



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 989 729**

⑮ Int. Cl.:

**A61P 5/06** (2006.01)  
**A61P 5/10** (2006.01)  
**A61P 15/00** (2006.01)  
**A61P 15/08** (2006.01)  
**C07K 14/59** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 16179121 (5)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 3098234**

⑮ Título: **FSH recombinante que incluye sialilación en alfa 2,3 y alfa 2,6**

⑯ Prioridad:

**16.04.2008 US 45424 P**  
**25.04.2008 EP 08251528**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2024**

⑯ Titular/es:

**FERRING B.V. (100.0%)**  
Polaris Avenue 144  
2132 JX Hoofddorp, NL

⑯ Inventor/es:

**COTTINGHAM, IAN;**  
**PLAKSIN, DANIEL y**  
**WHITE, RICHARD, BOYD**

⑯ Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones:

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

**ES 2 989 729 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

FSH recombinante que incluye sialilación en alfa 2,3 y alfa 2,6

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

10 Las gonadotropinas son un grupo de hormonas glucoproteicas heterodiméricas que regulan la actividad gonadal en los machos y las hembras. Incluyen la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG).

15 La FSH es secretada naturalmente por el lóbulo anterior de la hipófisis y funciona soportando el desarrollo folicular y la ovulación. La FSH comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos, también común a las otras hormonas glucoproteicas LH y CG, y una subunidad beta de 111 aminoácidos única para la FSH que confiere la especificidad biológica de la hormona (Pierce y Parsons, 1981). Cada subunidad se modifica tradicionalmente mediante la adición de residuos de hidratos de carbono complejos. Ambas subunidades llevan 2 sitios para la unión de glucanos unidos en N, la subunidad alfa en los aminoácidos 52 y 78 y la subunidad beta en los residuos de aminoácidos 7 y 24 (Rathnam y Saxena, 1975, Saxena y Rathnam, 1976). Por lo tanto, la FSH está glucosilada en aproximadamente el 30 % en la masa (Dias y Van Roey, 2001. Fox *et al.* 2001).

20 Se ha usado FSH purificada de orina humana posmenopáusica durante muchos años en el tratamiento de la infertilidad; tanto para promover la ovulación en la reproducción natural como para proporcionar ovocitos para las tecnologías de reproducción asistida. Dos versiones recombinantes de FSH, Gonal-F (Serono) y Puregon (Organon) estuvieron disponibles a mediados de los años 90. Estas dos se expresan en células de ovario de hámster chino (CHO) (Howles, 1996).

25 Existe una heterogeneidad considerable asociada a los preparados de FSH que se refiere a diferencias en las cantidades de las diversas isoformas presentes. Las isoformas de FSH individuales presentan secuencias de aminoácidos idénticas, pero se diferencian en el grado al que se modifican postraduccionalmente; isoformas particulares se caracterizan por heterogeneidad de las estructuras ramificadas de hidrato de carbono y diferentes cantidades de incorporación de ácido siálico (un azúcar terminal), ambos de los cuales parecen influir en la bioactividad de la isoforma específica.

30 35 La glucosilación de FSH natural es muy compleja. Los glucanos en FSH de hipófisis de origen natural pueden contener una amplia variedad de estructuras que pueden incluir combinaciones de glucanos bi-, tri- y tetra-antenarios (Pierce y Parsons, 1981. Ryan *et al.*, 1987 Baenziger y Green, 1988). Los glucanos pueden llevar modificaciones adicionales: fucosilación del núcleo, glucosamina bisecante, 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 glucanos en los sitios de glucosilación individuales. Se ha descubierto un nivel comparable de complejidad de glucanos en FSH derivada del suero de individuos y de la orina de mujeres posmenopáusicas (Wide *et al.*, 2007).

40 45 50 La glucosilación de productos recombinantes de FSH refleja el intervalo de glucosil-transferasas presentes en la estirpe de células hospedadoras. Los productos de FSHr existentes derivan de células de ovario de hámster chino (células CHO) manipuladas. El intervalo de modificaciones del glucano en FSHr derivada de CHO es más limitado que el encontrado en los productos naturales, derivados de extractos de hipófisis u orina. Los ejemplos de heterogeneidad de glucanos reducidos encontrada en la FSHr derivada de CHO incluyen una ausencia de glucosamina bisecante y un contenido reducido de fucosilación del núcleo y extensiones de acetil-lactosamina (Hard *et al.*, 1990). Además, las células CHO sólo son capaces de añadir ácido siálico usando el enlace  $\alpha$ 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Esto es diferente de la FSH producida naturalmente, que contiene glucanos con una mezcla de ácido siálico unido en  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6.

55 60 Se ha demostrado que un preparado de FSH recombinante (Organon) se diferencia en las cantidades de FSH con un punto isoeléctrico (pI) inferior a 4 (consideradas las isoformas ácidas) cuando se compara con FSH de hipófisis, suero u orina posmenopáusica (Ulloa-Aguirre *et al.* 1995). La cantidad de isoformas ácidas en los preparados de orina fue mucho mayor en comparación con los productos recombinantes, Gonal-f (Serono) y Puregon (Organon) (Andersen *et al.* 2004). Esto debe reflejar un menor contenido molar de ácido siálico en la FSHr, puesto que el contenido de glucano negativamente cargado modificado con sulfato es bajo en FSH. El menor contenido de ácido siálico, en comparación con FSH natural, es una característica de ambos productos de FSH disponibles comercialmente y, por lo tanto, debe reflejar una limitación en el proceso de fabricación (Bassett y Driebergen, 2005).

65 Existe un conjunto importante de trabajo científico que analiza e intenta explicar las variaciones en la glucosilación de FSH entre individuos y los cambios durante el transcurso de un ciclo de ovulación. Una de las principales discusiones se refiere a la observación de que ambos de la concentración de FSH y el contenido de ácido siálico disminuyen durante la fase preovulatoria del ciclo. La disminución del contenido de ácido siálico da como resultado

una FSH más básica que tanto es eliminada más rápidamente como, al menos *in vitro*, es más potente en el receptor diana (Zambrano et al. 1996). La cuestión sobre la relevancia biológica de estos cambios y cómo pueden estar implicados en la selección del folículo dominante sigue sin resolverse (revisado por Ulloa-Aguirre, 2003).

- 5 El tiempo de vida circulatorio de FSH se ha documentado para materiales de una variedad de fuentes. Algunos de estos materiales se han fraccionado basándose en la carga molecular global, caracterizada por su *pl*, en la que más ácido equivale a una carga negativa más alta. Como se ha expuesto anteriormente, el principal contribuyente a la carga molecular general es el contenido siálico total de cada molécula de FSH. Por ejemplo, FSHr (Organon) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 8 moles/mol, mientras que la FSH derivada de orina tiene un mayor contenido de ácido siálico (de Leeuw et al. 1996). Las tasas de eliminación plasmática correspondientes en la rata son 0,34 y 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre et al. 2003). En otro ejemplo donde una muestra de FSH recombinante se dividió en fracciones de *pl* alto y bajo, disminuyó la potencia *in vivo* de la fracción de *pl* más alto (menor contenido de ácido siálico) y tuvo una semivida plasmática más corta (D'Antonio et al. 1999). También se ha informado que la FSH más básica que circula durante las etapas posteriores del ciclo de ovulación es debida a la regulación por disminución de la  $\alpha$ 2,3 sialil-transferasa en el lóbulo anterior de la hipófisis, que es causada por el aumento de los niveles de estradiol (Damian-Matsumara et al. 1999. Ulloa-Aguirre et al. 2001). No se han informado los resultados para la  $\alpha$ 2,6 sialil-transferasa.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El contenido de ácido siálico total de FSH y FSHr no es directamente comparable, puesto que los ácidos siálicos se unen comúnmente en dos formas. Las FSH hipofisarias/ séricas/ urinarias contienen ácido siálico tanto unido en  $\alpha$ 2,3 como en  $\alpha$ 2,6, con una predominancia del primero. Sin embargo, los recombinantes derivados de células CHO solo contienen  $\alpha$ 2,3 (Kagawa et al. 1988, Takeuchi et al. 1988, Svensson et al., 1990). Esta es otra diferencia entre los productos recombinantes naturales y los actuales, además del menor contenido de ácido siálico global de los últimos.
- Las células CHO se usan comúnmente para la producción de proteínas recombinantes humanas farmacéuticas. El análisis estructural ha identificado que el ácido siálico se une exclusivamente por un enlace  $\alpha$ 2,3. (Kagawa et al, 1988, Takeuchi et al, 1988, Svensson et al., 1990). Muchas glucoproteínas humanas contienen una mezcla de tanto enlace  $\alpha$ 2,3 como  $\alpha$ 2,6. Por lo tanto, las proteínas recombinantes expresadas usando el sistema CHO se diferenciarán de sus homólogos naturales en el tipo de enlaces del ácido siálico terminal. Esto es una consideración importante en la producción de productos biológicos para uso farmacéutico, puesto que los restos de hidrato de carbono pueden contribuir a los atributos farmacológicos de la molécula.
- Es conveniente tener un producto de FSHr que replique o imite más estrechamente el perfil fisiológico y farmacocinético del producto producido a partir de la orina humana. Es conveniente tener un producto de FSHr que tenga propiedad o propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con el producto recombinante conocido.
- Según la presente invención, se proporciona hormona foliculoestimulante recombinante ("FSHr" o "FSHrec") que incluye sialilación en  $\alpha$ 2,3 y sialilación en  $\alpha$ 2,6, en donde del 10 % al 20 % de la sialilación total es sialilación en  $\alpha$ 2,6, que incluye ácidos siálicos unidos en  $\alpha$ 2,6 (sialilación en  $\alpha$ 2,6) proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena, y en donde la estirpe celular humana ha sido manipulada para expresar una  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa. La FSHr (o preparado de FSHr) de la invención puede tener 5 % o menos de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha$ 2,8, por ejemplo 0,1-4 % de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha$ 2,8. La FSHr (o preparado de FSHr) según la invención puede tener un contenido de ácido siálico [expresado en términos de una relación de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 6 moles/mol o mayor, por ejemplo, de entre 6 moles/mol y 15 moles/mol.
- Los solicitantes han descubierto que el tipo de enlace del ácido siálico,  $\alpha$ 2,3 o  $\alpha$ 2,6, pueden tener una gran influencia sobre la eliminación biológica de FSH. Estirpes celulares humanas, a diferencia de estirpes celulares de CHO, pueden expresar FSH recombinante con ácidos siálicos unidos por tanto enlaces  $\alpha$ 2,3 como  $\alpha$ 2,6. En el Ejemplo 4, se produjo una estirpe celular de FSH recombinante que expresó glucanos que contenían FSH con bajos niveles de ácido siálico tanto unido en  $\alpha$ 2,3 como en  $\alpha$ 2,6 (Figura 6). Este material básico, con contenido limitado de ácido siálico (Figura 4), se eliminó muy rápidamente de la circulación en la rata como era de predecir (Figura 7). La estirpe celular se sometió entonces a una segunda etapa de manipulación con la adición del gen que codificaba la  $\alpha$ 2,6-sialil-transferasa (Ejemplo 5). La FSHr resultante se sialiló altamente, mostrando un contenido de ácido siálico y distribución de *pl* comparable al de la FSH urinaria (Figura 5). Sin embargo, el material se eliminó muy rápidamente de la circulación de las ratas a una tasa comparable al material original que tenía bajo contenido de ácido siálico (Figura 8). Esto fue una observación inesperada, puesto que se sabe que una proporción de ácido siálico en la FSH natural y biológicamente activa está unida en  $\alpha$ 2,6. Se descubrió que la eliminación de FSHr sialilada en  $\alpha$ 2,6 estaba mediada por el receptor de asialoglucoproteína (ASGP) encontrado en el hígado (Ejemplo 9). Esto se demostró por el bloqueo transitorio de los receptores de ASGP usando un exceso de otro sustrato para el receptor. Con el receptor bloqueado por la asialofetúina, se restauró la eliminación esperada para el material altamente sialilado (Figura 9). Esto se mantuvo durante varias horas hasta que se superó el bloqueo y la FSHr altamente sialilada unida en  $\alpha$ 2,6 reanudó su rápida eliminación.

