimulación ovárica controlada (EOC) podría permitir el desarrollo de protocolos de EOC individualizados. Esto podría, por ejemplo, reducir el riesgo de SHO en mujeres que se prevé que tengan una respuesta excesiva a la estimulación, mejorar los resultados de los embarazos en mujeres clasificadas como respondedores bajos y/o conducir a una reducción de la dosis de (y la exposición a) FSH y, por consiguiente, una reducción del coste de la terapia (y un incremento de la seguridad de la terapia) en pacientes específicos.

40

En la actualidad se ha establecido que la concentración en suero de la hormona antimulleriana (AMH) es un marcador fiable de la reserva ovárica. Una reducción de los niveles de AMH se correlaciona con una reducción de la respuesta ovárica a las gonadotropinas durante la EOC. Además, unos niveles elevados de AMH suponen una buena predicción de una respuesta ovárica excesiva y un indicador de riesgo de SHO.

45

50

En un estudio preliminar de mujeres de menos de 35 años de edad sometidas a TRA, se utilizó el algoritmo de dosis de CONSORT (que incorpora FSH basal, BMI (siglas en inglés referentes al índice de masa corporal), edad y AFC (siglas en inglés referentes al recuento de folículo de Graaf) para predecir la dosis inicial de FSH óptima para la EOC en mujeres que corren el riesgo de desarrollar SHO (Olivennes *et al.*, 2009). El hecho de individualizar la dosis condujo a un rendimiento adecuado de ovocitos y una buena tasa de embarazo. A pesar de ello, se observaron unas tasas elevadas de cancelaciones en el grupo de dosis baja (75 UI de FSH) debido a una respuesta inadecuada y se manifestó el SHO en una proporción significativa de los pacientes.

55

Como se ha indicado anteriormente, los protocolos estándar de EOC pueden incluir la administración de FSH. La FSH es secretada de forma natural por la glándula pituitaria anterior y actúa favoreciendo el desarrollo folicular y la ovulación. La FSH comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos, que también es común en las otras hormonas glicoproteicas LH y CG, y una subunidad beta de 111 aminoácidos única de FSH que confiere la especificidad biológica de la hormona (Pierce y Parsons, 1981). Cada subunidad se modifica de manera posterior a la traducción mediante la adición de residuos complejos de tipo carbohidrato. Ambas subunidades contienen 2 sitios para la unión de glicano enlazado a N, la subunidad alfa en los aminoácidos 52 y 78 y la subunidad beta en los residuos aminoacídicos 7 y 24 (Rathnam y Saxena, 1975, Saxena y Rathnam, 1976). Por lo tanto, la FSH se glicosila en aproximadamente un 30% en masa (Dias y Van Roey, 2001. Fox *et al.* 2001).

60

65

Durante muchos años, en el tratamiento de la infertilidad se ha utilizado FSH purificada a partir de orina humana posmenopáusica, tanto para propiciar la ovulación en la reproducción natural como para proporcionar ovocitos para tecnologías de reproducción asistida. Los productos de FSH recombinante (rFSH) aprobados en la actualidad para la

estimulación ovárica, tales como la folitropina alfa (GONAL-F, Merck Serono / EMD Serono) y folitropina beta (PUREGON / FOLLISTIM, MSD / Schering-Plough), derivan de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés). En la actualidad, no existen productos de rFSH procedentes de una línea celular humana disponibles en el mercado.

5 Existe una heterogeneidad considerable asociada con los preparados de FSH que se relaciona con diferencias en las cantidades de varias isoformas presentes. Las isoformas individuales de FSH exhiben unas secuencias de aminoácidos idénticas pero difieren en el grado en que están modificadas de forma posterior a la traducción; las isoformas particulares se caracterizan por la heterogeneidad de las estructuras ramificadas de tipo carbohidrato y las diferentes cantidades de incorporación de ácido siálico (un azúcar terminal); al parecer ambos parámetros influyen sobre la bioactividad de la isoforma específica.

15 La glicosilación de FSH natural es muy compleja. Los glicanos en la FSH pituitaria de origen natural pueden contener una amplia gama de estructuras que incluyen combinaciones de glicanos mono-, bi-, tri- y tetraantenarios (Pierce y Parsons, 1981. Ryan *et al.*, 1987. Baenziger y Green, 1988). Los glicanos pueden contener modificaciones adicionales: fucosilación del núcleo, glucosamina entrelazada, cadenas extendidas con acetil lactosamina, sialilación parcial o completa, sialilación con enlaces $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, y galactosamina sulfatada sustituida por galactosa (Dalpathado *et al.*, 2006). Además, existen diferencias entre las distribuciones de las estructuras de glicano en los sitios individuales de glicosilación. Se ha observado un nivel comparable de complejidad del glicano en FSH derivada del suero de individuos y de la orina de mujeres posmenopáusicas (Wide *et al.*, 2007).

25 La glicosilación de productos de FSH recombinante refleja la gama de glicosil-transferasas presente en la línea de células hospedadoras. Los productos de rFSH que se pueden adquirir en el mercado derivan de células de ovario de hámster chino modificadas genéticamente (células CHO). La gama de modificaciones del glicano en rFSH derivada de células CHO está más limitada que la que se encuentra en los productos naturales. Algunos ejemplos de la menor heterogeneidad del glicano que se encuentra en rFSH derivada de células CHO incluyen una carencia de glucosamina entrelazada y un menor contenido de fucosilación del núcleo y extensiones de acetil lactosamina (Hard *et al.*, 1990). Además, las células CHO son solo capaces de añadir ácido siálico utilizando el enlace $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990); la rFSH derivada de células CHO incluye únicamente ácido siálico con enlace $\alpha 2,3$ y no incluye ácido siálico con enlace $\alpha 2,6$.

35 Por lo tanto, la FSH derivada de células CHO es diferente de la FSH producida de forma natural (por ejemplo, FSH urinaria / de suero / pituitaria humana), la cual contiene glicanos con una mezcla de ácido siálico con enlace $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, siendo el primero el predominante. Por lo tanto, las proteínas recombinantes expresadas utilizando el sistema CHO diferirán de sus homólogos naturales en su tipo de enlaces terminales del ácido siálico. Esto es una consideración importante en la producción de productos biológicos para uso farmacéutico ya que los restos de tipo carbohidrato pueden contribuir a las propiedades farmacológicas de la molécula.

40 Los solicitantes de la presente han desarrollado una FSH recombinante derivada de seres humanos que es el objeto de la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/GB2009/000978, publicada como WO2009/127826A. La FSH recombinante con una mezcla de ácido siálico con enlace tanto $\alpha 2,3$ como $\alpha 2,6$ se obtuvo modificando genéticamente una línea celular humana para que expresara tanto rFSH como $\alpha 2,3$ sialiltransferasa. El producto expresado es muy ácido y contiene una mezcla de ácidos siálicos con enlaces tanto $\alpha 2,3$ como $\alpha 2,6$; estando proporcionado el último por la actividad endógena de la sialiltransferasa. Se ha descubierto que el tipo de enlace del ácido siálico, $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$, puede ejercer una influencia dramática sobre la eliminación biológica de FSH. La FSH recombinante con una mezcla de ácido siálico con enlace tanto $\alpha 2,3$ como $\alpha 2,6$ presenta dos ventajas respecto a la rFSH expresada en células CHO convencionales: en primer lugar, el material está más altamente sialilado debido a las actividades combinadas de las dos sialiltransferasas y en segundo lugar el material se parece más a la FSH natural. Es probable que esto sea más adecuado desde un punto de vista biológico en comparación con los productos recombinantes derivados de células CHO que producen solamente ácido siálico con enlace $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990) y que tienen un menor contenido de ácido siálico (Ulloa-Aguirre *et al.* 1995., Andersen *et al.* 2004). El documento WO 2013/020996 describe la dosificación de la FSH recombinante derivada de seres humanos de los solicitantes.

55 Recientemente, se ha sugerido que el receptor de la hormona estimuladora del folículo o receptor de FSH (FSHR, por sus siglas en inglés) puede estar relacionado con o involucrado en la disminución de la reserva ovárica. El receptor de FSH es un receptor de transmembrana que interacciona con FSH. El receptor de FSH es un receptor de transmembrana 7 acoplado a la proteína G enlazado a la adenilato-ciclasa, con un dominio de unión al ligando N-terminal grande y una cola citoplasmática C-terminal rica en residuos de serina y treonina como posibles sitios de fosforilación. Su activación es necesaria para el funcionamiento hormonal de la FSH. Se ha postulado que mutaciones en el receptor de FSH pueden conducir a una disminución de la reserva ovárica. Así como las mutaciones, también se han encontrado variantes del receptor de FSH (polimorfismos del receptor de FSH). Dos de estos polimorfismos se localizan en la posición 307 (Ala/Thr) y la posición 680 (Asn/Ser) en el exón 10 del receptor de FSH (Figura 4). Estos son Ala o Thr variantes en la posición 307, y Asn o Ser en la posición 680. Estos polimorfismos han llevado a tres genotipos diferentes del receptor de FSH respecto a la posición 680: Asn/Asn, Asn/Ser y Ser/Ser [remítase a Simoni *et al.*, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol 84, N.º 2, 751-755 (1999), Falconer *et al.*, *Acta Obstet*

Gynecol Scand 2005; 84: 806-811 (2005) y Loutradis *et al.*, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 23, N.º 4, (abril de 2006), páginas 177-184].

Los solicitantes de la presente han descubierto que los pacientes que se ha identificado que tienen unos niveles bajos de AMH [nivel de AMH < 15 pmol/L, que por lo general se asociarían con una respuesta baja], a la vez que tienen Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH, presentan una duración más prolongada del tratamiento con FSH, en comparación con pacientes con unos niveles bajos de AMH y Asn/Asn variante o Asn/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH. Una dosis de FSH inicial más elevada para los pacientes que tienen unos niveles bajos de AMH [nivel de AMH < 15 pmol/L, (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L, por ejemplo, de 5.0 pmol/L a 14.9 pmol/L)], a la vez que tienen Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH, podría ser, por lo tanto, una alternativa para evitar la duración más prolongada del tratamiento con FSH. Esto permite adaptar la dosis de FSH en pacientes específicos que se ha identificado que tienen un nivel específico de AMH, así como también un polimorfismo específico en el FSHR.

La administración de una dosis inicial más elevada de FSH a pacientes que tienen unos niveles bajos de AMH [nivel de AMH < 15 pmol/L, (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L, por ejemplo, de 5.0 pmol/L a 14.9 pmol/L)], a la vez que tienen Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH, presenta ventajas ya que puede proporcionar una mayor probabilidad de éxito (en cuanto a embarazos y/o nacimientos con vida) y una mejor predictibilidad del éxito. El éxito es más probable si el paciente presenta una respuesta adecuada (desarrollo multifolicular ovárico esperado, aumento del 17- β -estradiol en circulación) que se produce dentro de una ventana de tratamiento ideal. El éxito se ve mejorado adicionalmente si la respuesta se encuentra en el centro de esta ventana de tratamiento, es decir, no demasiado pronto en la ventana ni demasiado tarde. La reducción de la duración del tratamiento en pacientes que tienen unos niveles bajos de AMH y Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH (incrementando la dosis por encima de 12 μ g) podría trasladar la respuesta hacia el centro de la ventana de tratamiento, con una probabilidad de éxito mejorada.

De acuerdo con la presente invención, en un primer aspecto se proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) para su uso en el tratamiento de la infertilidad, comprendiendo la composición de > 12 a 24 μ g de hormona estimuladora del folículo (FSH), donde la composición es para la administración (por ejemplo, a diario) a un paciente que se identifica como (por ejemplo, se selecciona como) que tiene Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH antes del tratamiento y se identifica como (por ejemplo, se selecciona como) que tiene un nivel de AMH en suero < 15 pmol/L (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L) antes del tratamiento. La composición puede comprender > 12 μ g de FSH, por ejemplo, de 12.3 a 24 μ g de FSH, por ejemplo, de 12.33 a 24 μ g de FSH, por ejemplo, de 12.67 a 24 μ g de FSH, por ejemplo, de 13 a 24 μ g de FSH, por ejemplo, de 13 a 16 μ g de FSH, por ejemplo, de 13 a 15 μ g de FSH.

