

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 837 111**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/59**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016** **PCT/EP2016/059006**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016** **WO16170113**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016** **E 16721722 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020** **EP 3286209**

54 Título: **Procedimiento de producción de gonadotropina**

30 Prioridad:

**24.04.2015 EP 15164965**

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

**29.06.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PLAKSIN, DANIEL y**  
**GRINHUT, AYELET**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 837 111 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

Procedimiento de producción de gonadotropina

- 5 La presente invención se refiere a gonadotropinas para su uso en el tratamiento de la infertilidad. En particular, se refiere a la gonadotropina coriónica humana (hCG).

10 Las gonadotropinas son un grupo de hormonas glicoproteicas heterodiméricas que regulan la función gonadal en hombres y mujeres. Incluyen la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG).

15 La gonadotropina coriónica humana (hCG) se secreta principalmente por la placenta humana durante el embarazo y contribuye al mantenimiento del cuerpo lúteo. La hCG comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos (cadena  $\alpha$ ), también común a las otras hormonas glicoproteicas LH y FSH, y una subunidad beta de 145 aminoácidos (cadena  $\beta$ ) exclusiva de la hCG, que dicta la especificidad de la hormona. Cada subunidad se modifica postraduccionalmente mediante la adición de residuos de carbohidratos complejos. La subunidad alfa contiene 2 sitios de glicosilación ligados a N en los aminoácidos 52 y 78 y la subunidad beta contiene 2 sitios de glicosilación ligados a N en los aminoácidos 13 y 30 y cuatro sitios de glicosilación ligados a O en los aminoácidos 121, 127, 132 y 138.

20 La hCG extraída de la orina de mujeres embarazadas [Choragon (Ferring)] se ha utilizado durante muchos años en el tratamiento de la infertilidad. La producción de hCG extraída de la orina implica la recogida y el procesamiento de grandes cantidades de orina. También está disponible para su uso en el tratamiento de la infertilidad una versión recombinante de hCG, Ovitrelle (Serono). Este producto recombinante se expresa en células de ovario de hámster chino (CHO) y tiene un perfil farmacocinético diferente al de la hCG producida a partir de orina humana.

25 Existe una heterogeneidad considerable asociada con las preparaciones de hCG que está relacionada con diferencias en las cantidades de diversas isoformas presentes. Las isoformas de hCG individuales muestran secuencias de aminoácidos idénticas pero difieren en la medida en la que se modifican postraduccionalmente; las isoformas particulares se caracterizan por la heterogeneidad de las estructuras de ramificación de carbohidratos y por diferentes cantidades de incorporación de ácido siálico (un azúcar terminal), pareciendo influir ambas en la bioactividad de la isoforma específica.

30 La glicosilación de productos de hCG recombinante ("rhCG") refleja la gama de glicosiltransferasas presentes en la línea de células huésped. El producto de rhCG existente, Ovitrelle, se deriva de células de ovario de hámster chino (células CHO) genomanipuladas. El abanico de modificaciones de glicanos en rhCG derivada de CHO es más limitado que el que se encuentra en los productos naturales, derivados de la orina. Los ejemplos de la heterogeneidad de glicano reducida que se encuentra en la rhCG derivada de CHO incluyen una carencia de glucosamina de bisección y un contenido reducido de fucosilación del núcleo y extensiones de acetil lactosamina. Además, las células CHO solo pueden añadir ácido siálico utilizando el enlace  $\alpha 2,3$  (Kagawa et al., 1988, Takeuchi et al., 1988, Svensson et al., 1990).

35 La hCG urinaria humana (es decir, la hCG extraída de la orina de mujeres embarazadas) que se ha utilizado hasta la fecha en el tratamiento de la infertilidad es, de hecho, hCG placentaria; hCG producida en la placenta (humana) y posteriormente excretada en la orina. Esta hCG se extrae de la orina para su uso como producto farmacéutico. Bousfield et al. (Rev Endocr Metab Disord (2011) 12: 289-302) afirman que "mientras que las gonadotropinas hipofisarias poseen ácido siálico unido tanto en  $\alpha 2,3$  como en  $\alpha 2,6$ , la hCG placentaria y las gonadotropinas recombinantes producidas en células de ovario de hámster chino poseen sólo ácido siálico unido en  $\alpha 2,3$ ". Por lo tanto, la hCG urinaria humana (que se produce en la placenta) incluye sólo la sialilación en  $\alpha 2,3$  (como los productos recombinantes derivados de la línea celular CHO). Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas conocidas que 40 incluyen hCG incluyen sólo ácido siálico unido en  $\alpha 2,3$ , pero no incluyen ácido siálico unido en  $\alpha 2,6$ .