La FSH recombinante con una mezcla de ácido siálico unido tanto en  $\alpha$ 2,3 como en  $\alpha$ 2,6 se produjo manipulando una estirpe celular humana para expresar tanto FSHr como  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (Ejemplo 4 y 5). El producto expresado es altamente ácido y lleva una mezcla de ácidos siálicos unidos tanto en  $\alpha$ 2,3 como en  $\alpha$ 2,6; los últimos proporcionaron la actividad de sialil-transferasa endógena (Figura 6). Esto tiene dos ventajas con respecto a la

5 FSHr 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 mucho a la FSH natural. Es probable que esto sea más biológicamente apropiado en comparación con los productos recombinantes derivados de células CHO que sólo han producido ácido siálico unido en  $\alpha$ 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990) y tienen el contenido de ácido siálico reducido (Ulloa-Aguirre *et al.* 1995., Andersen *et al.* 2004).

10 Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que la FSHr de la invención puede replicar o imitar más estrechamente el perfil fisiológico y farmacocinético del producto urinario humano natural que otros productos recombinantes. En otras palabras, la FSHr de la invención puede estar más próxima a la FSH "natural". Esto puede 15 tener ventajas significativas referentes a la dosis, etc. Además, un producto más "natural" o más "humano" puede ser más deseable para el paciente, que puede desear la terapia, aunque en un sentido artificial, que sea lo más "natural" posible. Puede haber otras ventajas (por ejemplo, ventajas farmacocinéticas) en un producto recombinante que tiene una estructura de hidrato de carbono (por ejemplo, glucano) que es más próxima a la FSH natural (por ejemplo, urinaria humana) que otros productos recombinantes.

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

25 Según la presente invención, se proporciona hormona foliculostimulante recombinante ("FSHr" o "FSHrec") (y/o un preparado de FSH recombinante) que incluye sialilación en  $\alpha$ 2,3 y sialilación en  $\alpha$ 2,6, en donde del 10 % al 30 20 % de la sialilación total es sialilación en  $\alpha$ 2,6, que incluye ácidos siálicos unidos en  $\alpha$ 2,6 (sialilación en  $\alpha$ 2,6) proporcionados por actividad de sialil transferasa endógena, y en donde la estirpe celular humana ha sido manipulada para expresar una  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa. La FSHr o el preparado de FSHr puede incluir además opcionalmente sialilación en  $\alpha$ 2,8.

35 En el presente documento, el término "preparado de FSH recombinante" incluye un preparado para, por ejemplo, uso farmacéutico que incluye FSH recombinante. En realizaciones de la invención, la FSHr puede estar presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas.

40 La FSHr (o preparado de FSHr) según la invención puede tener un contenido de ácido siálico [expresado en términos de una relación entre moles de ácido siálico y moles de proteína] de 6 moles/mol o mayor (Ejemplo 8), por ejemplo, entre 6 moles/mol y 15 moles/mol, por ejemplo, entre 8 moles/mol y 14 moles/mol, por ejemplo, entre 10 moles/mol y 14 moles/mol, por ejemplo, entre 11 moles/mol y 14 moles/mol, por ejemplo, entre 12 moles/mol y 14 moles/mol, por ejemplo, entre 12 moles/mol y 13 moles/mol. La FSHr de la invención se puede producir o 45 expresar en una estirpe celular humana.

45 La FSHr (o preparado de FSHr) según la invención puede tener que el 80 % o más de la sialilación total es sialilación en  $\alpha$ 2,3. La FSHr (o preparado de FSHr) de la invención puede tener 5 % o menos de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha$ 2,8. Por ejemplo, 2,5 % o menos de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha$ 2,8. La FSHr (o preparado de FSHr) puede incluir sialilación en  $\alpha$ 2,8 en una cantidad que es desde el 0,1 hasta el 4 % de la sialilación total, por ejemplo desde el 0,5 hasta el 3 % de la sialilación total, por ejemplo desde el 0,5 hasta el 2,5 % de la sialilación total. Por sialilación se indica la cantidad de residuos siálicos presentes en las estructuras de hidrato de carbono de FSH. Sialilación en  $\alpha$ 2,3 significa la sialilación en la posición 2,3 (como se conoce bien en la técnica) y sialilación en  $\alpha$ 2,6 en la posición 2,6 (también bien conocida en la técnica). Así, "% de sialilación total 50 puede ser sialilación en  $\alpha$ 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. El término "% de sialilación total que es sialilación en  $\alpha$ 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.

55 La FSHr (o preparado de FSHr) según la invención puede tener un contenido de ácido siálico (cantidad de sialilación por molécula de FSH) (basado en la masa de proteína, en vez de la masa de proteína más hidrato de carbono) del 6 % o más (por ejemplo, entre 6 % y 15 %, por ejemplo, entre 7 % y 13 %, por ejemplo, entre 8 % y 12 %, por ejemplo, entre 11 % y 15 %, por ejemplo, entre 12 % y 14 %) en masa.

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

65 La FSHr de la invención se puede producir o expresar en una estirpe celular humana. Esto puede simplificar (y hacer más eficiente) el método de producción debido a que la manipulación y el control de, por ejemplo, el medio de crecimiento celular para retener la sialilación puede ser menos crítico que con los procesos conocidos. El

método también puede ser más eficiente debido a que hay menos FSHr básica producida que en la producción de productos de FSHr conocidos; se produce FSHr más ácida y la separación/retirada de FSH básica es menos problemática. La FSHr se puede producir o expresar en una estirpe celular Per.C6, una estirpe celular derivada de Per.C6 o una estirpe celular Per.C6 modificada. La estirpe celular se puede modificar usando  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa.

5 La estirpe celular se puede modificar usando  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa. Alternativamente o además, la FSHr puede incluir ácidos siálicos unidos en  $\alpha$ 2,6 (sialilación en  $\alpha$ 2,6) proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena [de la estirpe celular].

10 La FSHr incluye ácidos siálicos unidos en  $\alpha$ 2,6 (sialilación en  $\alpha$ 2,6) proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena.

Según la presente invención, en un aspecto se proporciona además un método de producción de FSHr y/o un preparado de FSHr como se describe en el presente documento (según aspectos de la invención) que comprende la etapa de producir o expresar la FSHr en una estirpe celular humana, por ejemplo, una estirpe celular Per.C6, una estirpe celular derivada de Per.C6 o una estirpe celular Per.C6 modificada, por ejemplo, una estirpe celular que se ha modificado usando  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa.

20 La estructura de FSHr contiene restos glucano. La ramificación puede ocurrir con el resultado de que el glucano puede tener 1, 2, 3, 4 o más residuos de azúcar terminales o "antenas", como se conoce bien en la técnica. La FSHr de la invención puede tener glucanos con presencia de sialilación en estructuras mono-antenarias y/o di-antenarias y/o tri-antenarias y/o tetra-antenarias. La FSHr puede incluir preferentemente estructuras de glucano mono-sialilado, di-sialilado, tri-sialilado y tetra-sialilado con cantidades relativas del siguiente modo: 9 - 15 % de mono-sialilado; 27 - 30 % de di-sialilado; 30 - 36 % de tri-sialilado y 25 - 29 % de tetra-sialilado (por ejemplo, como se muestra por el análisis WAX de glucanos cargados, como se explica en el Ejemplo 8 c).

25 La FSHr se produce (por ejemplo, expresa) en una estirpe celular humana. La FSHr incluye sialilación en  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6. La FSHr se puede producir o expresar en una estirpe celular Per.C6, una estirpe celular derivada de Per.C6 o una estirpe celular Per.C6 modificada. La estirpe celular se puede modificar usando  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa. La estirpe celular se puede modificar usando  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa. Alternativamente o además, la FSHr puede incluir ácidos siálicos unidos en  $\alpha$ 2,6 (sialilación en  $\alpha$ 2,6) proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena [de la estirpe celular]. La FSHr (o preparado de FSHr) puede tener 80 % o más de sialilación total que es sialilación en  $\alpha$ 2,3. La FSHr (o preparado de FSHr) de la invención puede tener 20 % o menos de sialilación total que es sialilación en  $\alpha$ 2,6. La FSHr (o preparado de FSHr) de la invención puede tener 5 % o menos de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha$ 2,8, por ejemplo 0,5-4 % de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha$ 2,8. La FSHr puede tener un contenido de ácido siálico [expresado en términos de una relación entre moles de ácido siálico y moles de proteína] de 6 moles/mol o mayor, por ejemplo entre 6 moles/mol y 15 moles/mol.

30 Según la presente invención, en un aspecto se proporciona además una composición farmacéutica que comprende FSHr que incluye sialilación en  $\alpha$ 2,3 y sialilación en  $\alpha$ 2,6 como se expone anteriormente. La composición farmacéutica puede comprender además CGh y/o LH.

35 La CGh se puede obtener mediante cualquier medio conocido en la técnica. La CGh, como se usa en el presente documento, incluye CGh derivada de humano y recombinante. La CGh derivada de humano se puede purificar de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina y placenta) por cualquier método conocido en la técnica. Los métodos de expresión y purificación de CGh recombinante son bien conocidos en la técnica.

40 La LH puede obtenerse por cualquier medio conocido en la técnica. La LH, como se usa en el presente documento, incluye LH derivada de humano y recombinante. La LH derivada de humano se pueden purificar de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina) por cualquier método conocido en la técnica. Los métodos de expresión y purificación de LH recombinante son conocidos en la técnica.

45 La composición farmacéutica puede ser para el tratamiento de la infertilidad, por ejemplo, para su uso en, por ejemplo, tecnologías de reproducción asistida (ART), inducción de la ovulación o inseminación intrauterina (IIU). La composición farmacéutica se puede usar, por ejemplo, en indicaciones médicas donde se usan preparados de FSH conocidos. La presente invención también proporciona el uso de FSHr y/o un preparado de FSHr descrito en el presente documento (según aspectos de la invención) para el tratamiento de la infertilidad. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo, oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parche), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, pomadas o gotas) o como un espray yugal o nasal. Una composición típica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como disolución acuosa, excipientes no tóxicos, que incluyen sales y conservantes, tampones y similares, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimoquinta edición (Matt Publishing Company, 1975), en las páginas 1405 a 1412 y 1461 - 87, y the National Formulary XIV, decimocuarta edición (American Pharmaceutical Association, 1975), entre otros.