La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede comprender una dosis diaria de, o una dosis diaria equivalente a, las cantidades de rFSH derivada de seres humanos que se han definido anteriormente, en la presente, y en las reivindicaciones. La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede ser para la administración (a diario) de FSH empezando el día uno de tratamiento y continuando durante de seis a dieciséis días, por ejemplo, de siete a dieciséis días, por ejemplo, de 8 a 16 días, por ejemplo, de 8 a 13 días. El tratamiento de la infertilidad puede comprender un paso de identificación (por ejemplo, determinación, por ejemplo, medición) de la variante en la posición 680 del receptor de FSH del paciente; y un paso de administración de la dosis a un paciente (que se identifica como) que tiene Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH. El tratamiento de la infertilidad puede comprender un paso de identificación (por ejemplo, determinación, por ejemplo, medición) del nivel de AMH en suero del paciente y la administración de la dosis a un paciente (que se identifica como) que tiene un nivel de AMH en suero < 15 pmol/L (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L).

La FSH puede ser FSH recombinante. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación α 2,3 y α 2,6. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación α 2,3 y α 2,6, donde de un 1 a un 99% de la sialilación total es sialilación α 2,6 y de un 99% a un 1% de la sialilación total es sialilación α 2,3. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación α 2,3 y α 2,6, donde de un 1 a un 50% de la sialilación total es sialilación α 2,6 y de un 50% a un 99% de la sialilación total es sialilación α 2,3. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación α 2,3 y α 2,6, donde de un 5 a un 40% de la sialilación total es sialilación α 2,6 y de un 60% a un 95% de la sialilación total es sialilación α 2,3. Preferentemente, la FSH es FSH recombinante derivada de una línea celular humana.

La FSH puede ser FSH recombinante. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación α 2,3 y α 2,6. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación α 2,3 y α 2,6, donde de un 1 a un 99% de la sialilación total es sialilación α 2,6 y de un 99% a un 1% de la sialilación total es sialilación α 2,3. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación α 2,3 y α 2,6, donde de un 1 a un 50% de la sialilación total es sialilación α 2,6 y de un 50% a un 99% de la sialilación total es sialilación α 2,3. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación α 2,3 y α 2,6, donde de un 5 a un 40% de la sialilación total es sialilación α 2,6 y de un 60% a un 95% de la sialilación total es sialilación α 2,3. Preferentemente, la FSH es FSH recombinante derivada de una línea celular humana.

La dosis proporciona una respuesta eficaz a la vez que minimiza el riesgo de SHO.

Las dosis anteriores pueden ser para el tratamiento de la infertilidad en el primer protocolo de estimulación del paciente (sujeto). Se apreciará que para ciclos de estimulación posteriores, las dosis se pueden ajustar de acuerdo con la respuesta ovárica real en el primer ciclo.

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

Los solicitantes han diseñado protocolos de EOC «individualizados» en los que se utilizan dosis específicas de FSH recombinante para tratar a pacientes basándose en sus niveles específicos de AMH y el polimorfismo de un solo nucleótido de FSHR, con los que se incrementa la probabilidad de obtener una respuesta adecuada a la estimulación (por ejemplo, en pacientes que presentan un potencial de respuesta bajo) y/o e reduce el riesgo de SHO u otros efectos secundarios.

15 El nivel en suero de AMH se puede determinar (por ejemplo, medir) mediante cualquier método conocido en la técnica. A modo de ejemplo, el nivel de AMH en suero se mide utilizando el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas Gen-II para AMH, un kit (Beckman Coulter, Inc., Webster, Texas). Este ensayo puede detectar concentraciones de AMH superiores a 0.57 pmol/L con un límite de cuantificación mínimo de 1.1 pmol/L. Se pueden utilizar otros ensayos. En la presente, los valores de AMH en suero se indican por lo general en pmol/L. Estos se pueden convertir en ng/mL utilizando la ecuación de conversión 1 ng/ml de AMH = 7.1 pmol/L de AMH.

20 Por lo tanto, la composición puede ser para la administración (por ejemplo, a diario) a un paciente que se identifica como (por ejemplo, se selecciona como) que tiene un nivel de AMH en suero < 15 pmol/L (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L) cuando se mide utilizando un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas Gen-II de Beckmann-Coulter o un nivel de AMH comparable medido con un método diferente.

25 En la presente, los términos «paciente» y «sujeto» se utilizan indistintamente.

La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) comprende preferentemente una dosis diaria de, o una dosis diaria equivalente a, las cantidades de rFSH derivada de seres humanos que se han definido anteriormente, en la presente, y en las reivindicaciones. La dosis (diaria) puede ser una dosis inicial (es decir, se puede reducir, incrementar o mantener durante el tratamiento).

35 El paciente que se identifica como que tiene Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH se puede identificar utilizando medios muy conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la identificación de la variante alélica en la posición 680 del receptor de FSH tras la extracción del ADN genómico mediante métodos conocidos en la técnica [por ejemplo, utilizando un kit para la extracción de ADN genómico a partir de sangre y la secuenciación posterior del ADN, tal como se describe, por ejemplo, en Gromoll *et al.*, *Methods*, 21, 83-97 (2000), Simoni *et al.*, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol 84, N.º 2, 751-755 (1999), Falconer *et al.*, *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005: 84: 806-811 (2005), y las referencias citadas en estos, o la extracción de ADN seguida de polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP, por sus siglas en inglés, que se sigue mediante electroforesis en gel, etc.), o mediante una PCR y un método de RFLP tal como el que se expone en Loutradis *et al.*, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 23, N.º 4, abril de 2006]. Por lo tanto, la composición puede ser para la administración (por ejemplo, a diario) a un paciente que se identifica como (por ejemplo, se selecciona como) que tiene Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH cuando se mide mediante la extracción del ADN genómico (por ejemplo, a partir de sangre) y el análisis posterior mediante métodos de PCR y RFLP tal como se expone en Loutradis *et al.*, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 23, N.º 4, abril de 2006, o un método comparable.

50 La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede ser para la administración (a diario) de FSH empezando el día uno de tratamiento y continuando durante de seis a dieciséis días, por ejemplo, de siete a dieciséis días, por ejemplo, de 8 a 16 días, por ejemplo, de 8 a 13 días. La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede ser para la administración de 12 a 16, por ejemplo, de 13 a 15, por ejemplo, 14 días después de la administración de (por ejemplo, después del inicio de la administración de, por ejemplo, después del inicio de la administración diaria de) un agonista de GnRH (por ejemplo, Synarel, Lupron, Decapeptyl). La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede ser para la administración con un agonista de GnRH. La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede ser para la administración antes de la administración de un antagonista de GnRH (por ejemplo, ganirelix, cetorelix), por ejemplo, para la administración cinco o seis días antes de la administración de un antagonista de GnRH. La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede ser para la administración con un antagonista de GnRH. La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede ser para la administración con un antagonista de GnRH (por ejemplo, ganirelix, cetorelix), que se administra (por ejemplo, a diario) a partir del día seis del tratamiento. Preferentemente, la composición (por ejemplo, composición farmacéutica) es para la administración antes de la administración de una dosis (ovulatoria) elevada de hCG (por ejemplo, de 4000 a 11 000 UI de hCG, por ejemplo, 5000 UI de hCG, 10 000 UI de hCG, etc.; o de 150 a 350 microgramos de hCG recombinante, por ejemplo, 250 microgramos de hCG recombinante) para inducir la maduración folicular final.

65 Se apreciará que la composición puede ser para dosificarse con frecuencias más elevadas (o más bajas) que a diario, en cuyo caso las dosis relevantes serán equivalentes a las dosis (diarias) especificadas en la presente.

En la presente, la expresión «tratamiento de la infertilidad» incluye el tratamiento de la infertilidad mediante estimulación ovárica controlada (EOC) o métodos que incluyen un paso o etapa de estimulación ovárica controlada (EOC), por ejemplo, inseminación intrauterina (IIU), fertilización *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE). La expresión «tratamiento de la infertilidad» incluye el tratamiento de la infertilidad mediante inducción de la ovulación (IO) o mediante métodos que incluyen un paso o etapa de inducción de la ovulación (IO). La expresión «tratamiento de la infertilidad» incluye el tratamiento de la infertilidad en un sujeto que padece una infertilidad inexplicable o tubular, que incluye el tratamiento de la infertilidad en un sujeto que padece endometriosis, por ejemplo, endometriosis de estadio I o estadio II, y/o en un sujeto que padece infertilidad anovulatoria, por ejemplo, infertilidad anovulatoria de tipo II según la OMS, y/o en un sujeto con una pareja con infertilidad de factor masculino. La composición puede ser para (su uso en) el tratamiento de la infertilidad (y/o para la estimulación ovárica controlada) en un sujeto que padece endometriosis, por ejemplo, en un sujeto que padece endometriosis de estadio I o estadio II, según define el sistema de clasificación de la la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, por sus siglas en inglés) para los diferentes estadios de la endometriosis (siendo el estadio IV el más grave y el estadio I el menos grave) [Sociedad Americana de Medicina Reproductiva. *Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril* 1997; 67,817 821.].

La composición puede ser para (su uso en) el tratamiento de la infertilidad (y/o para la estimulación ovárica controlada) en un sujeto que presenta un nivel de FSH en suero normal de 1 a 16 UI/L, por ejemplo, de 1 a 12 UI/L, en la fase folicular inicial.

La composición puede ser para (su uso en) el tratamiento de la infertilidad (y/o para la estimulación ovárica controlada) en un sujeto que se identifica como que tiene una edad de 18 a 42 años, por ejemplo, de 25 a 37 años. El producto puede ser para (su uso en) el tratamiento de la infertilidad (y/o para la estimulación ovárica controlada) en un sujeto que se identifica como que tiene un BMI > 15 y un BMI < 38 kg/m², por ejemplo, un sujeto que se identifica como que tiene un BMI >18 y un BMI < 25 kg/m², por ejemplo, un sujeto que tiene un BMI > 20 y un BMI < 25 kg/m².

La rFSH puede tener un contenido de ácido siálico [expresado como una relación de moles de ácido siálico respecto a moles de proteína] de 6 mol/mol o superior, por ejemplo, entre 6 mol/mol y 15 mol/mol, por ejemplo, entre 8 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo, entre 9 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo, entre 10 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo, entre 11 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo, entre 12 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo, entre 12 mol/mol y 13 mol/mol. La rFSH se puede producir o expresar en una línea celular humana.

La FSH (rFSH) para su uso de acuerdo con la invención puede tener de un 1% a un 99% de la sialilación total que sea una sialilación α 2,3. La rFSH puede tener un 10% o más de la sialilación total que sea una sialilación α 2,3. Por ejemplo, un 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% o más de la sialilación total que sea una sialilación α 2,3. La rFSH puede incluir preferentemente una sialilación α 2,3 en una cantidad que sea de un 50 a un 95% de la sialilación total, por ejemplo, de un 50 a un 70% de la sialilación total, por ejemplo, de un 60 a un 69% de la sialilación total, por ejemplo, de un 63 a un 67%, por ejemplo, alrededor de un 65% de la sialilación total. La FSH (rFSH) para su uso de acuerdo con la invención puede tener de un 1% a un 99% de la sialilación total que sea una sialilación α 2,6. La rFSH (o el preparado de rFSH) de la invención puede tener un 5% o más, por ejemplo, de un 5% a un 99%, por ejemplo, de un 5% a un 50%, de la sialilación total que sea una sialilación α 2,6. La rFSH puede tener un 50% o menos de la sialilación total que sea una sialilación α 2,6. La rFSH puede incluir preferentemente una sialilación α 2,6 en una cantidad que sea de un 5 a un 50% de la sialilación total, por ejemplo, de un 10 a un 50% de la sialilación total, por ejemplo, de un 31 a un 38%, por ejemplo, alrededor de un 35% de la sialilación total. La sialilación se refiere a la cantidad de residuos siálicos presentes en las estructuras de tipo carbohidrato de la FSH. La sialilación α 2,3 se refiere a la sialilación en la posición 2,3 (como se conoce bien en la técnica) y la sialilación α 2,6 en la posición 2,6 (que también se conoce bien en la técnica). Por lo tanto, la expresión «un % de la sialilación total puede ser una sialilación α 2,3» se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,3. La expresión «un % de la sialilación total que sea una sialilación α 2,6» se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,6.