Se ha demostrado que una preparación de FSH recombinante (Organon) difiere en las cantidades de FSH con un punto isoelectrico (pI) inferior a 4 (consideradas las isoformas ácidas) en comparación con la FSH hipofisaria, sérica o de orina posmenopáusica (Ulloa-Aguirre et al. 1995). La cantidad de isoformas ácidas en las preparaciones urinarias de FSH era muy superior en comparación con los productos recombinantes, Gonal-f (Serono) y Puregon (Organon) (Andersen et al. 2004). Esto debe reflejar un contenido molar inferior de ácido siálico en rFSH, dado que el contenido de glicano cargado negativamente modificado con sulfato es bajo en FSH. El contenido inferior de ácido siálico, en comparación con la FSH natural, es una característica de los dos productos de FSH disponibles comercialmente y, por lo tanto, debe reflejar una limitación en el proceso de fabricación (Bassett y Driebergen, 2005). La vida útil en 45 circulación de la FSH se ha documentado para materiales de una diversidad de fuentes. Algunos de estos materiales se han fraccionado basándose en la carga molecular global, caracterizada por su pI, en la que más ácido equivale a una carga negativa superior. El principal contribuyente a la carga molecular general es el contenido siálico total de cada molécula de FSH. Por ejemplo, rFSH (Organon) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 8 mol/mol, mientras que la FSH derivada de orina tiene un contenido de ácido siálico superior (de Leeuw et al. 1996). Las tasas de aclaramiento plasmático correspondientes en ratas son de 0,34 y de 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre et al. 2003). En otro ejemplo en el que se dividió una muestra de FSH recombinante en fracciones de pI alto y pI bajo, la 50

potencia *in vivo* de la fracción de pl alto (contenido inferior de ácido siálico) se redujo y presentó una semivida en plasma más corta (D'Antonio et al. 1999). Los solicitantes han descubierto que, al igual que la FSH, el producto de hCG recombinante derivado de CHO conocido (por ejemplo, Ovitrelle) también tiene una cantidad más reducida de hCG con un punto isoeléctrico (pl) inferior a 4 (consideradas las isoformas ácidas) que la hCG urinaria, lo que también refleja un contenido de ácido siálico más reducido del producto rhCG conocido en comparación con la hCG urinaria.

Los solicitantes han desarrollado una hCG recombinante derivada de seres humanos (es decir, una hCG recombinante que se produce o se expresa en una línea celular humana, por ejemplo producida mediante genomanipulación de una línea celular humana) que tiene un perfil más ácido que el producto de rhCG derivado de la línea celular CHO, Ovitrelle, y que tiene un contenido superior de ácido siálico. Esta rhCG es el objeto de la solicitud de patente internacional N° PCT/GB2010/001854, publicado como documento WO 2011/042688. Se produjo hCG recombinante con una mezcla de ácido siálico unido tanto en  $\alpha 2,3$  como en  $\alpha 2,6$  genomanipulando una línea celular humana para que expresara tanto rhCG como  $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. El producto expresado es muy ácido, tiene un contenido de ácido siálico [expresado en términos de una relación de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de, por ejemplo, 19,1 mol/mol, y porta una mezcla de ácidos siálicos unidos tanto en  $\alpha 2,3$  como en  $\alpha 2,6$ ; estos últimos vienen proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena. La investigación de los solicitantes indica que el tipo de enlace de ácido siálico,  $\alpha 2,3$  o  $\alpha 2,6$ , puede tener una influencia drástica sobre el aclaramiento biológico de hCG. Las líneas celulares humanas, a diferencia de las líneas celulares CHO, pueden expresar hCG recombinante con ácidos siálicos unidos por enlaces tanto  $\alpha 2,3$  como  $\alpha 2,6$ .

La línea celular del documento WO 2011/042688 expresa hCG recombinante derivada de seres humanos. No obstante, la línea celular también expresa un nivel relativamente alto de la cadena  $\beta$  libre (subunidad beta libre) y se requirió purificación (para eliminar esta cadena  $\beta$  libre del producto de hCG).