50

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

- 5 Las composiciones de la presente invención también pueden contener aditivos, tales como, pero no se limitan a, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Se pueden incluir agentes antibacterianos y antifúngicos para prevenir el crecimiento de microbios e incluyen, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Además, puede desearse incluir agentes isotónicos, tales como 10 azúcares, cloruro sódico y similares.
- 15 En algunos casos, para efectuar la acción prolongada, es conveniente ralentizar la absorción de FSH (y otros principios activos, si están presentes) de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede llevar a cabo usando una suspensión líquida de material cristalino o amorfio con poca solubilidad en agua. La tasa de absorción de FSH depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retarda de una forma de combinación de FSH administrada por vía parenteral se lleva a cabo disolviendo o suspendiendo la combinación de FSH en un vehículo de aceite.
- 20 Se pueden preparar formas de liberación prolongada inyectables formando matrices microencapsuladas de FSH (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables, tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación entre FSH y polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación de FSH se puede controlar. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polivinilpirrolidona, poli(ortoésteres), poli(anhídridos), etc. También se preparan formulaciones inyectables de liberación prolongada 25 que atrapan la FSH en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos del cuerpo.
- 30 Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de 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 uso. Las formulaciones inyectables se pueden suministrar en cualquier recipiente adecuado, por ejemplo, vial, jeringa precargada, cartuchos de inyección y similares.
- 35 Las formulaciones inyectables se pueden suministrar como un producto que tiene composiciones farmacéuticas que contienen FSH (opcionalmente con hCG, LH, etc.). Si existe más de un principio activo (es decir, FSH y, por ejemplo, hCG o LH), estos pueden ser adecuados para administración por separado o juntos. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto se puede suministrar en cualquier envase apropiado. Por ejemplo, un producto puede contener varias jeringas precargadas que contienen FSH, hCG, o una combinación de tanto FSH como hCG, las jeringas envasadas en un envase alveolado u otro medio para mantener la esterilidad. Un producto puede contener opcionalmente instrucciones para usar las formulaciones de FSH y hCG.
- 40 45 50 55 60
- 40 El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según práctica rutinaria en este campo. Véase GOODMAN y GILMAN, THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7.<sup>a</sup> ed. En una realización preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para administración parenteral. Métodos generales para la preparación de las formulaciones parenterales se conocen en la técnica y se describen en REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, arriba, en las páginas 780-820. Las composiciones parenterales se pueden suministrar en formulación líquida o como un sólido que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de la administración. En una realización especialmente preferida, las composiciones parenterales se suministran en forma unitaria de administración para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis.
- 50 **Descripción detallada de la invención**
- 55 La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos y a los dibujos adjuntos en los que:
- 55 La Figura 1 muestra un mapa de plásmidos del vector de expresión pFSHalpha/beta;
- 60 La Figura 2 muestra el vector de expresión de α2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4);
- 65 La Figura 3 muestra el vector de expresión de α2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1);
- 70 La Figura 4 muestra el isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan establemente FSH;

la Figura 5 muestra un ejemplo de clones analizados por isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan establemente FSH después de la manipulación con  $\alpha$ 2,3- o  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa;

- 5 la Figura 6 muestra el análisis de enlaces de ácido siálico de Per.C6-FSH;
- 10 la Figura 7 muestra las tasas de eliminación metabólica (MCR) de muestras de Per.C6-FSH;
- 10 la Figura 8 muestra MCR de muestras de Per.C6-FSH manipuladas con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa;
- 15 la Figura 9 muestra MCR de muestras de Per.C6-FSH manipuladas con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa;
- la Figura 10 muestra MCR de muestras de Per.C6-FSH manipuladas con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa;
- 15 la Figura 11 muestra el aumento de peso del ovario por clones Per.C6-FSHr de Per.C6-FSHr parental, según el método de Steelman y Pohley (1953);
- 20 la Figura 12 muestra el aumento de peso del ovario por clones Per.C6-FSHr de Per.C6-FSHr manipulado (con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa); y
- 20 la Figura 13 muestra el aumento de peso del ovario por clones Per.C6-FSHr de Per.C6-FSHr manipulado (con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa).

#### Selección de secuencias

##### FSH humana

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

La región codificante del gen para el polipéptido beta de FSH se utilizó de acuerdo con Keene *et al* (1989). La secuencia se registra en el banco como NM\_000510, y en el momento de la construcción no había otras variantes de esta secuencia de proteínas. La secuencia se denomina en el presente documento como SEQ ID 2

##### Sialiltransferasa

$\alpha$ 2,3-Sialiltransferasa - La región codificante del gen para beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 ( $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa, ST3GAL4) se usó según Kitagawa y Paulson (1994). La secuencia está depositada como L23767 y se denomina en el presente documento como SEQ ID 3.

$\alpha$ 2,6-Sialiltransferasa - La región codificante del gen para beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 ( $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa, ST6GAL1) se usó según Grundmann *et al.* (1990). La secuencia está depositada como NM\_003032 y se denomina en el presente documento como SEQ ID 4.

#### EJEMPLOS

##### Ejemplo 1: Construcción del vector de expresión de FSH

La secuencia codificante del polipéptido FSH alfa (AH007338, SEQ ID 1) y del polipéptido FSH beta (NM\_003032, SEQ ID 2) se amplificó por PCR usando las combinaciones de cebadores FSHa-fw y FSHa-rev y FSHb-fw y FSHb-rec, respectivamente.

FSHa-fw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGGATTACTACAGAAAAATATGC-3'

FSHa-rev 5'-GGATGGCTAGCTTAAGATTGTGATAATAAC-3'

FSHb-fw 5'-CCAGGCGGCCACCATGAAGACACTCCAGTTTTC-3'

FSHb-rev 5'-CCGGGTTAACCTTATTCTTCATTCACCAAAGG-3'

El ADN de FSH beta amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Ascl* y *Hpal* y se insertó en los sitios *Ascl* y *Hpal* en el vector de expresión de mamífero dirigido por el CMV que llevaba un marcador de selección de neomicina. Similarmente, el ADN de FSH alfa se digirió con *BamHI* y *Nhel* y se insertó en los sitios *BamHI* y *Nhel* en el vector de expresión que ya contenía el ADN del polipéptido FSH beta.

El ADN del vector se utilizó para transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *E.coli*. Se recogieron sesenta colonias para la amplificación y cincuenta y siete contuvieron el vector que contenía tanto FSH alfa como beta. Veinte de estas se seleccionaron para secuenciación y todas contuvieron las secuencias correctas según SEQ ID 1 y SEQ ID 2. El plásmido pFSH A+B#17 se seleccionó para la transfección (Figura 1).

5 **Ejemplo 2 Construcción del vector de expresión de ST3**

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

10 2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'  
2,3STrev 5'-TTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTG-3'

15 El ADN de ST3 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Af*II y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Af*II en el vector de expresión de mamífero dirigido por el CMV que llevaba un marcador de resistencia a higromicina. El vector se amplificó como se describe previamente y se secuenció. El clon pST3#1 (Figura 2) contuvo la secuencia correcta según SEQ ID 3 y se seleccionó para la transfección.

20 **Ejemplo 3 Construcción del vector de expresión de ST6**

La secuencia codificante de beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (ST6, NM\_003032, SEQ ID 4) se amplificó por PCR usando la combinación de cebadores 2,6STfw y 2,6STrev.

25 2,6STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3'  
2,6STrev 5'-TTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3'

30 El ADN de ST6 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Af*II y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Af*II en el vector de expresión de mamífero accionado por el CMV que llevaba un marcador de resistencia a higromicina. El vector se amplificó como se describe previamente y se secuenció. El clon pST6#11 (Figura 3) contuvo la secuencia correcta según SEQ ID 4 y se seleccionó para la transfección.

35 **Ejemplo 4 Expresión estable de pFSH A+B en células PER.C6. Transfección, aislamiento y cribado de clones.**

Se generaron clones de Per.C6 que produjeron FSH expresando ambas cadenas de polipéptidos de FSH de un solo plásmido (véase el Ejemplo 1).

40 Para obtener clones estables, un agente de transfección basado en liposomas con la construcción pFSH A+B. Se seleccionaron clones estables en VPRO complementado con 10 % de FCS y que contenía G418. Tres semanas después de la transfección, los clones resistentes a G418 crecieron. Se seleccionó un total de 250 clones para el aislamiento. Los clones aislados se cultivaron en medio de selección hasta el 70-80 % de confluencia. Los sobrenadantes se ensayaron para el contenido de proteína FSH usando un ELISA selectivo de FSH y actividad farmacológica en el receptor de FSH en la estirpe celular clonada, usando un ensayo de acumulación de AMPc. Los clones (98) que expresan la proteína funcional progresaron para la expansión de cultivo a 24 pocillos, 6 pocillos y matraces T80.

50 Se iniciaron estudios para determinar la productividad y calidad del material de siete clones en matraces T80 para generar material suficiente. Las células se cultivaron en medios complementados como se describió previamente durante 7 días y se recogió el sobrenadante. La productividad se determinó utilizando el ELISA selectivo para FSH. Se determinó el perfil isoelectrónico del material (Ejemplo 6). Las muestras representativas se muestran en la Figura 4. La información del IEF se usó para seleccionar clones para el análisis de la tasa de eliminación metabólica (Ejemplo 9). Se seleccionaron los clones (005, 104, 179, 223, 144) con productividad y calidad suficientes para la manipulación con sialiltransferasa.

55 **Ejemplo 5 El nivel de sialilación aumenta en células que expresan en exceso la  $\alpha$ 2,3- o  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa. Expresión estable de pST3 o pST6 en células PER.C6 que expresan FSH; transfección, aislamiento y cribado de clones.**

60 Se generaron clones de Per.C6 que producían FSH altamente sialilada expresando  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa o  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa a partir de plásmidos separados (véanse los Ejemplos 2 y 3) en células Per.C6 que ya expresaban ambas cadenas de polipéptidos de FSH (véase el Ejemplo 4). Se seleccionaron cuatro clones producidos a partir de células PER.C6® como se explica en el Ejemplo 4 para sus características, que incluyen productividad, buen perfil de crecimiento, producción de proteína funcional y FSH producida que incluyó cierta sialilación.

Se generaron clones estables como se describe previamente en el Ejemplo 4. Se aislaron, expandieron y ensayaron un total de 202 clones del programa de la  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa y 210 clones del programa de la  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa. El número de clones final para el estudio de  $\alpha$ 2,3 era 12 y 30 para el estudio de  $\alpha$ 2,6.

5 Los clones de  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa se adaptaron a las condiciones de medio sin suero y suspensión.

Como antes, los clones se ensayaron usando un ELISA selectivo de FSH, respuesta funcional en una estirpe celular de receptor de FSH, IEF (Ejemplo 6), tasa de eliminación metabólica (Ejemplo 9) y análisis de Steelman Pohley (Ejemplo 10). Los resultados se compararon con una FSH recombinante disponible comercialmente (Gonal-f, Serono) y las estirpes celulares parentales de FSH-Per.C6. Las muestras representativas se muestran en la Figura 5. Algunos clones no mostraron un aumento en la sialilación, pero se puede observar que la FSH producida por la mayoría de los clones tiene sialilación significativamente mejorada (es decir, en promedio más isoformas de FSH con elevados números de ácidos siálicos) en comparación con FSH expresada sin  $\alpha$ 2,3- o  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa.

10 15 En conclusión, la expresión de FSH junto con sialiltransferasa en células Per.C6 da como resultado niveles elevados de FSH sialilada en comparación con células que sólo expresan FSH.

#### **Ejemplo 6 Análisis del pl de isoformas de FSH producidas por Per.C6 por isoelectroenfoque.**

20 La electroforesis se define como el transporte de moléculas cargadas a través de un disolvente por un campo eléctrico. La movilidad de una molécula biológica a través de un campo eléctrico dependerá de la intensidad de campo, la carga neta en la molécula, el tamaño y la forma de la molécula, la fuerza iónica y las propiedades del medio a través del cual migran las moléculas.

25 30 El isoelectroenfoque (IEF) es una técnica electroforética para la separación de proteínas basada en su pl. El pl es el pH al que una proteína no tiene carga neta y no migrará en un campo eléctrico. El contenido de ácido siálico de las isoformas de FSH altera ligeramente el punto pl para cada isoforma, que puede ser explotado usando esta técnica para visualizar las isoformas de Per.C6-FSH de cada clon.

35 Los puntos isoeléctricos de las isoformas de FSH producidas por Per.C6 en sobrenadantes de cultivo celular se analizaron usando isoelectroenfoque. El medio de cultivo celular de los clones de Per.C6-FSH se produjo como se describe en los Ejemplo 4 y 5.