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

La rFSH se puede producir o expresar en una línea celular humana, por ejemplo, una línea celular Per.C6, una línea celular HT1080, etc. Esto puede simplificar el método de producción (y hacer que este sea más eficaz) porque la manipulación y el control, por ejemplo, del medio de crecimiento celular para mantener la sialilación pueden ser menos críticos que con los procesos conocidos. El método también puede ser más eficaz porque se produce una pequeña cantidad de rFSH básica en comparación con la producción de productos de rFSH conocidos; se produce una rFSH más ácida y la separación/eliminación de la FSH básica es menos problemática. La rFSH se puede producir o expresar en una línea celular PER.C6®, una línea celular derivada de PER.C6® o una línea celular PER.C6® modificada. La rFSH que se produce o expresa en una línea celular humana (por ejemplo, una línea celular PER.C6®, línea celular HT1080, etc.) incluirá algunos ácidos siálicos con enlace α 2,6 (sialilación α 2,6) proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena [de la línea celular] e incluirá algunos ácidos siálicos con enlace α 2,3 (sialilación α 2,3)

proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena. La línea celular se puede modificar utilizando una α 2,3-sialiltransferasa. La línea celular se puede modificar utilizando una α 2,6-sialiltransferasa. Como alternativa o de forma adicional, la rFSH puede incluir ácidos siálicos con enlace α 2,6 (sialilación α 2,6) proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena [de la línea celular]. En la presente, la expresión «FSH recombinante derivada de seres humanos» se refiere a FSH recombinante que se produce o expresa en una línea celular humana (por ejemplo FSH recombinante obtenida modificando genéticamente una línea celular humana).

La rFSH se puede producir utilizando α 2,3- y/o α 2,6-sialiltransferasa. En un ejemplo, la rFSH se produce utilizando α 2,3-sialiltransferasa. La rFSH puede incluir ácidos siálicos con enlace α 2,6 (sialilación α 2,6) proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena.

La composición puede ser una composición farmacéutica. La composición farmacéutica es para el tratamiento de la infertilidad. El tratamiento de la infertilidad puede comprender tecnologías de reproducción asistida (TRA), inducción de la ovulación o inseminación intrauterina (IIU). La composición farmacéutica se puede utilizar, por ejemplo, en indicaciones médicas en las que se utilizan preparados de FSH.

El producto o composición se puede formular en composiciones muy conocidas mediante cualquier vía de administración farmacológica, por ejemplo, oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parches), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrasusternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, pomadas o gotas) o como un spray bucal o nasal. Una composición típica comprende un portador farmacéuticamente aceptable, tal como una solución acuosa, excipientes atóxicos, que incluyen sales y conservantes, tampones y similares, según se describe en *Remington's Pharmaceutical Sciences* decimoquinta edición (Matt Publishing Company, 1975), en las páginas 1405-1412 y 1461-87, y en el formulario nacional XIV decimocuarta edición (Asociación Farmacéutica Americana, 1975), entre otros.

Los ejemplos de vehículos, disolventes, diluyentes o portadores farmacéuticos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de esta, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Las composiciones de la presente invención también pueden contener aditivos tales como, sin carácter limitante, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, surfactantes y agentes dispersantes. Se pueden incluir agentes antibacterianos y antifúngicos para evitar el crecimiento de microbios e incluyen, por ejemplo, *m*-cresol, alcohol bencílico, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Si se incluye un conservante, se prefiere alcohol bencílico, fenol y/o *m*-cresol; sin embargo, el conservante no se limita de ningún modo a estos ejemplos. Además, podría ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. El producto o composición puede comprender además una sal que comprenda un catión de un metal alcalino farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo constituido por sales de Na⁺ o K⁺ o combinaciones de estas. Preferentemente, la sal es una sal de Na⁺, por ejemplo, NaCl o Na₂SO₄.

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

En algunos casos, para conseguir una acción prolongada, resulta deseable ralentizar la absorción de FSH (y otros principios activos, si están presentes) a partir de una inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede conseguir mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. Entonces, la tasa de absorción de FSH depende de su tasa de disolución que, a la vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma de la combinación de FSH administrada por vía parenteral se consigue disolviendo o suspendiendo la combinación de FSH en un vehículo oleoso. Se pueden preparar formas de liberación sostenida inyectables formando matrices microencapsuladas de la FSH (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólico. Dependiendo de la proporción de FSH respecto al polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la tasa de liberación de FSH. Los ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polivinilpirrolidona, poli(ortoésteres), poli(anhídridos), etc. Las formulaciones inyectables de liberación sostenida también se preparan atrapando la FSH en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con los tejidos corporales.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante una filtración a través de un filtro que retenga las bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Las formulaciones inyectables se pueden suministrar en cualquier envase adecuado, por ejemplo, un vial, una jeringa prerrellenada, cartuchos para inyección y similares.

El producto o composición se puede formular para un uso único o para un uso múltiple (dosis múltiples). Si el producto o composición se formula para un uso múltiple, se prefiere que se incluya un conservante. Si se incluye un conservante, se prefiere alcohol bencílico, fenol y/o *m*-cresol; sin embargo, el conservante no se limita de ningún modo a estos ejemplos. El producto o composición formulado para un uso único o uso múltiple puede comprender además una sal que comprenda un catión de un metal alcalino farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo constituido por sales de Na⁺ o K⁺ o combinaciones de estas. Preferentemente, la sal es una sal de Na⁺, por ejemplo, NaCl o Na₂SO₄.

El producto o composición se puede incluir en un envase tal como un vial, un cartucho prerrellenado (por ejemplo, para una administración única o uso múltiple) o un dispositivo de inyección tal como un «lápiz» para, por ejemplo, la administración de dosis múltiples.

El producto o composición puede ser una formulación (por ejemplo, formulación inyectable) que incluya FSH (opcionalmente con hCG, LH, actividad de LH, etc.). La actividad de LH, si está presente, se puede originar a partir de LH o gonadotropina coriónica humana, hCG. Si hay más de un principio activo presente (es decir, FSH y, por ejemplo, hCG o LH), estos pueden ser adecuados para una administración por separado o conjunta. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto se puede suministrar en cualquier paquete adecuado. Por ejemplo, un producto puede incluir una serie de envases (por ejemplo, jeringas prerrellenadas o viales) que contengan FSH o hCG, o una combinación (o combinación) de tanto FSH como hCG. La hCG puede ser hCG recombinante o hCG urinaria. Si el producto incluye una serie de envases (por ejemplo, jeringas prerrellenadas o viales) que contienen FSH, por ejemplo, FSH recombinante, cada envase puede incluir la misma cantidad de FSH. Uno o más envases pueden incluir diferentes cantidades de FSH. Las jeringas o viales se pueden envasar en un envase de tipo blíster u otros medios para mantener su esterilidad. Cualquier producto puede contener opcionalmente instrucciones para utilizar las formulaciones de FSH (y, por ejemplo, hCG si está presente). El pH y la concentración exacta de los diferentes componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con la práctica rutinaria en este campo. Remítase a *GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS*, 7.^a ed. En una realización preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para administración parenteral. Los métodos generales para la preparación de las formulaciones parenterales son conocidos en la técnica y se describen en *REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY*, *supra*, en las páginas 780-820. Las composiciones parenterales se pueden suministrar en una formulación líquida o como un sólido, que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de su administración. En una realización especialmente preferida, las composiciones parenterales se suministran en una forma farmacéutica unitaria para facilitar su administración y conseguir uniformidad de la dosis.

La FSH puede ser FSH recombinante. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, donde de un 1 a un 99% de la sialilación total es sialilación $\alpha 2,6$ y de un 99% a un 1% de la sialilación total es sialilación $\alpha 2,3$. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, donde de un 1 a un 50% de la sialilación total es sialilación $\alpha 2,6$ y de un 50% a un 99% de la sialilación total es sialilación $\alpha 2,3$. La FSH puede ser FSH recombinante que incluye sialilación $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, donde de un 5 a un 40% de la sialilación total es sialilación $\alpha 2,6$ y de un 60% a un 95% de la sialilación total es sialilación $\alpha 2,3$. Preferentemente, la FSH es FSH recombinante derivada de una línea celular humana.

La administración comprende preferentemente una dosis diaria de, o una dosis diaria equivalente a, la cantidad de FSH que se ha definido anteriormente y que se define en las reivindicaciones. La dosis (diaria) puede ser una dosis inicial (se puede reducir, incrementar o mantener durante el tratamiento).

El método puede ser un método de tratamiento de la infertilidad en el primer protocolo de estimulación del paciente (sujeto). Se apreciará que para ciclos de estimulación posteriores, las dosis se pueden ajustar de acuerdo con la respuesta ovárica real en el primer ciclo.

Los solicitantes de la presente también han descubierto que la administración de FSH a pacientes que se ha identificado que tienen unos niveles bajos de AMH [nivel de AMH < 15 pmol/L (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L), que por lo general se asociarían con una respuesta baja], a la vez que tienen Asn/Asn variante o Asn/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH, proporciona una buena respuesta en lo que se refiere al desarrollo folicular. Esto se consigue con una dosis reducida de FSH y/o una duración reducida del tratamiento, en comparación con el tratamiento de pacientes con niveles bajos de AMH y Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH. Esto permite adaptar la dosis de FSH en pacientes específicos que se ha identificado que tienen un nivel específico de AMH, así como también estos polimorfismos específicos en el FSHR. Como se expone más adelante, la duración esperada de la estimulación para un paciente que tiene un nivel de AMH < 15 pmol/L y Asn/Asn variante es de 1.5 días menos que la duración de la estimulación requerida para un paciente que tiene un nivel de AMH < 15 pmol/L y Ser/Ser variante (remítase a la Figura 7). Por consiguiente, el hecho de adaptar la dosis para pacientes que se identifica, antes del tratamiento, que tienen tanto un nivel de AMH < 15 pmol/L como Asn/Asn variante (o tanto un nivel de AMH < 15 pmol/L como Asn/Ser variante) puede permitir conseguir ahorros considerables en lo que se refiere al coste farmacéutico, así como también una reducción del riesgo de posibles efectos secundarios debidos a la administración de una dosis total más elevada de FSH de la que se requiere en estos pacientes.

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) para su uso en el tratamiento de la infertilidad, comprendiendo la composición de 10 a 12 μg de hormona estimuladora del folículo (FSH), donde la composición es para la administración (por ejemplo, a diario) a un paciente que se identifica como (por ejemplo, se selecciona como) que tiene Asn/Asn variante o Asn/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH antes del tratamiento y se identifica como (por ejemplo, se selecciona como) que tiene un nivel de AMH en suero < 15 pmol/L (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L) antes del tratamiento. La composición puede ser para la administración a un paciente que se identifica como (por ejemplo, se selecciona

como) que tiene Asn/Asn variante en la posición 680 del receptor de FSH y que se identifica como (por ejemplo, se selecciona como) que tiene un nivel de AMH en suero < 15 pmol/L (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L) (antes del tratamiento). La composición puede comprender de 10 a <12 µg de FSH, por ejemplo, 10 a 11.9 µg de FSH, por ejemplo, de 11 a 11.9 µg de FSH, por ejemplo, de 11.33 a 11.67 µg de FSH.

La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede comprender una dosis diaria de, o una dosis diaria equivalente a, las cantidades de rFSH derivada de seres humanos que se han definido anteriormente, en la presente, y en las reivindicaciones. La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede ser para la administración (a diario) de FSH empezando el día uno de tratamiento y continuando durante de seis a dieciséis días, por ejemplo, de siete a dieciséis días, por ejemplo, de 8 a 16 días, por ejemplo, de 8 a 13 días.

El tratamiento de la infertilidad puede comprender un paso de identificación (por ejemplo, determinación, por ejemplo, medición) de la variante en la posición 680 del receptor de FSH del paciente; y un paso de administración de la dosis a un paciente (que se identifica como) que tiene Asn/Asn variante o Asn/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH. El tratamiento de la infertilidad puede comprender un paso de identificación (por ejemplo, determinación, por ejemplo, medición) del nivel de AMH en suero del paciente y la administración de la dosis a un paciente (que se identifica como) que tiene un nivel de AMH en suero < 15 pmol/L (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L).