Los solicitantes han desarrollado ahora una nueva línea celular que expresa tanto rhCG como  $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa, y que produce rhCG con una cantidad reducida de cadena  $\beta$  libre, mejorando así el rendimiento y reduciendo el nivel de purificación del producto requerida (véase la figura 7).

Según la presente invención, se proporciona una célula (por ejemplo, una célula huésped) caracterizada porque comprende integrada en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG seleccionada de entre: una secuencia según la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene al menos el 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 1); una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO: 1); una secuencia según la SEQ ID NO: 4; una secuencia que tiene al menos el 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 4); y una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de la SEQ ID NO: 4). Preferentemente, la secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG no es la secuencia que está registrada en el banco como AH007338 (es decir, preferentemente, la secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG no es la que se muestra en la SEQ ID NO: 5). La célula puede comprender además integrado en su genoma un ADNc que codifica una alfa-2,3-sialiltransferasa, por ejemplo, una secuencia según la SEQ ID NO: 3. La célula puede comprender además integrada en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\beta$  de hCG, por ejemplo la secuencia según la SEQ ID NO: 2.

La célula huésped puede ser, por ejemplo, una célula PER.C6®, una célula HT1080, una célula GT-5s, etc. Preferentemente, la célula es una célula PER.C6®.

Se apreciará que las expresiones "una secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG" o "una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG" utilizadas en el presente documento también se refieren a una secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  de FSH (o una secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  de LH), porque la cadena  $\alpha$  de hCG es la misma que la de FSH (y LH).

El término "secuencia de ácido nucleico" en el presente documento se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que codifica polipéptidos tales como péptidos, proteínas, etc. Estas moléculas de ácido nucleico pueden consistir en ADN, ARN o análogos de los mismos. Sin embargo, se prefieren las moléculas de ácido nucleico que consisten en ADN.

El experto en la técnica es claramente consciente de que la modificación de una secuencia de nucleótidos de partida describe el proceso de optimización con respecto al uso de codones. Los cambios introducidos se pueden identificar fácilmente comparando la secuencia modificada y la secuencia inicial. Además, ambas secuencias (es decir, la secuencia inicial y la secuencia optimizada) codificarán la misma secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de la cadena  $\alpha$  de hCG humana se divulga en el documento WO2011/042688 (denominada SEQ ID 1 en dicho documento), y es la descrita por Fiddes y Goodman, 1979. Está registrada en el banco como AH007388, y se muestra como SEQ ID NO: 5 a continuación. La secuencia de aminoácidos de la cadena  $\beta$  de hCG humana se representa en la SEQ ID NO: 2 y está registrada en el banco como NP\_000728. Estas secuencias de aminoácidos corresponden a las secuencias de aminoácidos de tipo silvestre de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de hCG humana. Los términos "secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre" o "secuencia de ácido nucleico inicial", para los fines de la presente invención, se refieren a una secuencia de ácido nucleico que está destinada a utilizarse para (sobre)expresión en una célula huésped y que no se ha adaptado al uso de codón en la célula huésped, pero que es la secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre real que codifica la proteína. El término "secuencia de ácido nucleico optimizada", para los fines de la presente invención, se refiere a una secuencia que se ha modificado para expresión en una célula huésped adaptando la secuencia de la secuencia de ácido nucleico no modificada/inicial. Una secuencia de ácido nucleico optimizada codifica una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la proteína codificada por la secuencia no modificada. Los solicitantes han desarrollado secuencias optimizadas que codifican la cadena  $\alpha$  de hCG (véase, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1 y 4, figura 1).

Según la presente invención, en un aspecto adicional, se proporciona una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG) que comprende una secuencia seleccionada de una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 1; una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 4; una secuencia de ácido nucleico con al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1; y una secuencia de ácido nucleico con al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4.