40 45 Las muestras de Per.C6-FSH se separaron en geles Novex® IEF que contenían 5 % de poliacrilamida en condiciones nativas en un gradiente de pH 3,0 - 7,0 en una disolución de anfolito de pH 3,0 - 7,0.

Las proteínas se transfirieron sobre nitrocelulosa soportada y se visualizaron usando un anticuerpo monoclonal anti-FSH $\alpha$  primario, anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y el reactivo nitroazul de tetrazolio (NBT) para visualizar las bandas.

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

50 55 Usando este método, se identificaron clones que producían isoformas de FSH con un mayor número de moléculas de ácido siálico. La manipulación con  $\alpha$ 2,3- o  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa produjo clones con más ácido siálico y un menor pl.

#### **Ejemplo 7 Análisis de enlaces de ácido siálico de Per.C6-FSH**

60 65 Se analizaron glucoconjungados usando un método de diferenciación de glucanos basado en lectina. Con este método, se pueden caracterizar las glucoproteínas y los glucoconjungados unidos a nitrocelulosa. Las lectinas reconocen selectivamente un resto particular, por ejemplo, ácido siálico unido en  $\alpha$ 2,3. Las lectinas aplicadas se conjugan con el hapteno esteroideo digoxigenina que permite la detección inmunológica de las lectinas unidas.

70 75 Se separaron Per.C6-FSH purificado de un clon parental (sin sialiltransferasa adicional), un clon manipulado con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa y un clon manipulado con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa usando técnicas de SDS-PAGE estándar. Se usó una FSH recombinante disponible comercialmente (Gonal-f, Serono) como patrón.

80 85 Se analizó ácido siálico usando el kit de diferenciación de glucanos DIG (Cat. n.º 11 210 238 001, Roche) según las instrucciones del fabricante. Reacciones positivas con aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) indicaron ácido siálico unido terminalmente (2-6). Reacciones positivas con aglutinina II de *Maackia amurensis* (MAA) indicaron ácido siálico unido terminalmente ( $\alpha$ 2-3).

90 95 En resumen, el clon parental 005 contuvo bajos niveles de ácido siálico tanto en  $\alpha$ 2,3 como en  $\alpha$ 2,6. Los clones manipulados con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa contuvieron altos niveles de enlaces  $\alpha$ 2,3 de ácido siálico y bajos niveles

de enlaces  $\alpha$ 2,6 de ácido siálico. Los clones manipulados con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa contuvieron altos niveles de enlaces  $\alpha$ 2,6 de ácido siálico y bajos niveles de enlaces  $\alpha$ 2,3 de ácido siálico. El control estándar Gonal-f solo contiene enlaces  $\alpha$ 2,3 de ácido siálico. Esto está de acuerdo con lo que se conoce sobre las proteínas recombinantes producidas en células de ovario de hámster chino (CHO) (Kagawa *et al*, 1988, Takeuchi *et al*, 1988, Svensson *et al*, 1990).

En conclusión, la manipulación de células Per.C6-FSH con  $\alpha$ 2,3- o  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa aumentó satisfactoriamente el número de moléculas de ácido siálico conjugadas con la FSH en la muestra.

#### 10 **Ejemplo 8a Cuantificación de ácido siálico total**

El ácido siálico es un hidrato de carbono unido a proteína considerado un monosacárido y se produce en combinación con otros monosacáridos como galactosa, manosa, glucosamina, galactosamina y fucosa.

15 Se midió el ácido siálico total en FSHr purificada (Ejemplo 11) usando un kit de cuantificación de ácido siálico enzimático según el protocolo de los fabricantes (Sigma, Siálico-Q). En resumen, la aldolasa del ácido N-acetilneuramínico cataliza un ácido siálico a N-acetilmanosamina y ácido pirúvico. El ácido pirúvico se puede reducir en ácido láctico por  $\beta$ -NADH e deshidrogenasa láctica. La oxidación de B-NADH puede medirse espectrofotométricamente con exactitud.

20 Se midió la concentración de proteína en placas de microtitulación usando un kit de ensayo comercial de ácido bicinchonílico (BCA) (Sigma, B 9643) basado en el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951).

25 Se midió el contenido total de ácido siálico de Per.C6-FSH y se encontró que era superior a 6 moles/mol.

#### 25 **Ejemplo 8b Cuantificación de cantidades relativas de $\alpha$ 2,3, $\alpha$ 2,6 y $\alpha$ 2,8-ácido siálico**

Se midió el porcentaje relativo de cantidades de  $\alpha$ 2,3,  $\alpha$ 2,6 y  $\alpha$ 2,8-ácido siálico en FSHr purificada (Ejemplo 11) usando técnicas conocidas.

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

35 Se digirieron muestras de los glucanos extraídos y reunidos (extraídos como antes) con diferentes sialidasas para determinar los enlaces. NAN 1 (sialidasa recombinante) libera ácidos siálicos de extremos no reductores unidos en  $\alpha$ 2,3 (NeuNAc y NeuNGc), la ABS (sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*) libera ácidos siálicos de extremos no reductores unidos en  $\alpha$ 2,3,  $\alpha$ 2,6 y  $\alpha$ 2,8 (NeuNAc y NeuNGc). Las muestras se analizaron por NP-HPLC, para permitir la comparación de la muestra no digerida con la digerida con NAN1 y la digerida con ABS. La comparación de los tres trazados de NP-HPLC (no digeridos, digeridos con NAN1, digeridos con ABS) muestra que la digestión con ABS y NAN1 da diferentes resultados. Esto indica que las muestras tienen ácidos siálicos con enlaces  $\alpha$ 2,3,  $\alpha$ 2,6 y  $\alpha$ 2,8. Los porcentajes relativos se calcularon a partir de estructuras presentes en los conjuntos de glucanos no digeridos y se encontró que estaban en los intervalos 65 % - 85 % (por ejemplo 77,75 %) para sialilación en  $\alpha$ 2,3; 15 al 35 % (por ejemplo, 21,46 %) para sialilación en  $\alpha$ 2,6; y 0,1 a 3 % para sialilación en  $\alpha$ 2,8.

#### 50 **Ejemplo 8c Cuantificación de cantidades relativas de estructuras sialiladas mono-, di-, tri- y tetra-antennarias**

50 Se midieron las cantidades porcentuales relativas de estructuras mono-, di-, tri- y tetrasialiladas en glicanos extraídos de rFSH purificada (Ejemplo 11) usando técnicas conocidas.

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

60 Se llevó a cabo HPLC de intercambio aniónico débil (WAX) para separar los N-glucanos por carga (Ejemplo 8b) como se explican en Royle *et al*, con un patrón de N-glucano de fetuina como referencia. Los glucanos se eluyeron según el número de ácidos siálicos que contuvieron. Todas las muestras incluyeron estructuras mono(1S), di(2S), tri(3S) y tetra(4S)-sialiladas. Se descubrió que las cantidades relativas de estructuras sialiladas estaban en las siguientes relaciones (1S:2S:4S:4S): 9-15 %: 27-30 %: 30-36 %: 25-29 % (por ejemplo 10,24:28,65:35,49:25,62).

#### 65 **Ejemplo 9 Determinación de las tasas de eliminación metabólica de FSHr**

Para determinar la tasa de eliminación metabólica (MCR) de muestras de Per.C6-FSH, ratas hembra conscientes (3 animales por clon) se inyectaron en la vena de la cola en el tiempo cero con un bolo de FSHr (1 - 10 µg/rata, basado en cuantificación de muestras por ELISA, DRG EIA 1288). Se tomaron muestras de sangre (400 µl) de la punta de la cola 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 32 horas después de la inyección de la muestra de prueba. Se recogió suero por centrifugación y se ensayó para el contenido de FSH por ELISA (DRG EIA 1288).

El receptor de asialoglucoproteína (ASGP-R) reconoce glucoproteínas desialiladas (terminadas en galactosa), tales como asialofetúina (ASF). (Pricer y Ashwell, 1971. Van Lenten y Ashwell, 1972). El receptor de ASGP y la glucoproteína desialilada unida se internalizan en la célula donde el receptor se recircula y el ligando es degradado (Regoeczi *et al*, 1978, Steer y Ashwell, 1980).

Para investigar si el material de Per.C6-FSH fue eliminado por este mecanismo, se saturó el ASGP-R con asialofetúina. La tasa de eliminación metabólica de material parental manipulado con  $\alpha$ 2,6 o  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa se determinó como se describe con coadministración de un exceso molar mínimo de 7500 veces de asialofetúina para saturar el ASGP-R durante 1-2 h.

El material producido por los clones parentales de Per.C6-FSH contuvo material de MCR algo más largo, pero un elevado porcentaje fue eliminado rápidamente (Figura 7). El clon principal 005 que contuvo el material más sialilado se manipuló usando  $\alpha$ 2,6- o  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (Ejemplo 5). Aunque los clones manipulados con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa demostraron un aumento de la sialilación (Figura 5), no hubo mejora en la MCR (Figura 7). El bloqueo de ASGR restauró la MCR del material de  $\alpha$ 2,6 a la del patrón, lo que demostró que incluso con elevados enlaces  $\alpha$ 2,6 el material se elimina rápidamente (Figura 8). La manipulación con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa produjo clones con MCR comparable al patrón (Figura 9) y el contenido variable de siálico estuvo de acuerdo con lo se conoce para las isoformas de FSH (Figura 10).

#### **Ejemplo 10 Ensayo *in vivo* de Steelman-Pohley**

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

El aumento en los pesos ováricos debido a los clones de Per.C6-FSHr se analizó según el método de Steelman y Pohley (1953). Se cuantificó Per.C6-FSHr de muestras de medio celular filtrado por ELISA (DRG,EIA-1288). Las muestras Per.C6-FSHr y patrones (Gonal-f FSHr) se probaron en cinco dosis diferentes (3 animales/dosis). Gonal-f se administró a 50, 100, 200, 400 y 800 ng/rata. Las dosis de muestra se calcularon usando sus valores de ABC con respecto a Gonal-f, normalmente 0,05 - 10 µg/rata.

En conclusión, el material sialilado por defecto producido por los clones parentales Per.C6-FSH (Figura 11) no fue tan potente en el ensayo de aumento del peso ovárico como la FSHr disponible comercialmente. La manipulación de la sialiltransferasa para añadir enlaces  $\alpha$ 2,6 adicionales aumentó el contenido de ácido siálico, pero no mejoró la potencia en el ensayo *in vivo* (Figura 12). Sin embargo, enlaces  $\alpha$ 2,3 adicionales mejoraron significativamente la potencia (Figura 13) y los dos preparados de FSH recombinante (Per.C6 y derivado de CHO) muestran perfiles muy similares en este ensayo.

#### **Ejemplo 11 Visión general de producción y purificación**

Se desarrolló un procedimiento para producir FSH en células PER.C6 que se cultivaron en suspensión en medio sin suero. El procedimiento se describe a continuación y se aplicó a varias estirpes celulares PER.C6 productoras de FSH.

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

Para la producción de PER.C6-FSH, las estirpes celulares se adaptaron a un medio sin suero, es decir, Excell 525 (JRH Biosciences). Las células se cultivaron en primer lugar para formar una monocapa 70 %-90 % confluyente en un matraz de cultivo T80. Tras el pase, las células se resuspendieron en el medio sin suero, Excell 525 + L-glutamina 4 mM, a una densidad celular de  $0,3 \times 10^6$  células/ml. Se pusieron 25 ml de suspensión de células en un matraz agitador de 250 ml y se agitaron a 100 rpm a 37 °C a 5 % de CO<sub>2</sub>. Despues de alcanzar una densidad celular de  $> 1 \times 10^6$  células/ml, las células se subcultivaron hasta una densidad celular de 0,2 o  $0,3 \times 10^6$  células/ml y se cultivaron adicionalmente en matraces agitadores a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 rpm.