Se apreciará que la FSH, la identificación del nivel de AMH en suero del paciente y la variante en la posición 680 del receptor de FSH, etc, para estos aspectos de la invención pueden ser como para los demás aspectos de la invención que se mencionan en la presente.

Descripción detallada de la invención

A continuación se describirá la presente invención más detalladamente haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

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

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

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

la Figura 4 es un diagrama esquemático del receptor de FSH, que indica la posición de polimorfismos en las posiciones aminoacídicas 307 y 680 del exón 10 y la posición 29 en el promotor;

la Figura 5 muestra la distribución de halotipos SNP (siglas en inglés referentes a polimorfismos de un solo nucleótido) en el gen del receptor de FSH para los 222 pacientes tratados con FSH en el estudio del Ejemplo 8;

la Figura 6 es una tabla de resultados que muestra, para el conjunto de análisis completo, la duración observada (días) del tratamiento con gonadotropina (FSH) y la dosis de gonadotropina (FSH) total suministrada (µg) a pacientes/sujetos con un nivel de AMH < 15 pmol/L en cada uno de los tres genotipos del receptor de FSH diferentes respecto a la posición 680: Asn/Asn, Asn/Ser y Ser/Ser; y

la Figura 7 es una tabla de resultados que muestra, para el conjunto de análisis completo, la duración esperada (días) del tratamiento con gonadotropina (FSH) suministrado a pacientes/sujetos con un nivel de AMH < 15 pmol/L en cada uno de los tres genotipos del receptor de FSH diferentes respecto a la posición 680: Asn/Asn, Asn/Ser y Ser/Ser, que se ajusta según la dosis.

Selección de la secuencia

FSH humana

La región codificante del gen para el polipéptido alfa de FSH se utilizó de acuerdo con Fiddes y Goodman (1981). La secuencia está registrada en el banco como AH007338 y en el momento de la construcción no existían otras variantes de esta secuencia de la proteína. La secuencia se denomina en la presente SEQ ID NO:1.

La región codificante del gen para el polipéptido beta de FSH se utilizó de acuerdo con Keene *et al.* (1989). La secuencia está registrada en el banco como NM_000510 y en el momento de la construcción no existían otras variantes de esta secuencia de la proteína. La secuencia se denomina en la presente SEQ ID NO: 2.

Sialiltransferasa

α 2,3-Sialiltransferasa - La región codificante del gen para beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (α 2,3-sialiltransferasa, ST3GAL4) se utilizó de acuerdo con Kitagawa y Paulson (1994). La secuencia está registrada en el banco como L23767 y se denomina en la presente SEQ ID NO: 3.

α 2,6-Sialiltransferasa - La región codificante del gen para beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (α 2,6-sialiltransferasa, ST6GAL1) se utilizó de acuerdo con Grundmann *et al.* (1990). La secuencia está registrada en el banco como NM_003032 y se denomina en la presente SEQ ID NO: 4.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción del vector de expresión de FSH

La secuencia codificante del polipéptido alfa de FSH (AH007338, SEQ ID NO: 1) y el polipéptido beta de FSH (NM_003032, SEQ ID NO: 2) se amplificaron mediante PCR utilizando las combinaciones de cebadores FSHa-directo y FSHa-inverso y FSHb-directo y FSHb-inverso, respectivamente.

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

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

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

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

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

El ADN del vector se utilizó para transformar la cepa DH5 α de *E.coli*. Se eligieron las colonias para su amplificación. Las colonias que contenían el vector que contenía FSH tanto alfa como beta se seleccionaron para su secuenciación y todas contenían las secuencias correctas de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2. Se seleccionó pFSH A+B#17 plasmídico para su transfección (Figura 1).

Ejemplo 2. Construcción del vector de expresión de ST3

La secuencia codificante de beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (ST3, L23767, SEQ ID NO: 3) se amplificó mediante PCR utilizando la combinación de cebadores 2,3STdirecto y 2,3STinverso.

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

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

El ADN de ST3 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Afl*II y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Afl*II en el vector de expresión de mamífero dirigido por CMV que contenía un marcador de resistencia de higromicina. El vector se amplificó como se ha descrito previamente y se secuenció. El clon pST3#1 (Figura 2) contenía la secuencia correcta de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 y se seleccionó para la transfección.

Ejemplo 3. Construcción del vector de expresión de ST6

La secuencia codificante de beta-galactosamina alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (ST6, NM_003032, SEQ ID NO: 4) se amplificó mediante PCR utilizando la combinación de cebadores 2,6STdirecto y 2,6STinverso.

2,6STdirecto 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3' (SEQ ID NO: 15)

2,6STinverso 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3' (SEQ ID NO: 16)

El ADN de ST6 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Afl*II y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Afl*II en el vector de expresión de mamífero dirigido por CMV que contenía un marcador de resistencia de higromicina. El vector se amplificó como se ha descrito previamente y se secuenció. El clon pST6#11 (Figura 3) contenía la secuencia correcta de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 y se seleccionó para la transfección.

Ejemplo 4. Expresión estable de pFSH α + β en células PER.C6@. Transfección, aislamiento y cribado de los clones.

Se generaron clones PER.C6@ que producían FSH expresando ambas cadenas polipeptídicas de FSH a partir de un único plásmido (remítase al Ejemplo 1).

Para obtener clones estables, se utilizó un agente de transfección basado en liposomas con el constructo pFSH α + β . Los clones estables se seleccionaron en VPRO suplementado con FCS al 10% que contenía G418. Tres semanas después de la transfección, los clones resistentes a G418 crecieron. Los clones se seleccionaron para el aislamiento. Los clones aislados se cultivaron en medio de selección hasta que confluyeron en un 70-80%. Los sobrenadantes se evaluaron para determinar el contenido de proteína FSH, utilizando un ELISA selectivo para FSH, y la actividad farmacológica en el receptor de FSH en la línea celular clonada, utilizando un ensayo de acumulación de cAMP. Los clones que expresaban la proteína funcional se siguieron procesando llevando a cabo una expansión del cultivo en 24 pocillos, 6 pocillos y frascos T80.

Se iniciaron estudios para determinar la productividad y calidad del material procedente de siete clones en frascos T80 para generar suficiente material. Las células se cultivaron en medios suplementados como se ha descrito previamente durante 7 días y se recolectó el sobrenadante. La productividad se determinó utilizando el ELISA selectivo para FSH. El perfil isoeléctrico del material se determinó mediante enfoque isoeléctrico (IEF, por sus siglas en inglés)

utilizando métodos conocidos en la técnica. Los clones con una productividad y calidad suficientes se seleccionaron para modificar la sialiltransferasa por ingeniería genética.

Ejemplo 5. El nivel de sialilación se incrementa en células que sobreexpresan α 2,3-sialiltransferasa. Expresión estable de pST3 en células PER.C6[®] que expresan FSH; transfección, aislamiento y cribado de los clones.

Se generaron clones PER.C6[®] que producían FSH altamente sialilada expresando α 2,3 sialiltransferasa de plásmidos por separado (Ejemplo 2) en células PER.C6[®] que ya expresaban ambas cadenas polipeptídicas de FSH (del Ejemplo 4). Los clones producidos a partir de células PER.C6[®] como se ha expuesto en el Ejemplo 4 se seleccionaron según sus características, que incluyeron productividad, buen perfil de crecimiento, producción de proteína funcional y FSH producida que incluía cierta sialilación. Se generaron clones estables como se ha descrito previamente en el Ejemplo 4. Los clones se aislaron, se expandieron y se evaluaron. Los clones de α 2,3-sialiltransferasa se adaptaron a medios exentos de suero y condiciones de suspensión.

Como antes, los clones se evaluaron utilizando un ELISA selectivo para FSH, respuesta funcional en una línea celular con receptor de FSH, IEF, tasa de eliminación metabólica y análisis de Steelman Pohley. Los resultados se compararon con una FSH recombinante disponible en el mercado (Gonal-f, Serono) y las líneas celulares FSH PER.C6[®] progenitoras. La FSH producida por la mayoría de los clones presenta una sialilación significativamente mejorada (es decir, de promedio, más isoformas de FSH con números elevados de ácidos siálicos) en comparación con la FSH expresada sin α 2,3-sialiltransferasa. En conclusión, la expresión de FSH junto con sialiltransferasa en células PER.C6[®] dio como resultado un incremento de los niveles de FSH sialilada en comparación con las células que expresan únicamente FSH.

Ejemplo 6. Resumen de la producción y purificación

Se desarrolló un procedimiento para producir FSH en células PER.C6[®] que se cultivaban en suspensión en medio exento de suero. El procedimiento se describe a continuación y se aplicó a varias líneas celulares PER.C6[®] productoras de FSH.

Se preparó FSH a partir de un clon α 2,3 (Ejemplo 5) utilizando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976).

Para la producción de PER.C6[®]-FSH, las líneas celulares se adaptaron a un medio exento de suero, es decir, Excell 525 (JRH Biosciences). Las células se cultivaron en primer lugar para formar una monocapa con una confluencia de un 70%-90% en un frasco de cultivo T80. En su paso, las células se suspendieron de nuevo en el medio exento de suero, Excell 525 + L-Glutamina 4 mM, para obtener una densidad celular de 0.3×10^6 células/ml. Una suspensión celular de 25 ml se colocó en un frasco agitador de 250 ml y se agitó a 100 rpm a 37 °C con un 5% de CO₂. Tras alcanzar una densidad celular $> 1 \times 10^6$ células/ml, las células se subcultivaron hasta obtener una densidad celular de 0.2 o 0.3×10^6 células/ml y se cultivaron adicionalmente en frascos agitadores a 37 °C con un 5% de CO₂ y 100 rpm.

Para la producción de FSH, las células se transfirieron a un medio de producción exento de suero, es decir, VPRO (JRH Biosciences), que fomenta el crecimiento de las células PER.C6[®] hasta unas densidades celulares muy elevadas (normalmente $> 10^7$ células/ml en un cultivo de lotes). Las células se cultivaron en primer lugar hasta obtener una densidad celular $> 1 \times 10^6$ células/ml en Excell 525, a continuación se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm y posteriormente se suspendieron en medio VPRO + L-glutamina 6 mM hasta obtener una densidad de 1×10^6 células/ml. A continuación, las células se cultivaron en un frasco agitador durante 7-10 días a 37 °C con un 5% de CO₂ y 100 rpm. Durante este periodo, las células crecieron hasta obtener una densidad $> 10^7$ células/ml. El medio de cultivo se recolectó después de que la viabilidad celular empezara a reducirse. Las células se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación y purificación de FSH. La concentración de FSH se determinó utilizando ELISA (DRG EIA 1288).

Por consiguiente, la purificación de FSH se llevó a cabo utilizando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976). Se llevó a cabo una purificación utilizando cromatografía selectiva según la carga para enriquecer las formas altamente sialiladas conforme a métodos muy conocidos en la técnica.

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

Ejemplo 7. Cuantificación de las cantidades relativas de ácido siálico α 2,3 y α 2,6

Las cantidades porcentuales relativas de ácido siálico α 2,3 y α 2,6 en rFSH purificada (Ejemplo 6) se midieron utilizando técnicas conocidas.

Los N-glicanos se liberaron de las muestras utilizando PNGasa F en condiciones de desnaturalización y a continuación se marcaron con 2-aminobenzamida. Las formas liberadas de los glicanos se separaron a continuación y se analizaron mediante una columna de intercambio aniónico débil (WAX, por sus siglas en inglés) para determinar la distribución

de carga. Los glicanos marcados tratados con 2,3,6,8-sialidasa para la determinación del ácido siálico total y con 2,3-sialidasa para la determinación del ácido siálico 2,3 se analizaron adicionalmente mediante una columna de WAX.

5 Los porcentajes relativos de los glicanos cargados se calcularon a partir de las estructuras presentes en las agrupaciones de glicanos digeridos y no digeridos y se muestran en la Figura 4 (para 8 muestras). Se determinó que estos estaban comprendidos en los intervalos de un 50% a un 95% (por ejemplo, de aproximadamente un 80% a un 90%) para la sialilación α 2,3 y de un 5% a un 50%, por lo general de aproximadamente un 10 a un 20% (o aproximadamente un 31% o 35%) para la sialilación α 2, 6.