Según la presente invención, en un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para producir hCG recombinante en una célula, que comprende cultivar la célula en un medio adecuado y recolectar la proteína recombinante (hCG) de dicha célula y/o de dicho medio (por ejemplo, recolectar el hCG recombinante del sobrenadante del cultivo celular), en el que la célula (célula huésped) comprende integrada en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG seleccionada de entre: una secuencia según la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene al menos el 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 [por ejemplo una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de la SEQ ID NO: 1]; una secuencia según la SEQ ID NO: 4; una secuencia que tiene al menos el 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de la SEQ ID NO: 4; y una secuencia que tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de la SEQ ID NO: 4. Preferentemente, la secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG no es la secuencia que está registrada en el banco como AH007388. La célula puede comprender además integrado en su genoma un ADNc que codifica una alfa-2,3-sialiltransferasa, por ejemplo una secuencia según la SEQ ID NO: 3. La célula puede comprender además integrada en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\beta$  de hCG, por ejemplo la secuencia según la SEQ ID NO: 2. El procedimiento puede incluir una etapa o etapas adicionales de purificación de la hCG recombinante obtenida de dicha célula y/o dicho medio (por ejemplo, purificación de la hCG recombinante a partir del sobrenadante del cultivo celular).

La célula (huésped) puede ser, por ejemplo, una célula PER.C6®, una célula HT1080, una célula GT-5s, etc. Preferentemente, la célula es una célula PER.C6®.

La secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG puede seleccionarse de entre: una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de la SEQ ID NO: 1); una secuencia según la SEQ ID NO: 4; una secuencia que tiene al menos el 90% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 4); y una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de la SEQ ID NO: 4). Preferentemente, la secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG no es la secuencia que está registrada en el banco como AH007388. La célula puede comprender además integrado en su genoma un ADNc que codifica una alfa-2,3-sialiltransferasa, por ejemplo una secuencia según la SEQ ID NO: 3. La célula puede comprender además integrada en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena  $\beta$  de hCG, por ejemplo la secuencia según la SEQ ID NO: 2. El procedimiento puede incluir una etapa o etapas adicionales de purificación de la hCG recombinante obtenida de dicha célula y/o de dicho medio (por ejemplo, purificación de la hCG recombinante a partir del sobrenadante del cultivo celular).

El término "célula huésped", para los fines de la presente invención, se refiere a cualquier célula que se utiliza comúnmente para la expresión, es decir, la transcripción y la traducción de secuencias de ácido nucleico para la producción de, por ejemplo, polipéptidos. En particular, el término "célula huésped" u "organismo" se refiere a

procariotas, eucariotas inferiores, plantas, células de insectos o sistemas de cultivo de células de mamíferos. Preferentemente, la célula huésped es una célula de mamífero, de forma más preferida la célula huésped es una célula humana, de forma incluso más preferida una célula PERC6®.

Se pretende que el término "molécula de ácido nucleico recombinante", en el sentido de la presente invención, comprenda todo tipo de moléculas de ácido nucleico que sean capaces de introducirse en una célula huésped y efectuar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que está contenida en la molécula de ácido nucleico recombinante. El término incluye, por ejemplo, vectores plasmídicos y vectores víricos (por ejemplo, vectores adenovíricos, lentivíricos y retrovíricos), como son bien conocidos en la técnica.

Se proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una (primera) secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG, (primera) secuencia de ácido nucleico que se selecciona a partir de una secuencia según la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene al menos el 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 1); una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de la SEQ ID NO: 1); una secuencia según la SEQ ID NO: 4; una secuencia que tiene al menos el 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 14; y una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de la SEQ ID NO: 4). La molécula de ácido nucleico recombinante comprende tanto una secuencia de ácido nucleico optimizada que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG humana como una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena  $\beta$  de hCG. Preferentemente, la (primera) secuencia de ácido nucleico se encuentra bajo el control de un promotor que es activo en una célula huésped. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende además una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena  $\beta$  de hCG. La segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena  $\beta$  de hCG puede ser la secuencia según la SEQ ID NO: 2.

La segunda secuencia de ácido nucleico puede encontrarse bajo el control de un promotor aparte que está activo en una célula huésped. La primera secuencia de ácido nucleico y/o la segunda secuencia de ácido nucleico pueden encontrarse bajo el control de un promotor vírico (por ejemplo, un promotor CMV).

Se proporciona una célula huésped que comprende o incluye una molécula de ácido nucleico recombinante tal como se ha establecido anteriormente (por ejemplo, una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una (primera) secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG, seleccionándose la (primera) secuencia de ácido nucleico a partir de una secuencia según la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene al menos el 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 1); una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de la SEQ ID NO: 1); una secuencia según la SEQ ID NO: 4; una secuencia que tiene al menos el 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 4); y una secuencia que tiene al menos el 97% de homología con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con (por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de la SEQ ID NO: 4).