Para la producción de FSH, las células se transfirieron a un medio de producción sin suero, es decir, VPRO (JRH Biosciences), que soporta el crecimiento de células PER.C6 hasta densidades celulares muy altas (normalmente  $> 10^7$  células/ml en un cultivo discontinuo). Las células se cultivaron en primer lugar hasta  $> 1 \times 10^6$  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 una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. A continuación, las células se cultivaron en

un matraz agitador durante 7-10 días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 rpm. Durante este periodo, las células crecieron hasta una densidad de > 10<sup>7</sup> células/ml. El medio de cultivo se recogió después de que la viabilidad celular empezara a disminuir. 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).

- 5 A partir de aquí, la purificación de FSH se llevó a cabo usando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976). Esto se logró por cromatografía en DEAE celulosa, filtración en gel en Sephadex G100, cromatografía de adsorción en hidroxiapatita y electroforesis preparativa en poliacrilamida.
- 10 Durante todos los procedimientos cromatográficos, la presencia de FSH inmunorreactiva se confirmó por RIA (DRG EIA 1288) y IEF (Ejemplo 6).

### Referencias

- 15 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.
- 20 Arey BJ, Stevis PE, Decher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A y Lopez FJ. (1997) Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol.* 11(5), 517-526.
- 25 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.
- 30 Bassett RM y Driebergen R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reprod Biomed Online* 10(2), 169-177.
- 35 Damian-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.
- 40 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
- 45 Dalpathado DS, Irungu J, Go EP, Butnev VY, Norton K, Bousfield GR y Desaire H. (2006). Comparative glycomics of the glycoprotein follicle stimulating hormone: glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry.* 45(28), 8665-8673. Sin copia
- 50 Dias JA, Van Roey P. (2001). Structural biology of human follitropin and its receptor. *Arch Med Res.* 32(6), 510-519
- 55 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.
- 60 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
- 65 Fox KM, Dias JA y Van Roey P. (2001). Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol.* 15(3), 378-89
- 70 Grabenhorst E, Hoffmann A, Nimtz 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.
- 75 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.
- 80 Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T. y Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. *G Nucleic Acids Res.* 18 (3), 667

- Howles, C.M. (1996). Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Hum Reprod. Update*, 2,172-191.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1), 265-75.
- 35 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.
- 40 Pierce JG y Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function *Annu Rev Biochem.* 50, 465-495.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 Regoeczi E, Debanne MT, Hatton MC y Koj A. (1978) Elimination of asialofetuin and asialoorosomucoid by the intact rat. Quantitative aspects of the hepatic clearance mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 541(3), 372-84.
- 60 Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA y Rudd PM (2006) Methods in Molecular Biology, ed I Brockhausen-Schutzbach (Humana Press), 347: Glycobiology protocols, 125-144
- 65 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.
- 70 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
- 75 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.
- 80 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.
- 85 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.
- 90 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.
- 95 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.
- 5 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.
- 10 Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damian-Matsumura, P. y Chappel, S.C. (1988) Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum. Reprod.* 3, 491-501.
- 15 Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P. Jimenez, M, Zambrano, E y Diaz-Sánchez, V. (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.* 7, 23-30.
- 20 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.
- 25 Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P y Timossi C (2001). Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res.* 32(6), 520-532.
- 30 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.
- 35 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.
- 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.
- 45 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.
- 50 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.
- Zhang X, Lok SH y Kon OL (1998) Stable expression of human alpha-2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. *Biochim Biophys Acta.* 1425(3), 441-452.
- SEQ ID 1**
- Polipéptido de la hormona foliculoestimulante alfa
- Número de acceso AH007338
- Secuencia de nucleótidos de FSH alfa

# ES 2 989 729 T3

1 ATGGATIAGT ACAGAAAATA TGGAGCTAIC TTTCTGGTCA CAITGICGGI  
GTTCTGCA  
61 GTCCTCCATT CGGCTCCTGA TGTGGAGGAT TGCCCAGAAT GCAGGCTACA  
GGAAAACCCA  
121 TTCTCTCCC AGCCGGGTGC CCCAAACAGTC CAGTGCATGG GCTGCGGCTT  
CTCTAGAGCA  
181 TATCCCACTTC CACTAACOTC CAACAAACACC ATGCTGGTCC AAAACAAACCT  
CACCTCAGAG  
241 TCCACTTCCT GTGTAGCTAA ATCACATAAAC AGGCTCACAC TATTCGGGG  
TTTCAAGTG  
301 GACAACCAACA CGCCGTCGGA CGGCACTACT TGTAACTAAC ACAAATCTTA A

## Secuencia de proteínas de FSH alfa

1 MKTLQFFFLF CCWKAIC CNS CEENITIAI EKEECRFCIS INTTWCAGYC  
YTRDLVYKDP  
61 ARP KI QKTCT FKELVYETV R VPGCAHHADS LYTYPVATQC HCGKCDSDST  
DCTVRCGLPS  
121 YCSFGE MKE

## SEQ ID 2

### Polipéptido de la hormona foliculoestimulante beta

Número de acceso NM\_000510

## Secuencia de nucleótidos de FSH beta

1 ATGAAGACAC TCCAGTTTT CTTCTTTTC TGTGCTGGA AAGCAATCTG  
CTGCAATAGC  
61 TGTGAGCTGA CCAACATCAC CATTGCAATA GAGAAAGAAG AATGTCGTT  
CTGCATAAGC  
121 AUCAACACCA CTTGGCTGTGC TGGCTACTCC TACACCAACGG ATCTCGTGT  
TAAGGACCCA  
181 CCCACGCCCA AAATCCACAA AACAACTACC TTCAACCAAC UGGUATATCA  
AACAGTGAGA  
241 GTCGCCCCGGCT GTGCTCACCA TGCAGATTC CTTGTATAACAT ACCCAGTGGC  
CACCCAGTGT  
301 CACTGCGCA ACTCTCACAG CCACACCACT GATCTACUG UGGGACCCG  
GGGGCCCCAGC  
361 TACTGCTCTT TGGCTCAAAT CAAACAAATAA

## Secuencia de proteínas de FSH beta

1 MKTLQFFFLF CCWKAIC CNS CEENITIAI EKEECRFCIS INTTWCAGYC  
YTRDLVYKDP  
61 ARP KI QKTCT FKELVYETV R VPGCAHHADS LYTYPVATQC HCGKCDSDST  
DCTVRCGLPS  
121 YCSFGE MKE

## SEQ ID 3

### Beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4

# ES 2 989 729 T3

Número de acceso L23767

## Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

5

1 ATGTGTCCCTG CAGGCTGGAA GCTCCTGGCC ATGTTGGCTC TGGTCCTGGT  
CGICATGGTG  
61 TGGTATTCCA TCTCCCGGGG AGACAGGTAC ATCGAGCTTT TTTATTTCC  
CATCCCAGAG  
121 AAGAAGGGAGC CGTGCCTCCA GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG CCTCTAAAGCT  
CTTGCGAAC  
181 TACTCCCGGG ATCAGCCCAT CTTCCCTGCGG CTTGAGGATT ATTTCTGGT  
CAAGACGCCA  
241 TCTGCTTACG AGCTGCCCTA TGGCACCAAC CGCACTCAGG ATCTGCTCCT  
CCGGGTGCTA  
301 GCCATCACCA GCCTCCCAT CCCCAAGAAC ATCCAGAGCC TCAGGTGCCG  
CCGCTGTGTG  
361 GTCGTGGGA ACGGGCACCG GCTGCGGAAC AGCTCACTGG GAGATGCCAT  
CAACAAGTAC  
421 GAGGGGTC ACGAGATGAA CAAUGCCOCA GTGGCTGCCCT ATGAGGGTGA  
CCTGGCTCC  
481 AAGACCACCA TGGGTCTCTT CTACCGTGAA TCTGGCCACT TCGACCCCCAA  
ACTACAAAAAC  
541 AASCCCAAGACA CACTCCTCGT CCCCTTACCC TTCRACCCAA TCCACTTCCA  
CTGGATLIGAG  
601 ACCATCCGTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCAG AAGGGTTTCT GAAACAGCC  
CCCGCTCCTC  
661 TGGCATGTC ATCCTAAACA GATTCGGATC CTCAACCCCT TCTTCATCCA  
GATTGCAGCT  
721 QACAAACTGC UGAGCCCTGCC AAUCCAACAG CCACCGGAAGA UTAAGCAGAA  
GCCACCCACG  
781 GGCCTGGTGG CCTATCACGCT GGCCTCCAC CTCTGTGACT TGGTGCACAT  
TGCCGGCTTT  
841 GGCTTACCCAG ACGCCCTACAA CAAAGAAGCAG ACCATTCACT ACTATGAGCA  
CATCACCGCTC  
901 AAGTCCATGG CGGGCTCAGG CCATAATGTC TCCCAAGAGG CCCUGGCCAC  
TAAACCCGATC  
961 CTGGAGATGCC GAGCTATCAA CAACCTCAGC TCTTGTGCA

10

## Secuencia de proteínas de ST3GAL4

# ES 2 989 729 T3

1	MCFAGWKLLA	MCAVLVVMV	WYSISREDRY	IELFYFPIPE	KKEPCLQGEA
	ESKASKLFGN				
61	YSRDXQF.F.R	LEDYFWVKTP	SAYELPYGIK	CSED.LLLRVL	ATISSLSSIPRN
	IQSLLRCRRCV				
121	VVCNCHRLRN	SSLCDAINKY	DVVIRLANNAP	VACYECDVGS	KTLMRLFYPE
	SAHFDPKVEN				
181	NPETLILVLVA	FKAMDPHWIE	TILSDDEKKRVR	KGFWKQFPLI	WDVNPQKIRE
	LNPFYME.LAA				
241	DKLILSLPMQQ	FRRKIKQKFIT	GL.LAII.LALH	LCDLVH.LAGF	CYPDAYNKKQ
	TIHYYEQITI				
301	KSMAGSGHNV	SQKALA.IKRM	LEMGA.IKNLT	SF	