10 **Ejemplo 8 - Un estudio de dosis múltiples que investiga FE 999049 en comparación con GONAL-F.**

15 A continuación, se describe un ensayo aleatorizado, controlado, sin evaluador, de grupos paralelos, multinacional y de múltiples centros que evalúa la correlación de dosis-respuesta de FE 999049 en pacientes sometidos a estimulación ovárica controlada para la fertilización *in vitro* (FIV) / inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE). La población de pacientes era de 265 pacientes de FIV con una edad comprendida entre de 18 y 37 años, con un BMI de 18.5 a 32.0 kg/m².

20 El ensayo se diseñó como un ensayo de dosis-respuesta, considerando el número de ovocitos extraídos como el punto de evaluación primario. Los puntos de evaluación secundarios explorarán el impacto cualitativo y cuantitativo de diferentes dosis de FE 999049 respecto al perfil endocrino, desarrollo folicular, fertilización de ovocitos, calidad del embrión y eficacia del tratamiento (es decir, consumo de gonadotropina total y duración de la estimulación). El ensayo está diseñado para evaluar la eficacia de FE 999049 a la hora de establecer un embarazo cuando se utiliza en una estimulación ovárica controlada para ciclos de FIV/IICE.

25 Los sujetos se evaluaron en un periodo de tres meses antes de la aleatorización para determinar su cumplimiento con los criterios de inclusión y exclusión, que incluían una evaluación de la hormona antimulleriana (AMH) para incrementar la homogeneidad de la población del ensayo respecto a la respuesta ovárica y minimizar el número de posibles hiperrespondedores o respondedores bajos frente a las dosis de FE 999049 y la dosis de GONAL-F utilizadas en el ensayo. La evaluación de AMH se midió utilizando el kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas Gen-II para AMH (Beckman Coulter, Inc., Webster, Texas). Este ensayo puede detectar concentraciones de AMH superiores a 0.57 pmol/L con un límite de cuantificación mínimo de 1.1 pmol/L.

35 El día 2-3 de su ciclo menstrual, los sujetos se aleatorizaron con una relación de 1:1:1:1:1 para el tratamiento con 90 UI, 120 UI, 150 UI, 180 UI o 210 UI de FE 999049 o 150 UI de GONAL-F, y se inició la estimulación ovárica. La aleatorización se estratificó de acuerdo con el nivel de AMH en el cribado [5.0-14.9 pmol/L (nivel bajo de AMH) y de 15.0 a 44.9 pmol/L (nivel alto de AMH)].

40 Gonal-F se suministra según la masa (FbM, siglas en inglés referentes a *filled by mass*) a petición de la FDA; por lo tanto, la referencia a μ g resulta adecuada. La etiqueta de Gonal-F indica 600 UI/44 μ g, lo cual indica que 150 UI equivalen a 11 μ g. Sin embargo, existe cierta variación y el certificado del lote para este ensayo indica que 11.3 μ g de Gonal-F equivalían a 150 UI. Las dosis de FE999049 se presentan según el contenido de proteína (μ g) en lugar de la actividad biológica. Por lo tanto, las dosis de FE999049 fueron de 5.2 μ g (90 UI), 6.9 μ g (120 UI), 8.6 μ g (150 UI), 10.3 μ g (180 UI) o 12.1 μ g (210 UI).

45 La distribución de sujetos y dosis se dispone como se indica continuación (los datos son el número de sujetos):

Tabla 1

	FE 999049					GONAL-F	Total
	5.2 μ g	6.9 μ g	8.6 μ g	10.3 μ g	12.1 μ g	11.3 (11) μ g	
Sometidos a cribado							334
Aleatorizados y expuestos	42	45	44	45	46	43	265
Estrato de nivel alto de AMH (15.0 - 44.9 pmol/L)	23	26	24	24	26	25	148 (56%)
Estrato de nivel bajo de AMH (5.0 - 14.9 pmol/L)	19	19	20	20	21	18	117 (44%)
De acuerdo con el protocolo	40	42	42	44	44	43	255

50 El nivel de dosis diaria de FE 999049 o GONAL-F se fija a lo largo de todo el periodo de estimulación. Durante la estimulación, los sujetos se monitorizan el día de estimulación 1, 4 y 6 y a partir de entonces al menos cada dos días. Cuando se observan 3 folículos de tamaño \geq 15 mm, las visitas se realizan a diario. Los sujetos se tratan con FE 999049 o GONAL-F durante un máximo de 16 días.

Para evitar una aparición de LH prematura, se puede iniciar la administración de un antagonista de GnRH (acetato de ganirelix, ORGALUTRAN, MSD / Schering-Plough) el día de estimulación 6 con una dosis diaria de 0.25 mg y se continúa a lo largo del periodo de estimulación. El desencadenamiento de la maduración folicular final se lleva a cabo el día en el que se observa un número de folículos ≥ 3 con un diámetro ≥ 17 mm. Si hay < 25 folículos con un diámetro ≥ 12 mm, se administran 250 μg de hCG recombinante (coriogonadotropina alfa, OVITRELLE, Merck Serono / EMD Serono). Si hay 25-35 folículos con un diámetro ≥ 12 mm, se administran 0.2 mg de agonista de GnRH (acetato de triptorelina, DECAPEPTYL / GONAPEPTYL, Ferring Pharmaceuticals). En el caso de una respuesta ovárica excesiva, que se define como > 35 folículos con un diámetro ≥ 12 mm, el tratamiento se cancela. En el caso de una respuesta ovárica pobre, que se define como < 3 folículos con un diámetro ≥ 10 mm observados el día de estimulación 10, el ciclo se podría cancelar.

La extracción de los ovocitos se lleva a cabo 36 h (± 2 h) después de desencadenar la maduración folicular final y de inseminar los ovocitos mediante FIV y/o IICE. La fertilización y el desarrollo del embrión se evalúan desde la extracción del ovocito hasta el día de la transferencia. Para los sujetos en los que se desencadenó la maduración folicular final con hCG, se transfiere un blastocito de la mejor calidad disponible el día 5 después de la extracción del ovocito mientras que los demás blastocitos se congelan. Para los sujetos en los que se desencadenó la maduración folicular final con un agonista de GnRH, no se produce ninguna transferencia del embrión en el ciclo fresco y en su lugar se congelan los blastocitos el día 5. Se proporcionan comprimidos vaginales de progesterona (LUTINUS, Ferring Pharmaceuticals) de 100 mg 3 veces al día para favorecer la fase lútea a partir del día después de la extracción del ovocito hasta el día de la visita para el embarazo clínico. Se lleva a cabo una prueba de βhCG 13-15 días después de la transferencia del embrión y el embarazo clínico se confirmará mediante ultrasonido transvaginal (UTV) 5-6 semanas después de la transferencia del embrión.

Resultados

El número de ovocitos extraídos (punto de evaluación primario) se muestra en la siguiente Tabla.

Tabla 2

	FE 999049					GONAL-F
	5.2 μg	6.9 μg	8.6 μg	10.3 μg	12.1 μg	11.3 (11) μg
Ovocitos extraídos						
Todos	5.2 (3.3)	7.9 (5.9)	9.2 (4.6)	10.6 (7.0)	12.2 (5.9)	10.4 (5.2)
Nivel alto de AMH	5.9 (3.9)	9.1 (6.4)	10.6 (4.8)	13.6 (7.8)	14.4 (5.8)	12.4 (5.4)
Nivel bajo de AMH	4.5 (2.2)	6.3 (4.9)	7.4 (3.8)	6.9 (3.6)	9.4 (4.9)	7.8 (3.4)
Los datos son la media (DE)						

Se consiguió el objetivo primario: se estableció una correlación significativa de dosis-respuesta para FE 999049 respecto al número de ovocitos extraídos. Este descubrimiento se observó no solo para la población global del ensayo, sino también para cada uno de los dos estratos de AMH utilizados en la aleatorización.

Se demostró una dosis-respuesta significativa para FE 999049 para todos los parámetros farmacodinámicos objetivo claves, por ejemplo, estradiol, inhibina B e inhibina A. Para un nivel de dosis en microgramos similar, las respuestas farmacodinámicas con FE 999049 fueron mayores que con GONAL-F (estos resultados no se muestran).

Las concentraciones en suero de FSH después de la exposición a FE 999049 fueron significativamente mayores que para GONAL-F. Los resultados confirman que el perfil PK de FE 999049 difiere del de GONAL-F. Las tasas de fertilización, desarrollo de blastocitos y tasas de embarazo en pacientes de FIV/IICE tratados con 999049 se encontraron dentro de las expectativas.

No se plantearon problemas de seguridad con el uso de FE 999049. Se documentó una buena tolerabilidad local.

Análisis adicional

Los solicitantes han analizado adicionalmente los datos para identificar la(s) dosis de FE 999049 que cumplen con los siguientes criterios respecto al número de ovocitos extraídos:

- Ovocitos extraídos en el intervalo de 8-14
- Minimizar la proporción de pacientes con < 8 ovocitos
- Minimizar la proporción de pacientes con < 4 o ≥ 20 ovocitos

Estrato de nivel bajo de AMH

Tal como se observa en la Tabla 2, la dosis de FE999049 que cumplió con el primer criterio (ovocitos extraídos en el intervalo de 8-14) fue de 12.1 µg (media de 9.4 ovocitos extraídos). La distribución de ovocitos se muestra en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

	FE 999049					GONAL-F
	5.2 µg	6.9 µg	86 µg	10.3 µg	12.1 µg	11.3 (11) µg
Ovocitos extraídos						
< 4	32%	24%	15%	10%	10%	6%
4-7	63%	42%	45%	60%	20%	56%
8-14	5%	24%	35%	30%	60% ↔ 33%	
15-19	0%	5%	5%	0%	5%	6%
≥ 20	0%	5%	0%	0%	5%	0%
Los datos representan el % de sujetos						

Según indica el recuadro y la flecha, una dosis de 12.1 µg de FE999049 proporciona la extracción del número más deseable de ovocitos en un 60% de sujetos en el grupo de nivel bajo de AMH. Esto supone una mejora considerable respecto a Gonal-F (número más deseable de ovocitos en tan solo un 33% de los sujetos). No se observaron indicios de SHO temprano de naturaleza moderada ni grave, ni se produjeron casos que requirieran acción preventiva; no existen problemas asociados con la dosis de 12.1 µg de FE999049 en un paciente con un nivel bajo de AMH.

Por lo tanto, los solicitantes han descubierto que una dosis, o dosis equivalente a, de 6 a 24 µg, por ejemplo, de 9 a 14 µg, por ejemplo, 12 µg, de FSH recombinante derivada de seres humanos es adecuada para su uso en el tratamiento de la infertilidad en un paciente que tiene un nivel de AMH en suero < 15 pmol/L, por ejemplo, 0.05-14.9 pmol/L, por ejemplo, 5.0-14.9 pmol/L. La dosis proporciona una respuesta eficaz a la vez que minimiza el riesgo de SHO.

Evaluación exploratoria

A modo de evaluación exploratoria, los inventores de la presente han investigado la contribución del polimorfismo del receptor de FSH a la respuesta ovárica y la eficacia del tratamiento tras la estimulación con FE999049.

Se analizó el ADN genómico de todos los pacientes del ensayo en busca de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en las posiciones 29,307 y 860 del FSH-R en la Universidad de Modena y Reggio Emilia, Italia. La Figura 4 es un diagrama esquemático del receptor de FSH, que indica la posición de polimorfismos en las posiciones aminoacídicas 307 y 680 del exón 10 y la posición 29 en el promotor. Esta distribución de combinaciones de FSH-R con SNP es la siguiente: AA 7%, AG 35% y GG 58% para la posición 29; Thr/Thr 29%, Ala/Thr 54% y Ala/Ala 17% para la posición 307; y Asn/Asn 30%, Asn/Ser 53% y Ser/Ser 17% para la posición 680. La Figura 5 muestra la distribución de halotipos SNP en el gen del receptor de FSH para los 222 pacientes tratados con FSH en el estudio del Ejemplo 8. La distribución para cada posición y las combinaciones globales no fueron significativamente diferentes entre el estrato de nivel bajo de AMH y el de nivel alto de AMH.