## SEQ ID 4

5 Beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1

Número de acceso NM\_003032

Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1

10

# ES 2 989 729 T3

1	AIGATTCACA	CCAACCTGAA	GAAAAAGTTC	AGCTGCTGCG	TCCCTGGTCTT
	CTTCCTGTTT				
61	GCAGICAJCJ	GIGTGTTGGA	GGAAAAGAAG	AAAGGGAGTT	ACTATGATTC
	CTTTAACATTC				
121	CAAACCAAGG	ATTCAGGT	GTAAAGAGT	CTGGGGAAAT	TGGCCATGGG
	GTCCTGATTCC				
181	CAGTCTGTAT	CCTCAAGCAG	CACCCAGGAC	CCCCACACGG	GCCGCCAGAC
	CCTCGGCACT				
241	CCTCAGAGGCC	TAAGCCAAAGG	CAAACCAAGG	GCCTCTTCC	AGGTGTGAA
	CAAGGGACAGC				
301	TCITCCAAAA	ACCTTATCCC	TAGGCTGCAA	AAGAICTGGA	AGAATIACCT
	AAGCATGAAAC				
361	AATIACACAAAG	TGTCCATCAA	GGGGCCAGGA	CCAGGCATCA	AGTTCACTGC
	AGAGGCCCTG				
421	GGCCTGCCACG	TCCGGGACCA	TGIGAATGTA	TCCATGGTAG	AGGTCAACAGA
	TTTCGCCCTC				
481	AATACCTCTG	AATGGGAGGG	TTATCTGCC	AAGGAGAGCA	TTAGGACCAA
	GGCTGGGCCCT				
541	TGGGGCAGGT	GTGCTGTTGT	CTCGTCAGCG	GGAACTCTGA	AGTCCTCCCA
	ACTAAGGCAGA				
601	GAATACCATG	AATCATGACCG	AGTCCTGAGG	TTAAATGGGG	CACCCACACG
	CAACCTCCAA				
661	CARGATGTGG	GCACAAACRC	TACCATTCGC	CTGATGAACT	CTCAGTTGGT
	TACCAACAGAG				
721	AAGCGCTTCC	TCACAGACAG	TTTGTACAAAT	GAAGGAATCC	TAATGTAIG
	GAACCCATCT				
781	GTAAIACCACT	CAGATAATCCC	AAAGTGGTAC	CAGAAATCCGG	ATTATAATT
	CTTTAACAAAC				
841	TACAAGACTT	ATCGTAACCT	GCACCCCAAAT	CAGCCCTTTT	ACATCCCTAA
	GCACCCAGATG				
901	CCTTGGGAGC	ATGGGACAT	TCCTCAAGAA	ATCCTCCCCAG	AGAGATICA
	GCACAAACCC				
961	CCAACTCTCTG	GGATGCTTGG	TAICATCAIC	ATGATGACCG	TGTGTGACCA
	GGTGGATATT				
1021	TAIGAGTCTC	TCACATCCAA	GCGCAAGACT	GACCTGTGCT	ACTACTACCA
	GAAGGTCTTC				
1081	GATAGTGCCT	GCACGATGGG	TGCCFACCAC	CGCGCTGCTCT	ATGAGAAGAA
	TTGGGTGAAG				
1141	CAFCICAACC	AGGGCACAGA	TGAGGACATC	TACCTGCTTG	GAAAAGCCAC
	ACTGCCTGGC				
1201	TTCCGGACCA	TTCACTGCTA	A		

# ES 2 989 729 T3

4	MINTNLKKF	SCCVLVFILE	AVICVRKEKK	KGSYYDSFKL	QTKEFQVLKS
	LGKLAGMGSDS				
61	QSVSSSSSTQD	PHKCRQTLQS	ERGLAKAKPE	ASFQVWNKDS	SSKNLIPRLQ
	KIWKNYLSMN				
121	KYKVSYKCPG	PGIKFSAEAL	RCHLRDHVNV	SMVEVTDFFP	RTSEBEGYL
	KWSLRTKAGP				
181	WGKCAVSSA	GSLKSSSQLGR	EIDDHDAVLR	FNGAPTANFQ	QDVGIRTTIR
	LMNSQLVITR				
241	KRFLKUDSLYN	EGIILVWDPS	VYRSLIPKWS	QNPDYNFFNN	YKUYRKLRPN
	QPFYILKRPQM				
301	PWELMDTLCQ	ISREEIQPNE	PSSCMLGICL	MNELCDQVDI	YEFILPSKRKD
	DVCRYYQKFF				
361	DSACTMGAYH	PLIYEKNLVK	RLMQGTDEDI	YLLGKATLPG	FRTIHC

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Hormona foliculoestimulante recombinante (FSHr) producida o expresada en una estirpe celular humana, incluyendo la FSHr sialilación en  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6, en donde del 10 % al 20 % de la sialilación total es sialilación en  $\alpha$ 2,6, que incluye ácidos siálicos unidos en  $\alpha$ 2,6 (sialilación en  $\alpha$ 2,6) proporcionados por actividad de sialiltransferasa endógena, y en donde la estirpe celular humana ha sido manipulada para expresar una  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa.
- 10 2. Una composición farmacéutica que comprende FSHr según la reivindicación 1.
- 10 3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 que comprende además CGh y/o LH.
- 15 4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de la infertilidad.
- 15 5. Un método de producción de FSHr según la reivindicación 1 que comprende una etapa de producir o expresar la FSHr en una estirpe celular humana.

Fig. 1, 2 y 3: Mapas de plásmidos de los vectores de expresión pFSHalfa/beta, pST3 y pST6. CMV = promotor del citomegalovirus, BGHp(A) = secuencia poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, fl ori = origen de replicación fl, SV40 = promotor del virus simio 40, Neo = marcador de resistencia de neomicina, Hyg = marcador de resistencia de higromicina, SV40 p(A) = secuencia poliadenilación del virus simio 40, FSH A = polipéptido de la hormona foliculoestimulante alfa, FSH B = polipéptido de la hormona foliculoestimulante beta, ST3GAL4 =  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa, ST6GAL1 =  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa, ColEl = origen de replicación ColEl, Amp = marcador de resistencia de ampicilina.

Figura 1. Vector de expresión de FSH

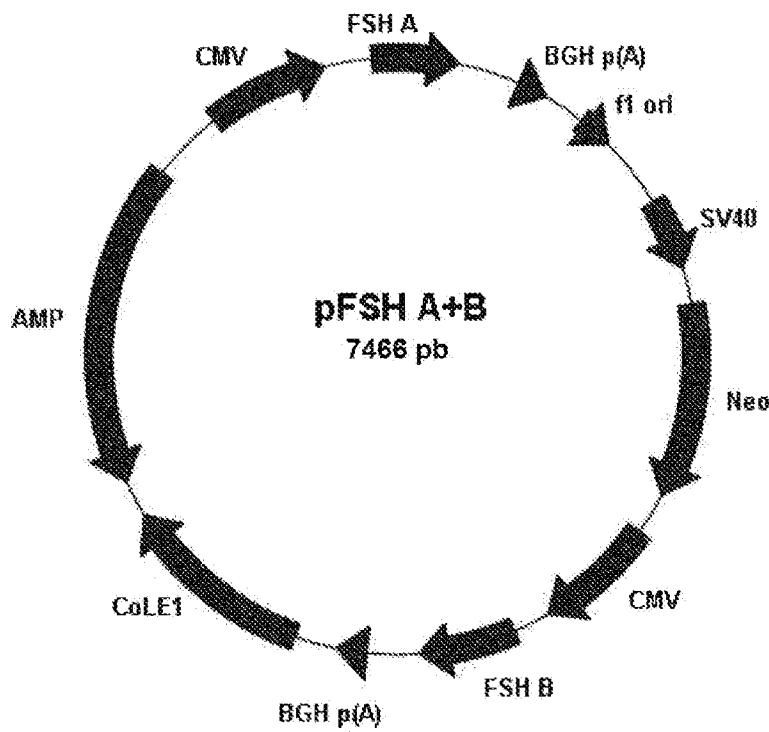


Figura 2. Vector de expresión de  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4)

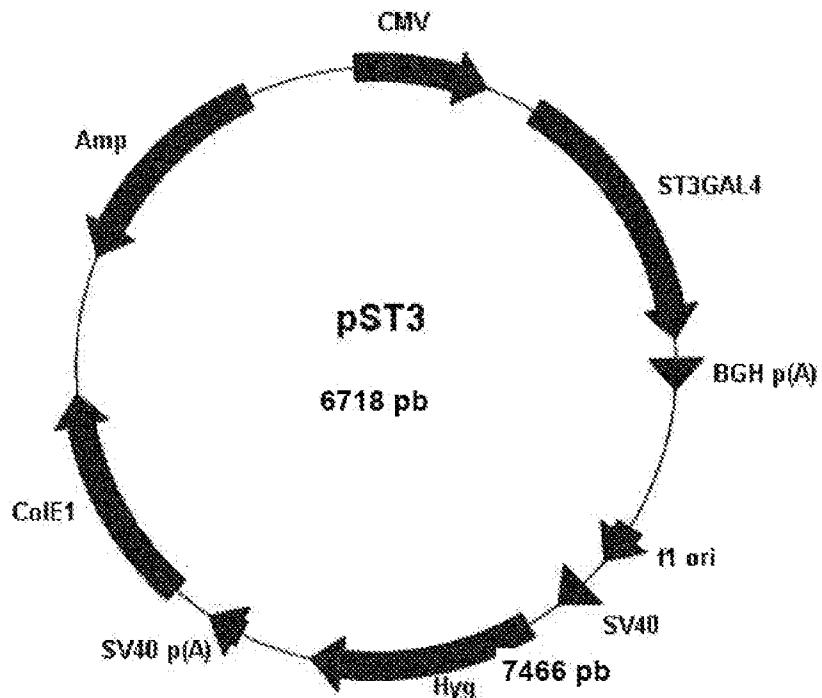


Figura 3. Vector de expresión de  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1)

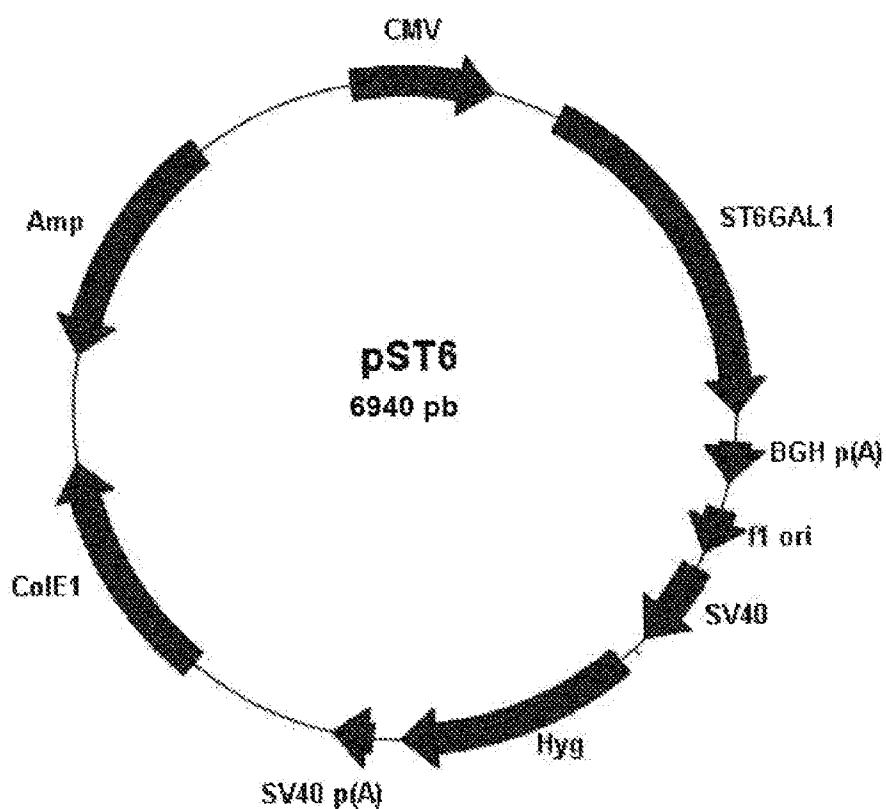


Figura 4. Isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan establemente FSH. Sobrenadantes de cultivo celular separados en condiciones nativas en un gradiente de pH 3,0 - 7,0. El clon 005 es representativo de los cinco clones llevados hacia adelante para la manipulación con sialiltransferasa. Se desecharon los clones que contenían isoformas menos ácidas.

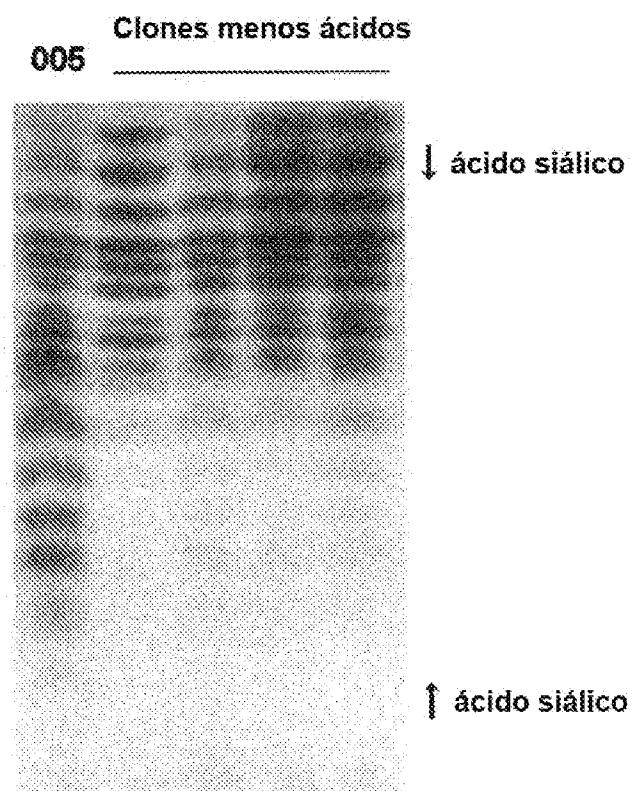


Figura 5. Ejemplo de clones analizados por isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan establemente FSH después de manipular con  $\alpha$ 2,3- o  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa. Los sobrenadantes de cultivo celular separados en condiciones nativas en un gradiente de pH 3,0 - 7,0. El clon 005 es la estirpe celular parental Per.C6-FSH. Se retiraron los clones que presentaban perfiles básicos o mixtos (\*). Los restantes clones demuestran una manipulación satisfactoria con una sialiltransferasa para aumentar el número de moléculas de ácido siálico en FSH.

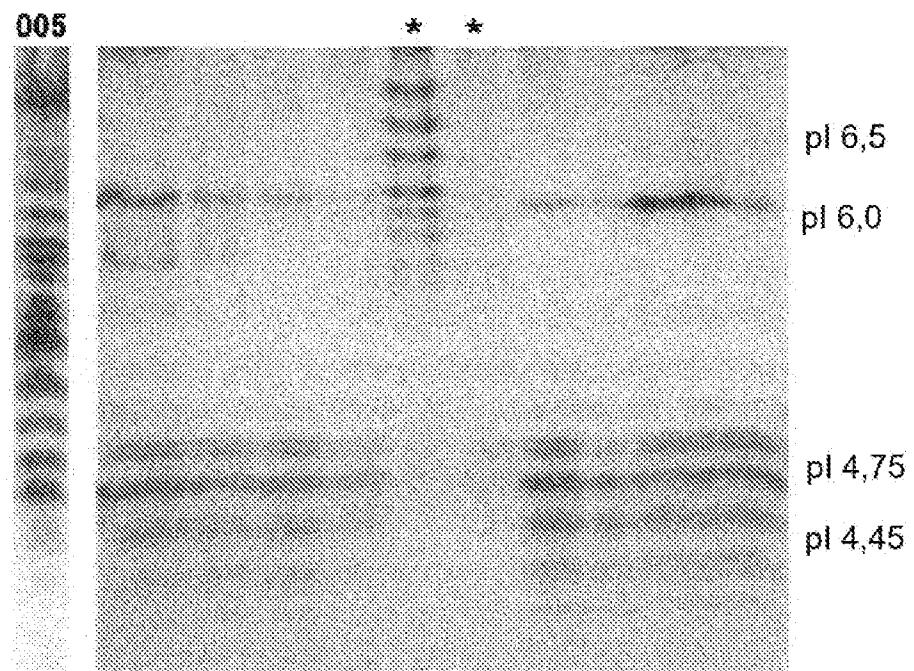
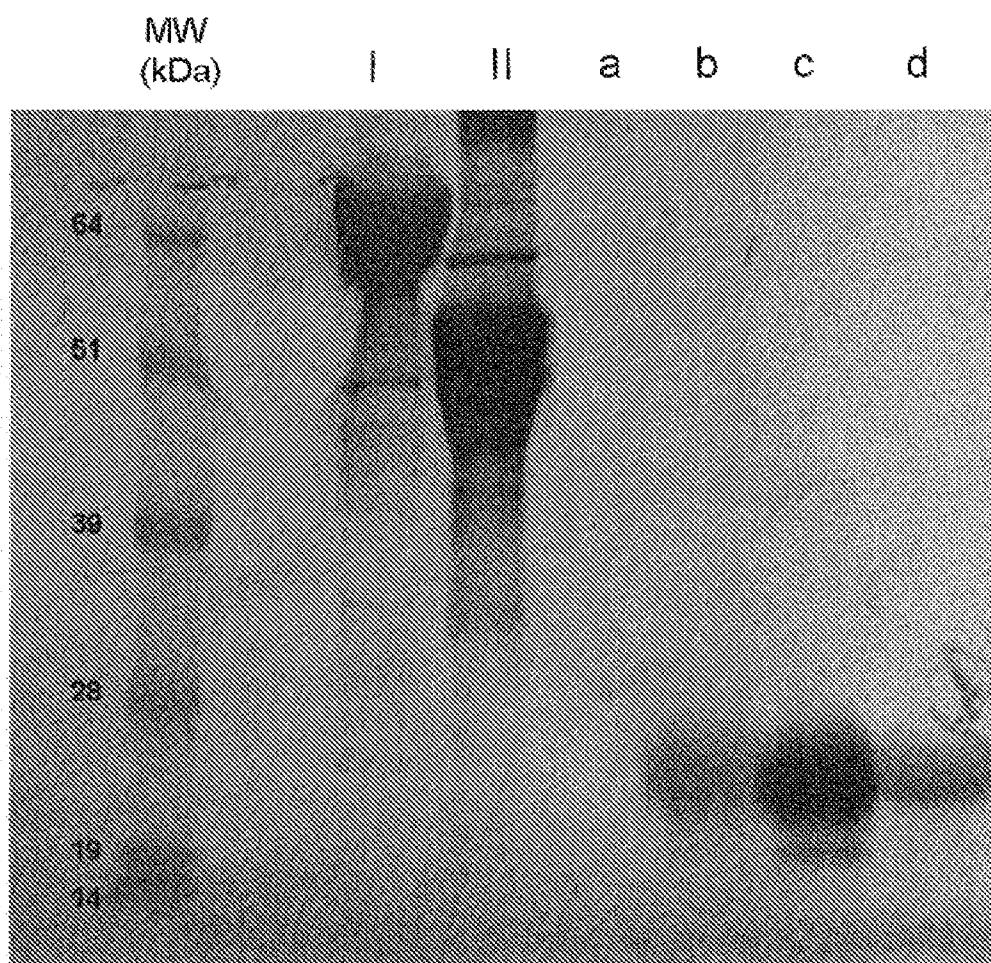


Figura 6. Análisis de los enlaces de ácido siálico de Per.CG FSH. Se separó Per.C6-FSH purificado por SDS-PAGE en geles duplicados, se transfirió a nitrocelulosa y se visualizó usando el kit de diferenciación de glucanos DIG (Cat. n.º 11 210 238 001, Roche) según las instrucciones del fabricante. Reacciones positivas con aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) indicaron ácido siálico unido terminalmente (2-6) (**A**). Reacciones positivas con aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA): indicaron ácido siálico unido terminalmente (2-3) (**B**). Carril I control de los fabricantes que contiene enlaces  $\alpha$ 2,6 solo. Carril II control de los fabricantes que contiene enlaces  $\alpha$ 2,6 y  $\alpha$ 2,3. Muestra a, FSH recombinante derivada de CHO comercial (Gonal-f, Serono). Muestra b, Per.C6-FSHr parental, sin manipulación con sialil-transferasa. Muestra c, Per.C6-FSHr con manipulación con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa. Muestra d, Per.C6-FSHr con manipulación con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa.



**B**

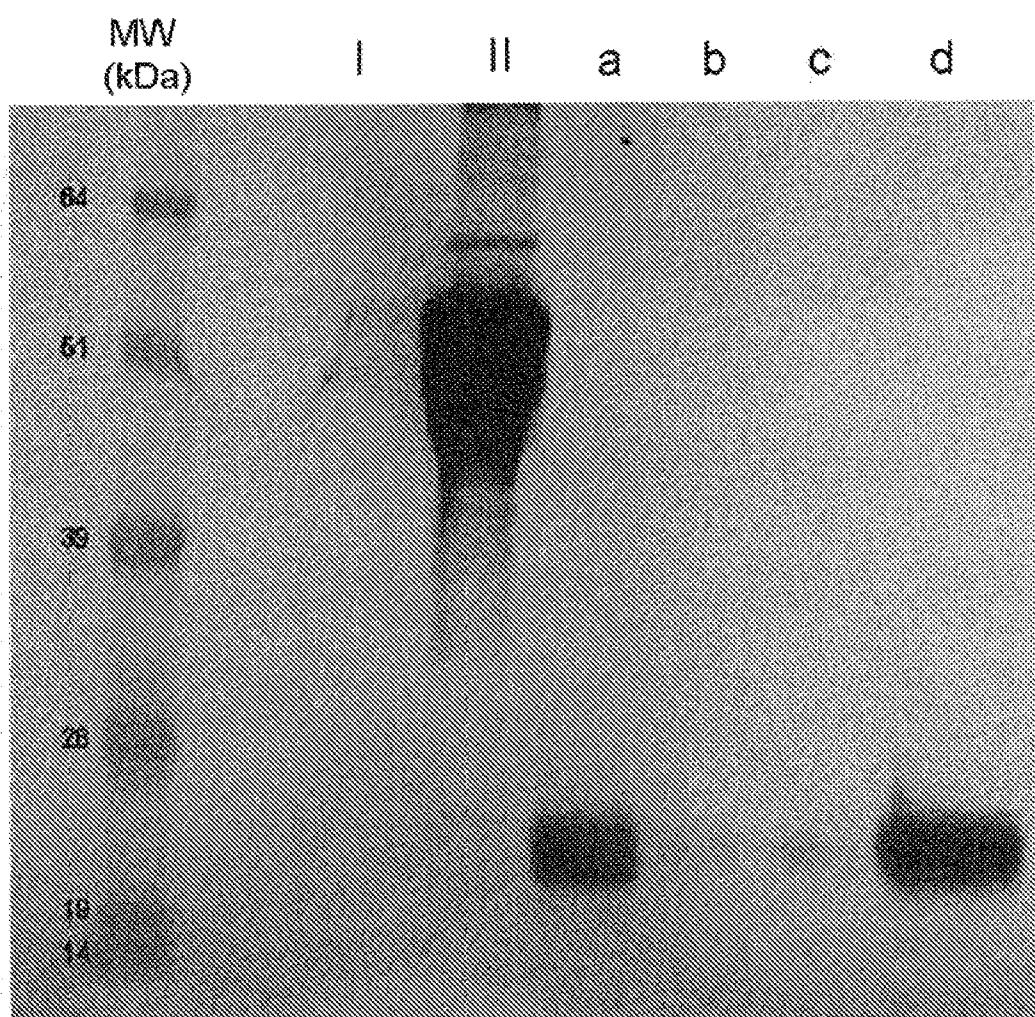


Figura 7. Tasas de eliminación metabólica de muestras de Per.C6-FSH. Se inyectó a ratas hembra (3 animales por clon) en la vena de la cola a tiempo cero un bolo de FSHr (1 - 10 µg/rata). Las muestras de sangre recogidas con el tiempo se ensayaron para el contenido de FSH por ELISA.