Los resultados del ensayo clínico se analizaron adicionalmente para evaluar si los SNP tienen algún efecto sobre la duración del tratamiento y la dosis total requerida. Esto se llevó a cabo para el grupo de nivel bajo de AMH y el grupo de nivel alto de AMH.

El polimorfismo de FSHR se examinó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) utilizando métodos conocidos en la técnica. Las mujeres se clasificaron como genotipos Asn/Asn, Asn/Ser y Ser/Ser. El análisis genético se describió en el siguiente protocolo general y los pacientes firmaron un consentimiento informado especial. Las muestras se tomaron como parte de las otras muestras sanguíneas en el día de estimulación 1. Se midieron en la Universidad de Modena y Reggio Emilia.

Resumen de los procedimientos utilizados para el análisis de SNP en el gen del receptor de FSH**Procedimientos generales:**

1. Extracción de ADN genómico (a partir de sangre utilizando el kit extracción de ADN genómico Nucleon, GE HEALTHCARE)

2. Procedimientos de operación utilizando NanoDrop.

Procedimientos de HRM:

5 Genotipado de los SNP mediante una metodología de fusión de alta resolución (HRM) (utilizando la enzima SsoFast EvaGreen Supermix cod. 172-5201, Bio-Rad; placas HSP-96, cat. HSP9645, Bio-Rad; y un ciclador térmico de tiempo real CFX96 de Bio-Rad).

Procedimientos de secuenciación:

10 En caso de duda sobre los resultados de HRM (después de dos HRM independientes en las mismas muestras), se utilizaron los siguientes procedimientos de secuenciación:

- 15 1. Reacción de PCR y amplificación.
2. Purificación de los productos de PCR.
3. Cuantificación de la PCR purificada.
4. Protocolo de la reacción de secuencia.
5. Purificación del producto de secuencia.
6. Electroforesis capilar llevada a cabo en un instrumento ABI PRISM 3130 .
- 20 7. Evaluación y validación de los resultados obtenidos mediante la secuenciación por electroforesis capilar con ABI PRISM 3100.

Resultados

25 La Figura 7 es una tabla de resultados que muestra, para el conjunto de análisis completo, la duración esperada (días) del tratamiento con gonadotropina (FSH) suministrado a pacientes/sujetos con un nivel de AMH < 15 pmol/L en cada uno de los tres genotipos del receptor de FSH diferentes respecto a la posición 680: Asn/Asn, Asn/Ser y Ser/Ser, que se ajusta según la dosis.

30 La Figura 7 muestra que la duración media esperada del tratamiento requerida para la estimulación de un paciente con un nivel de AMH < 15 pmol/L y Ser/ser variante es de 9.59 días, que es aproximadamente 1.5 días más prolongada que la requerida para la estimulación de un paciente con un nivel de AMH < 15 pmol/L y Asn/Asn variante (8.13 días) y aproximadamente 1.3 más prolongada que la requerida para la estimulación de un paciente con un nivel de AMH < 15 pmol/L y Ser/Asn variante (8.26 días).

35 Como se ha indicado anteriormente, el éxito (en cuanto a embarazos y/o nacimientos con vida) es más probable si el paciente presenta una respuesta adecuada (desarrollo multifolicular ovárico esperado, aumento del 17- β -estradiol en circulación) que se produce dentro de una ventana de tratamiento ideal. El éxito se ve mejorado adicionalmente si la respuesta se encuentra en el centro de esta ventana de tratamiento, es decir, no demasiado pronto en la ventana ni demasiado tarde. La reducción de la duración del tratamiento en pacientes que tienen unos niveles bajos de AMH y Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH (incrementando la dosis por encima de 12 μ g) podría trasladar la respuesta hacia el centro de la ventana de tratamiento, con una probabilidad de éxito mejorada.

40 Por consiguiente, existe la posibilidad de ajustar la dosis para pacientes que se ha identificado que tienen un nivel de AMH level < 15 pmol/L y Ser/Ser variante antes del tratamiento. La identificación de pacientes con Ser/Ser antes del tratamiento puede permitir que se incremente la dosis inicial en esos pacientes, en comparación con los que tienen Ser/Asn y Asn/Asn.

50 Como se ha expuesto anteriormente, una dosis de 12.1 μ g de FE999049 proporciona la extracción del número más deseable de ovocitos en un 60% de sujetos en el grupo de nivel bajo de AMH (Tabla 3). El grupo de nivel bajo de AMH que se muestra en la Tabla 3 incluía pacientes con Ser/Ser variante, así como también aquellos con Ser/Asn y Asn/Asn. La administración de una dosis inicial más elevada (por ejemplo, de 9 a 24 μ g, por ejemplo, de > 12 a 24 μ g, por ejemplo, 12.33 μ g o 13 μ g de FSH recombinante derivada de seres humanos) a pacientes que tienen unos niveles bajos de AMH [nivel de AMH < 15 pmol/L, (por ejemplo, de 0.05 pmol/L a 14.9 pmol/L, por ejemplo, de 5.0 pmol/L a 14.9 pmol/L)], a la vez que tienen Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH, puede presentar ventajas ya que puede proporcionar una mayor probabilidad de éxito (en cuanto a embarazos y/o nacimientos con vida) y una mejor predictibilidad del éxito.

60 La Figura 7 muestra que la duración media del tratamiento requerida para la estimulación de un paciente con un nivel de AMH < 15 pmol/L y Asn/Asn variante es de 8.13 días, y que la requerida para la estimulación de un paciente con un nivel de AMH < 15 pmol/L y Ser/Asn variante es de 8.26 días, de aproximadamente 1.5 a 1.3 días más corta que la duración para el tratamiento equivalente de un paciente con un nivel de AMH < 15 pmol/L y Ser/Ser variante (9.59 días). Por lo tanto, la identificación de pacientes con un nivel de AMH < 15 pmol/L y Ser/Asn y Asn/Asn variante antes del tratamiento permite la posibilidad de que la dosis inicial para estos pacientes se reduzca hasta menos de 12 μ g de FE 999049, por ejemplo, de 10 a 12 μ g, o que se reduzca la duración del tratamiento, a la vez que se sigue proporcionando una buena respuesta en cuanto al desarrollo folicular. Esto puede proporcionar un beneficio en cuanto

al coste del producto farmacéutico y también en cuanto a la reducción del riesgo asociado con la administración de una dosis más elevada que se requiere para conseguir el efecto en estos pacientes.

La Figura 6 es una tabla de resultados que muestra, para el conjunto de análisis completo, la duración observada (días) del tratamiento con gonadotropina (FSH) y la dosis de gonadotropina (FSH) total suministrada (μg) a pacientes/sujetos con un nivel de AMH < 15 pmol/L en cada uno de los tres genotipos del receptor de FSH diferentes respecto a la posición 680: Asn/Asn, Asn/Ser y Ser/Ser. Esto confirma los efectos mostrados en la Figura 7.

Los resultados no mostraron este efecto relacionado con SNP en la población de nivel alto de AMH.

Esto permite adaptar la dosis de FSH en pacientes específicos que se ha identificado que tienen un nivel específico de AMH y un polimorfismo específico en el FSHR.

Ejemplo 9 - Protocolo de EOC individualizado (nivel bajo de AMH)

Los pacientes seleccionados están a punto de someterse a una EOC para la fertilización *in vitro* (FIV) / inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE) mediante métodos conocidos en la técnica. El protocolo de pretratamiento incluye la evaluación/cribado de AMH en suero del paciente utilizando un kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas Gen-II para AMH (Beckman Coulter, Inc., Webster, Texas). Este ensayo puede detectar concentraciones de AMH superiores a 0.57 pmol/L con un límite de cuantificación mínimo de 1.1 pmol/L. La AMH se puede medir utilizando otros kits de ensayo (por ejemplo, que se pueden adquirir de Roche). El protocolo de pretratamiento incluye la identificación de la variante alélica en la posición 680 del receptor de FSH tras la extracción del ADN genómico mediante métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, utilizando un kit para la extracción de ADN genómico a partir de sangre y la secuenciación posterior del ADN, tal como se describe, por ejemplo, en Gromoll *et al.*, *Methods*, 21, 83-97 (2000), Simoni *et al.*, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol 84, N.º 2, 751-755 (1999), Falconer *et al.*, *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005: 84: 806-811 (2005), y las referencias citadas en estos, o mediante una PCR y un método de RFLP tal como el que se expone en Loutradis *et al.*, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 23, N.º 4, abril de 2006).

El protocolo de EOC procede de la manera habitual con la excepción de la administración de la dosis inicial de FE 999049 de acuerdo con el nivel de AMH en el cribado. Un paciente con un nivel de AMH < 15 pmol/L y Ser/Asn o Asn/Asn variante recibiría la administración de una dosis diaria inicial de aproximadamente 12 μg de FE 999049, un producto de FSH recombinante derivado de seres humanos producido de acuerdo con el método del Ejemplo 6, o < 12 μg de FE 999049, por ejemplo, de 10 a 12 μg , por ejemplo, 11.33 μg o 11.67 μg , de la FSH recombinante derivada de seres humanos. Un paciente con un nivel de AMH < 15 pmol/L y Ser/Ser variante recibiría una dosis diaria inicial más elevada superior a 12 μg (por ejemplo, de 12.33 a 24 μg , o 13 - 24 μg de la FSH recombinante derivada de seres humanos.

Referencias

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

Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A y López FJ. (1997) *Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. Mol Endocrinol*. **11(5)**, 517-526.

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

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

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

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

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

Dias JA, Van Roey P. (2001). *Structural biology of human follitropin and its receptor. Arch Med Res*. **32(6)**, 510-519.

- Fiddes, J. C. y Goodman, H. M. (1979) *Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin*. *Nature*, 281, 351-356.
- 5 Flack, M.R., Bennet, A.P., Froehlich, J. Anasti, JN y Nisula, B. (1994). *Increased biological activity due to basic isoforms in recombinant human follicle-stimulating hormone produced in a human cell line*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 756-760.
- 10 Fox KM, Dias JA y Van Roey P. (2001). *Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone*. *Mol Endocrinol.* **15(3)**, 378-89.
- 15 Grabenhorst E, Hoffmann A, Nimitz M, Zettlmeissl G y Conradt HS. (1995). *Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(beta 1-4)GlcNAc-R alpha 2,6-sialyltransferase alpha 2,6-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(beta 1-4)GlcNAc(beta 1-2)Man(alpha 1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant beta-trace protein*. *Eur J Biochem.* **232(3)**, 718-25.
- 20 Green ED y Baenziger JU. (1988). *Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones*. *J Biol Chem.* **263(1)**, 36-44.
- Grundmann,U., Nerlich,C., Rein,T. y Zettlmeissl, G. (1990). *Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase*. *G Nucleic Acids Res.* **18(3)**, 667.
- 25 Howles, C.M. (1996). *Genetic engineering of human FSH (Gonal-F)*. *Hum Reprod. Update*, **2**, 172-191.
- Kagawa Y, Takasaki S, Utsumi J, Hosoi K, Shimizu H, Kochibe N y Kobata A. (1988). *Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon-beta 1 and recombinant human interferon-beta 1 produced by three different mammalian cells*. *J Biol Chem.* **263(33)**, 17508-17515.
- 30 Keene, J.L., Matzuk, M.M., Otani, T., Fauser, B.C,J,M., Galway, A.B., Hsueh, A.J.W. y Boime, I. (1989). *Expression of Biologically active Human Follitropin in Chinese Hamster Ovary Cells*. *The Journal of Biological Chemistry*, **264(9)**, 4769-4775.
- 35 Kitagawa,H. y Paulson,J.C (1994) *Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups*. *J. Biol. Chem.* **269(2)**, 1394-1401.
- Lee EU, Roth J, y Paulson JC (1989) *Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase*. *J Biol Chem.* **264(23)**, 13848-13855.
- 40 de Leeuw, R., Mulders, J., Voortman, G. Rombout, F. Damm, J. y Kloosterboer, L. (1996) *Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon)*. *Mol. Hum. Reprod.*, **2**, 361-369.
- 45 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem.* **193(1)**, 265-75.
- Lowry, PJ, McLean, C, Jones RL y Satgunasingam N. (1976) *Purification of anterior pituitary and hypothalamic hormones* *Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)*. **7**, 16-21.
- 50 Olivennes F, Howles CM, Borini A, Germond M, Trew G, Wikland M, Zegers-Hochschild F, Saunders H (2009) *Individualizing FSH dose for assisted reproduction using a novel algorithm: the CONSORT study*. *Reprod Biomed Online*. febrero de 2009;**18(2)**:195-204.
- 55 Pierce JG y Parsons TF (1981) *Glycoprotein hormones: structure and function* *Annu Rev Biochem.* **50**, 465-495.
- Pricer WE Jr y Ashwell G. (1971). *The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver*. *J Biol Chem.* **246(15)**, 4825-33.
- 60 Rathnam P y Saxena BB. (1975). *Primary amino acid sequence of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit*. *J Biol Chem.*; **250(17)**:6735-6746.
- Regoeczi E, Debanne MT, Hatton MC y Koj A. (1978) *Elimination of asialofetuin and asialoorosomuroid by the intact rat*. *Quantitative aspects of the hepatic clearance mechanism*. *Biochim Biophys Acta.* **541(3)**, 372-84.
- 65 Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA y Rudd PM (2006) *Methods in Molecular Biology*, ed I Brockhausen-Schutzbach (Humana Press), 347: *Glycobiology protocols*, 125-144.

- Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO y Vutyavanich T. (1987). *Structure-function relationships of gonadotropins. Recent Prog Horm Res.* **43**:383-429.
- 5 Saxena BB y Rathnam P. (1976) *Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. J Biol Chem.* **251(4)**, 993-1005.
- Steelman SL y Pohley FM. (1953) *Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. Endocrinology.* **53(6)**, 604-616.
- 10 Steer CJ y Ashwell G. (1980) *Studies on a mammalian hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. Evidence for receptor recycling in isolated rat hepatocytes. J Biol Chem.* **255(7)**, 3008-13.
- 15 Svensson EC, Soreghan B y Paulson JC. (1990) *Organization of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. J Biol Chem.* 265(34):20863-20868.
- Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N y Kobata A (1988). *Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem.* **263(8)**, 3657-3663.
- 20 Timossi CM, Barrios de Tomasi J, Zambrano E, González R, Ulloa-Aguirre A. (1998). *A naturally occurring basically charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity in vitro. Neuroendocrinology.* **67(3)**, 153-163.
- 25 Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, González-Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM y Ulloa-Aguirre A. (2000). *Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. J Endocrinol.* **165(2)**, 193-205.
- Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damian-Matsumura, P. y Chappel, S.C. (1988) *Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. Hum. Reprod.* **3**, 491-501.
- 30 Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P. Jimenez, M, Zambrano, E y Díaz-Sánchez, V. (1992) *Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle stimulating hormone. Hum. Reprod.* **7**, 23-30.
- 35 Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ y Padmanabhan V. (1995). *Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. Endocr Rev.* **16(6)**, 765-787.
- Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P y Timossi C (2001). *Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. Arch Med Res.* **32(6)**, 520-532.
- 40 Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A y Nayudu P. (2003). *Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. Biol Reprod.* **69(2)**, 379-389.
- 45 Van Lenten L y Ashwell G. (1972) *The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. Development of a quantitative inhibition assay. J Biol Chem.* **247(14)**, 4633-40.
- Wide, L. y Albertsson-Wikland, K. (1990) *Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 271-276.
- 50 Wide, L. y Bakos, O. (1993). *More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 885-889.
- Wide L, Naessén T, Sundström-Poromaa I, Eriksson K. (2007) *Sulfonation and sialylation of gonadotropins in women during the menstrual cycle, after menopause, and with polycystic ovarian syndrome and in men. J Clin Endocrinol Metab.*; **92(11)**, 4410-4417.
- 55 Zambrano E, Zariñán T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J y Ulloa-Aguirre A. (1999). *Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. Endocrine.* **10(2)**, 113-121.
- 60 Zhang X, Lok SH y Kon OL (1998) *Stable expression of human alpha-2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. Biochim Biophys Acta.* **1425(3)**, 441-452.
- 65

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

SEQ ID NO: 1

Polipéptido alfa de la hormona estimuladora del folículo
Número de acceso AH007338
Secuencia de nucleótidos de FSH alfa

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

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

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

SEQ ID NO: 2

Polipéptido beta de la hormona estimuladora del folículo
Número de acceso NM_000510
Secuencia de nucleótidos de FSH beta

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

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

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

SEQ ID NO: 3

Beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4
Número de acceso L23767
Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

ES 2 784 625 T3

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

Secuencia proteica de ST3GAL4 (SEQ ID NO: 7)

```
1 MCPAGWKLLA MLALVLVVMV WYSISREDRY IELFYFPIPE KKEPCLQGEA ESKASKLFGN
61 YSRDQPIFLR LEDYFVWKTP SAYELPYGTK GSEDLLLRVL AITSSSIPKN IQSLRCRCV
121 VVGNGHRLRN SSLGDAINKY DVVIRLNNAP VAGYEGDVGS KTTMRLFYPE SAHFDPKVEN
181 NPDTLVLVA FKAMDFHWIE TILSDKRRVR KGFWKQPPLI WDVNPKQIRI LNPFFMEIAA
241 DKLLSLPMQQ PRKIKQKPTT GLLAITLALH LCDLVHIAGF GYPDAYNKKQ TIHYEQITL
5 301 KSMAGSGHNV SQEALAIKRM LEMGAIKNLT SF
```

SEQ ID NO: 4

```
10 Beta-galactosamina alfa-2,6-sialiltransferasa 1
Número de acceso NM_003032
Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1
```

ES 2 784 625 T3

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

Secuencia proteica de ST6GAL1 (SEQ ID NO: 8)

5

1 MIHTNLKKKF SCCVLVFLLF AVICVWKEKK KGSYYDSFKL QTKEFQVLKS LGKLAMGSDS
61 QSVSSSSTQD PHRGRQTLGS LRGLAKAKPE ASFQVWNKDS SSKNLI PRLQ KIWKNYLSMN
121 KYKVSYKGP PGIKFSAEAL RCHLRDHVNV SMVEVDFPF NTSEWEGYLP KESIRTKAGP
181 WGRCAVVSSA GSLKSSQLGR EIDDHDAVLR FNGAPTANFQ QDVGTKTTIR LMNSQLVTTE
241 KRFLKDSLYN EGILIVWDPS VYHSDIPKQY QNPDYNFFNN YKTYRKLHPN QPFYILKPQM
301 PWELWDILQE ISPEEIQPNP PSSGMLGIII MMTLCDQVDI YEFLPSKRKT DVCYYYQKFF
361 DSACTMGAYH PLYEKNLVK HLNQGTDEDI YLLGKATLPG FRTIHC

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ferring BV

<120> Composición para el tratamiento de la infertilidad

<130> P/72834.EP01

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 351

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggcca cattgtcggg gtttctgcat	60
gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca	120
ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattg gctgctgctt ctctagagca	180
tatcccactc cactaaggtc caagaagacg atgttggctc aaaagaacgt cacctcagag	240
tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagtg	300
gagaaccaca cggcgtgcc a ctgcagtact tgttattatc acaaactcta a	351

<210> 2

<211> 390

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgaagacac tccagttttt cttccttttc tggctgctga aagcaatctg ctgcaatagc	60
tgtgagctga ccaacatcac cattgcaata gagaaagaag aatgtcgttt ctgcataagc	120
atcaacacca cttgggtgtgc tggctactgc tacaccaggg atctgggtgta taaggaccca	180
gccaggccca aaatccagaa aacatgtacc ttcaaggaac tggatatatga aacagtgaga	240
gtgcccggct gtgctcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc caccagtgt	300
cactgtggca agtgtgacag cgacagcact gattgtactg tgcgaggcct ggggccagc	360
tactgctcct ttggtgaaat gaaagaataa	390

<210> 3

<211> 999

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgtgcctcg caggctggaa gctcctggcc atgttggctc tggctcctggc cgtcatggtg	60
tggattcca tctcccggga agacaggtac atcgagcttt tttatcttcc catcccagag	120
aagaaggagc cgtgcctcca gggtaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggcaac	180

ES 2 784 625 T3

tactcccggg atcagcccat cttcctgcgg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca 240
 tctgcttacg agctgcccta tgggaccaag gggagtgagg atctgctcct ccgggtgcta 300
 gccatcacca gctcctccat cccaagaac atccagagcc tcaggtgccg ccgctgtgtg 360
 gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgccat caacaagtac 420
 gatgtgggtca tcagattgaa caatgcccc a gtggctggct atgaggggtga cgtgggctcc 480
 aagaccacca tgcgtctctt ctaccctgaa tctgcccact tcgaccccaa agtagaaaaac 540
 aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag 600
 accatcctga gtgataagaa gcgggtgcga aagggtttct ggaaacagcc tcccctcatc 660
 tgggatgtca atcctaaca gattcggatt ctcaaccctt tcttcatgga gattgcagct 720
 gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gccaccacg 780
 ggctgtgtgg ccatcacgct ggcctccac ctctgtgact tgggtcacat tgccggcttt 840
 ggctaccag acgcctacaa caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc 900
 aagtccatgg cggggtcagg ccataatgtc tccaagagg ccctggccat taagcggatg 960
 ctggagatgg gagctatcaa gaacctcacg tccttctga 999

<210> 4

<211> 1221

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgattcaca ccaacctgaa gaaaaagtcc agctgctgcg tcctggctct tcttctgttt 60
 gcagtcactc gtgtgtggaa ggaaaagaag aaagggagtt actatgattc ctttaaattg 120
 caaaccaagg aattccaggt gttaaagagt ctggggaaat tggccatggg gtctgattcc 180
 cagtctgtat cctcaagcag caccacaggac cccacaggg gccgccagac cctcggcagt 240
 ctcagaggcc tagccaaggc caaacagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc 300
 tcttcaaaa accttatccc taggctgcaa aagatctgga agaattacct aagcatgaac 360
 aagtacaaag tgcctacaa ggggccagga ccaggcatca agttcagtgc agaggccctg 420
 cgctgccacc tccgggacca tgtgaatgta tccatggtag aggtcacaga ttttcccttc 480
 aatacctctg aatgggaggg ttatctgccc aaggagagca ttaggaccaa ggctgggcct 540
 tggggcaggt gtgctgttgt gtcgtcagcg ggatctctga agtcctcca actaggcaga 600
 gaaatcgatg atcatgacgc agtcctgagg tttaatgggg caccacagc caacttccaa 660
 caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctcagttggt taccacagag 720
 aagcgttcc tcaaagacag tttgtacaat gaaggaatcc taattgtatg ggaccatct 780
 gtataccact cagatatccc aaagtgttac cagaatccgg attataattt ctttaacaac 840

ES 2 784 625 T3

tacaagactt atcgtaagct gcacccaat cagccctttt acatcctcaa gcccagatg 900
 ccttgggagc tatgggacat tcttcaagaa atctccccag aagagattca gccaaacccc 960
 ccatcctctg ggatgcttgg tatcatcatc atgatgacgc tgtgtgacca ggtggatatt 1020
 tatgagttcc tcccatccaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc 1080
 gatagtgcct gcacgatggg tgcctaccac ccgctgctct atgagaagaa tttggtgaag 1140
 catctcaacc agggcacaga tgaggacatc tacctgcttg gaaaagccac actgcctggc 1200
 ttccggacca ttcactgcta a 1221

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

<400> 5

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

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

<400> 6

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile

ES 2 784 625 T3

85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 8

ES 2 784 625 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Phe Asn Gly Ala Pro Thr Ala Asn Phe Gln Gln Asp Val Gly
210 215 220

ES 2 784 625 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Arg Thr Ile His Cys
405

<210> 9

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR FSHa-directo

<400> 9

ccaggatccg ccaccatgga ttactacaga aaaatatgc 39

<210> 10

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR FSHa-inverso

<400> 10

ggatggctag ctaagattt gtgataataa c 31

<210> 11
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR FSHb-directo
 <400> 11
 ccaggcgcgc caccatgaag acactccagt ttttc 35

<210> 12
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR FSHb-inverso
 <400> 12
 ccgggtaac ttattattct ttcattcac caaagg 36

<210> 13
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR 2,3STdirecto
 <400> 13
 ccaggatccg ccaccatgtg tcctgcaggc tgaagc 37

<210> 14
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR 2,3STinverso
 <400> 14
 ttttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg 35

<210> 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR 2,6STdirecto
 <400> 15
 ccaggatccg ccaccatgat tcaccaaac ctgaag 36

<210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR 2,6STinverso
 <400> 16
 ttttttctt aagtagcag tgaatgtcc gg 32

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de la infertilidad, comprendiendo la composición de > 12 a 24 µg de hormona estimuladora del folículo (FSH), donde la composición es para la administración a un paciente que se identifica que tiene Ser/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH antes del tratamiento y se identifica que tiene un nivel de AMH en suero < 15 pmol/L antes del tratamiento.
- 10 2. Una composición para su uso en el tratamiento de la infertilidad, comprendiendo la composición de 10 a 12 µg de hormona estimuladora del folículo (FSH), donde la composición es para la administración a un paciente que se identifica que tiene Asn/Asn variante o Asn/Ser variante en la posición 680 del receptor de FSH antes del tratamiento y se identifica que tiene un nivel de AMH en suero < 15 pmol/L antes del tratamiento.
- 15 3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la composición es para la administración a diario.
- 20 4. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la composición es para la administración de FSH empezando el día uno del tratamiento y continuando durante de seis a dieciséis días.
- 25 5. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la FSH es FSH recombinante.
- 30 6. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la FSH es FSH recombinante que incluye sialilación α2,3 y α2,6.
7. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la FSH recombinante incluye sialilación α2,3 y α2,6, donde de un 1 a un 99% de la sialilación total es sialilación α2,6 y de un 99% a un 1% de la sialilación total es sialilación α2,3.
8. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la FSH recombinante incluye sialilación α2,3 y α2,6, donde de un 1 a un 50% de la sialilación total es sialilación α2,6 y de un 50% a un 99% de la sialilación total es sialilación α2,3.