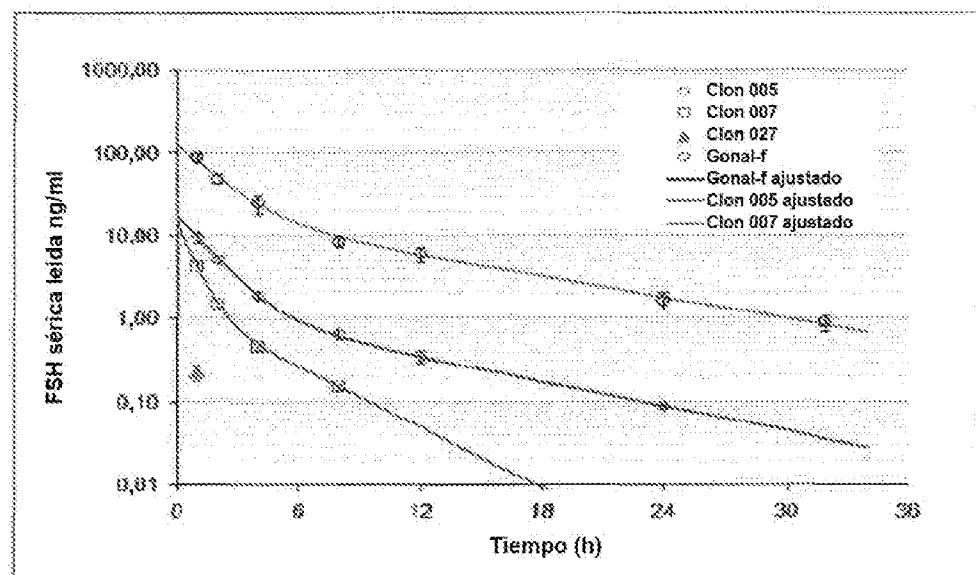


Figura 8. Tasas de eliminación metabólica de muestras de Per.C6-FSH manipuladas con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa. Se inyectó a ratas hembra (3 animales por clón) en la vena de la cola a tiempo cero un bolo de FSHr (1 - 10  $\mu$ g/rata). Las muestras de sangre recogidas con el tiempo se ensayaron para el contenido de FSH por ELISA.

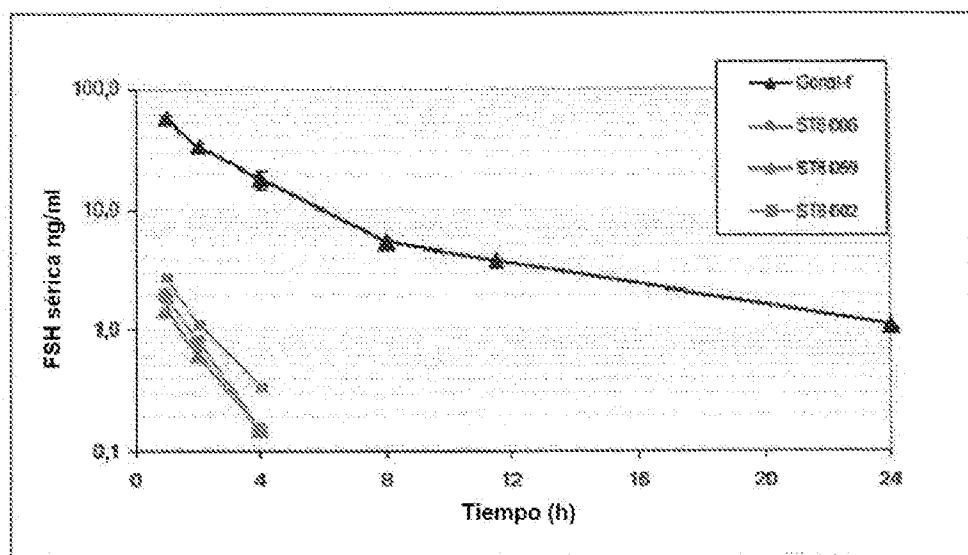


Figura 9. Tasas de eliminación metabólica de muestras de Per.C6-FSH manipuladas con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa con coadministración de un exceso molar de 7500 veces de asialofetuina para saturar el ASGP-R durante 1-2 h.

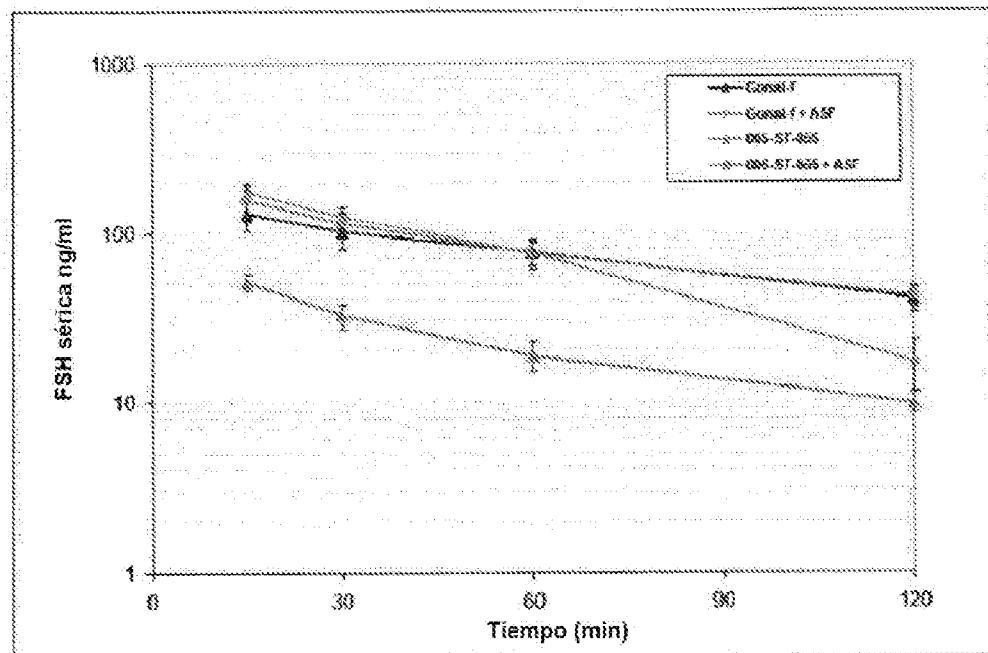


Figura 10. Tasas de eliminación metabólica de muestras de Per.C6-FSH manipuladas con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa. Las muestras se eligieron para su contenido de ácido siálico basado en su perfil de IEF.

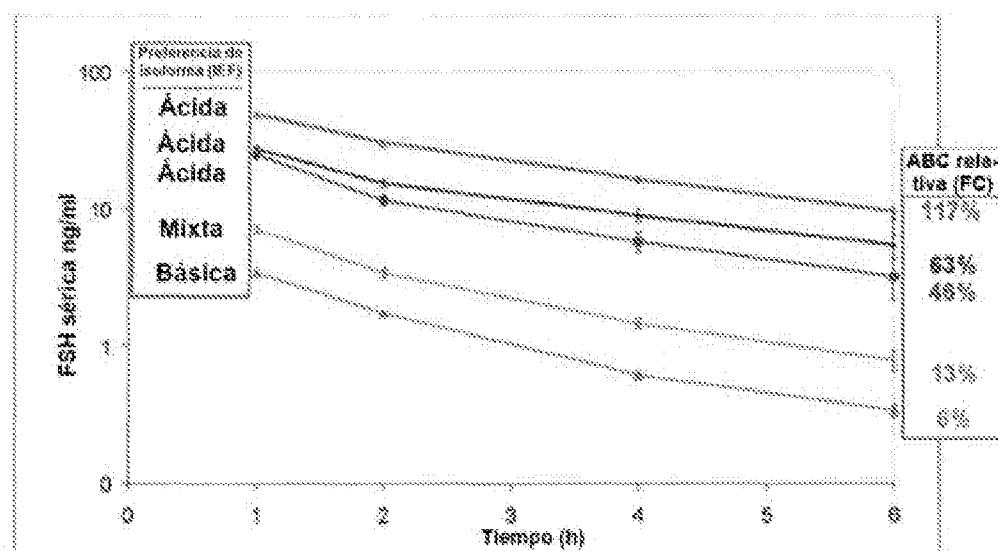


Figura 11. Aumento del peso ovárico según el método de Steelman y Pohley (1953). Se probaron Per.C6-FSHr y patrones (Gonal-f FSHr) a diferentes dosis (3 ratas/dosis).

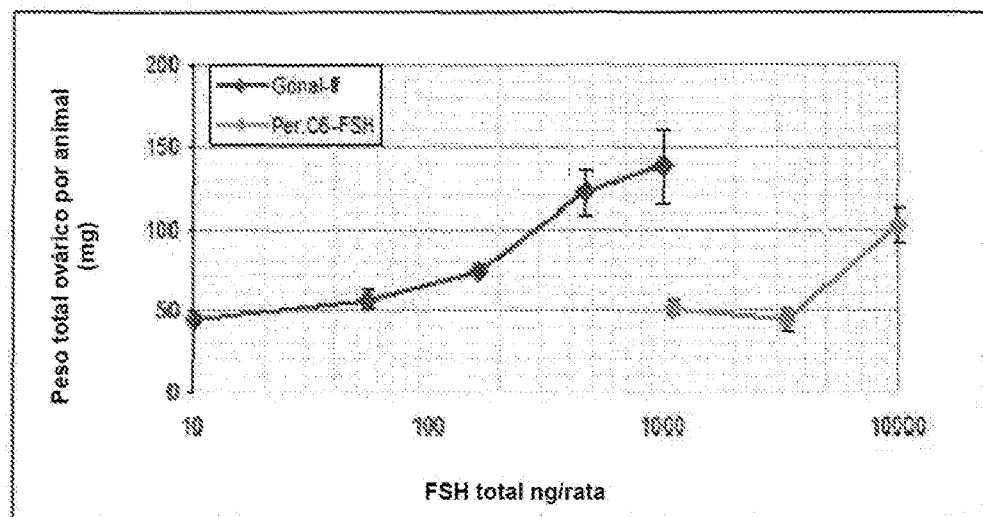


Figura 12. Aumento del peso ovárico según el método de Steelman y Pohley (1953). Se probaron Per.C6-FSHr manipulada con  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa y patrones (Gonal-f FSHr) a diferentes dosis (3 ratas/dosis).

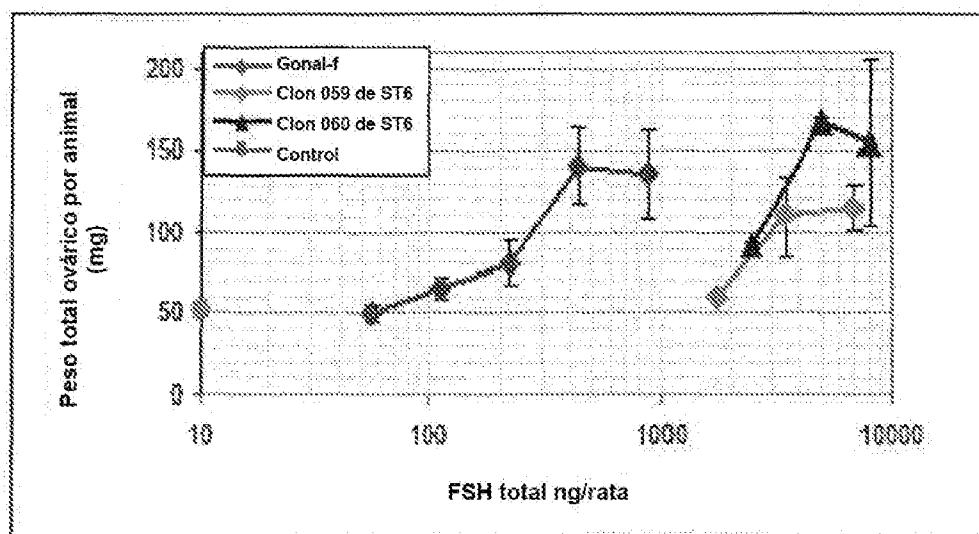


Figura 13. Aumento del peso ovárico según el método de Steelman y Pohley (1953). Se probaron Per.C6-FSHr parental, Per.C6-FSHr manipulada con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa y patrones (Gonal-f FSHr) a cinco dosis diferentes (3 ratas/dosis).