Figuras

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

Figura 1. Vector de expresión de FSH

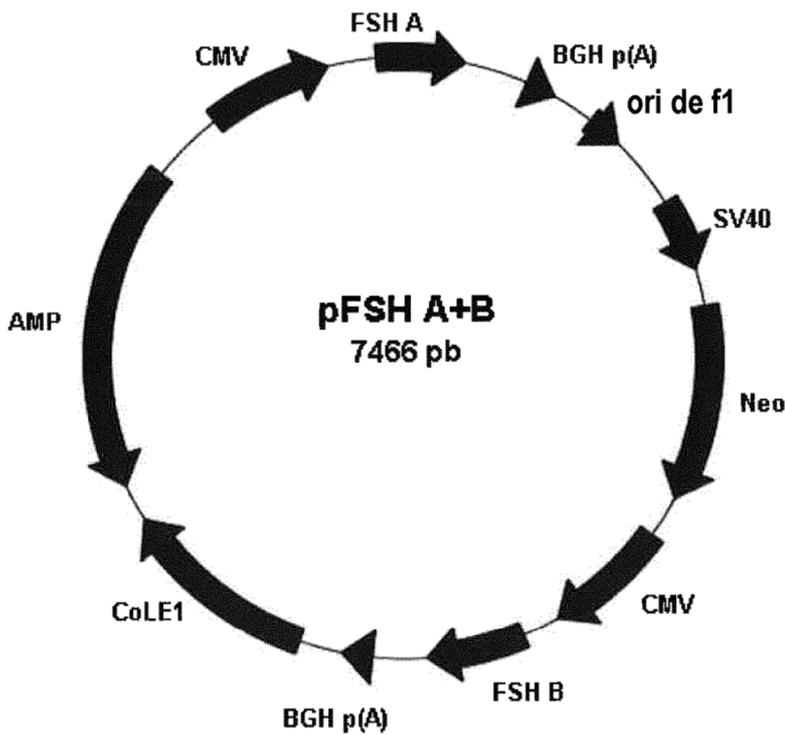


Figura 2. Vector de expresión de α 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4)

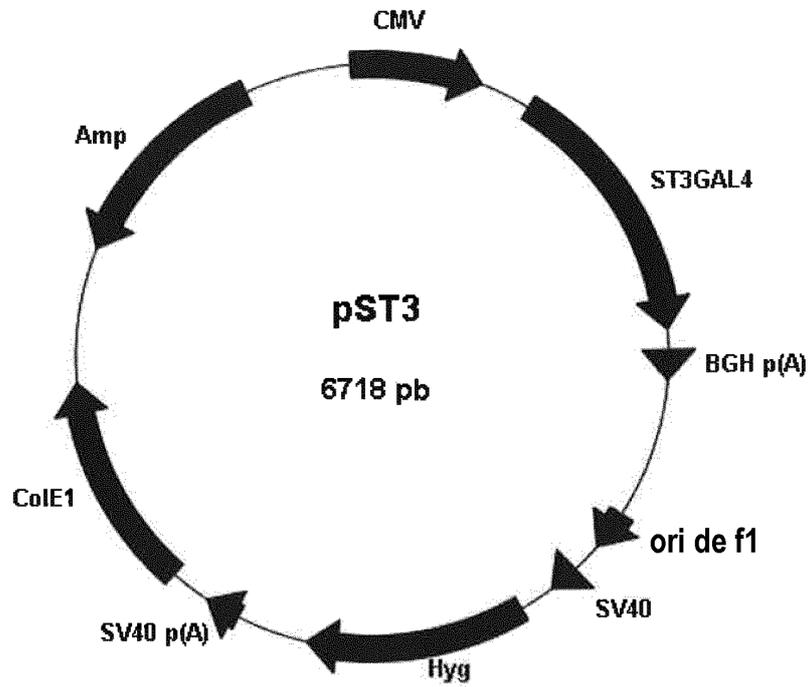


Figura 3. Vector de expresión de α 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1)

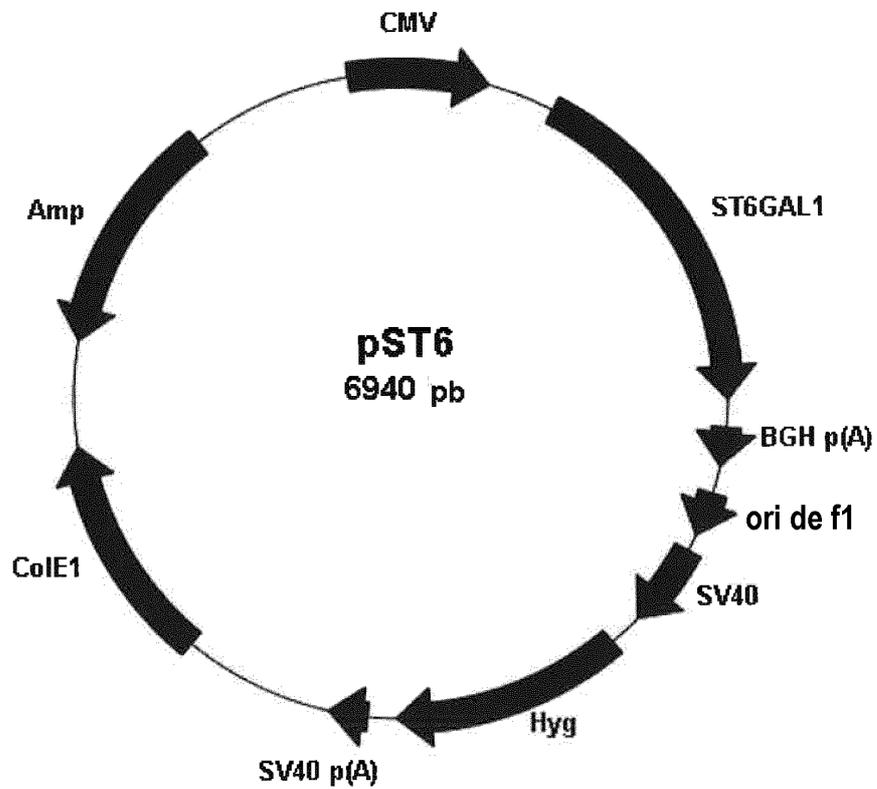


Figura. 4

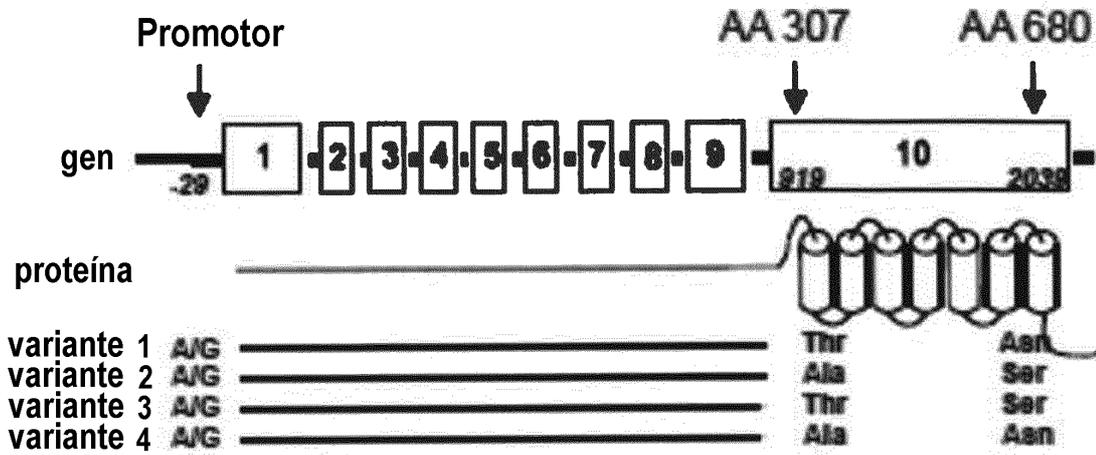


Figura. 5

Frecuencia de SNP de FSH-R (-29 307 680)

- A-Thr-Asn/A-Thr-Asn 3%**
- A-Thr-Asn/A-Ala-Ser 3%**
- A-Ala-Ser/A-Ala-Ser 1%**
- A-Thr-Asn/G-Thr-Asn 10%**
- A-Thr-Asn/G-Ala-Ser 20%**
- A-Ala-Ser/G-Ala-Ser 5%**
- G-Thr-Asn/G-Thr-Asn 16%**
- G-Thr-Asn/G-Ala-Ser 30%**
- G-Ala-Ser/G-Ala-Ser 11%**

Figura. 6

Exposición a IMP
 Datos: FE 999049 000009 / Conjunto de análisis completo / Estrato de nivel bajo de AMH
 Estrato: Nivel bajo de AMH

	SER/SER	SER/ASN	ASN/ASN	Valores de p*b	
				Valor de p*a	Grupo de dosis
Conjunto de análisis completo	16	58	39		
Duración del tratamiento con gonadotropina (días)				0.057	0.086
N	16	58	39		0.026
Media	9.31	8.21	8.28		
DE	1.89	1.69	2.08		
Mediana	9	8	8		
Mínimo	6	5	1		
Máximo	13	12	14		

*a: El valor de p se calcula a partir de la prueba de Kruskal-Wallis que compara los grupos de SNP.
 *b: Los valores de p se calculan a partir de un modelo lineal (Duración de IMP o dosis total de IMP = Dosis + Grupo de SNP).

FE999049/ART/000009/08APR2015-BEMK/STAT_MISC/SNP/EXP_IMP_SNP.SAS

Figura. 7

Duración de la estimulación: Modelo lineal que incluye la dosis del tratamiento y SNP como factores
 Datos: FE 999049 000009 / Conjunto de análisis completo / Estrato de nivel bajo de AMH

Estrato de AMH	Factor	Nivel	Medias de MC	EE	95% de IC			Valor de p
					Límite inferior	Límite superior		
Nivel bajo (5.0-14.9 pmol/L) de AMH	DOSIS							
	SNP	ASN/ASN	8.13	0.30	7.54	8.72	0.086	
	SNP	SER/ASN	8.26	0.24	7.78	8.74	0.026	
		SER/SER	9.59	0.47	8.66	10.51		

EE = Error estándar de la estimación
 IC = Intervalo de confianza
 Valor de p basado en la prueba F

S:\FCDB\FE999049\ART\000009\Report\Stat_Misc\SNP\EXP_IMP_SNP_II.sas bemk/08APR15