Los solicitantes han descubierto que las células (células huésped), líneas celulares que incorporan estas células huésped, moléculas de ácido nucleico recombinantes, polinucleótidos y procedimientos de la invención pueden producir hCG recombinante con alto rendimiento y pureza (por ejemplo, con poca cadena beta libre).

La hCG recombinante ("rhCG" o "rechCG") incluye sialilación en  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$ , y la hCG recombinante se produce en una célula tal como se describe y se reivindica en el presente documento. La hCG recombinante 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 12 mol/mol a 20 mol/mol, por ejemplo, de 12 mol/mol a 15,5 mol/mol, por ejemplo, de 12 mol/mol a 14,9 mol/mol. La rhCG (o preparación de rhCG) puede tener un contenido de ácido siálico de 12,5 mol/mol a 14,5 mol/mol, por ejemplo, un contenido de ácido siálico de 12,8 mol/mol a 13,2 mol/mol. La rhCG (o preparación de rhCG) puede tener un contenido de ácido siálico de 13 mol/mol.

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

La hCG (o preparación de rhCG) recombinante producida por los procedimientos y las células de la invención incluye sialilación en  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$ . Por sialilación se entiende la cantidad de residuos siálicos presentes en las estructuras de

carbohidratos de hCG. Sialilación en  $\alpha 2,3$  significa sialilación en la posición 2,3 (como se sabe bien en la técnica); y sialilación en  $\alpha 2,6$  significa sialilación en la posición 2,6 (como también se sabe bien en la técnica). Por lo tanto, en el presente documento, la expresión "% de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha 2,3$ " se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la hCG que están sialilados en la posición 2,3. La expresión "% de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha 2,6$ " se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la hCG que están sialilados en la posición 2,6. La expresión "% de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha 2,8$ " se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la hCG que están sialilados en la posición 2,8.

La rhCG (o preparación de rhCG) producida por medio de los procedimientos y las células según la invención puede tener del 1% al 99% de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha 2,3$ . La rhCG (o preparación de rhCG) producida por medio de los procedimientos y las células según la invención puede tener del 1% al 90% de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha 2,3$ . La rhCG (o preparación de rhCG) según la invención puede tener el 10% o más de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha 2,3$ , por ejemplo, entre el 10% y el 90% de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha 2,3$ . Por ejemplo, el 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 o 90% o más de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha 2,3$ . Del 45% al 80% de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha 2,3$ , por ejemplo, del 50% al 70% de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha 2,3$ , por ejemplo del 55 al 65% de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha 2,3$ . La rhCG (o preparación de rhCG) puede incluir sialilación en  $\alpha 2,3$  en una cantidad que es del 65 al 95% de la sialilación total, por ejemplo, del 70 al 90% de la sialilación total, por ejemplo del 85 al 90% de la sialilación total.

La rhCG (o preparación de rhCG) producida por los procedimientos y células de la invención puede tener del 1 al 99% de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha 2,6$ . La rhCG (o preparación de rhCG) de la invención puede tener del 5 al 50% de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha 2,6$ . Por ejemplo del 5 al 45%, por ejemplo del 6 al 40%, por ejemplo del 7 al 30%, por ejemplo del 8 al 20% de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha 2,6$ . La rhCG (o preparación de rhCG) puede incluir sialilación en  $\alpha 2,6$  en una cantidad que es el 20-75% de la sialilación total, por ejemplo, el 30-60% de la sialilación total, por ejemplo el 35-45% de la sialilación total. La rhCG (o preparación de rhCG) puede incluir sialilación en  $\alpha 2,6$  en una cantidad que es del 5 al 35% de la sialilación total, por ejemplo, del 10 al 20% de la sialilación total. Por ejemplo, el 11-55% de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha 2,6$ .

La preparación de rhCG o rhCG producida por los procedimientos y las células puede incluir opcionalmente además sialilación en  $\alpha 2,8$ . La rhCG (o preparación de rhCG) de la invención puede tener el 5% o menos de la sialilación total que es sialilación en  $\alpha 2,8$ , por ejemplo, del 0 al 4%, por ejemplo el 0,1-4% de la sialilación total puede ser sialilación en  $\alpha 2,8$ . La rhCG (o preparación de rhCG) de la invención puede no tener sialilación en  $\alpha 2,8$ .

La rhCG (o preparación de rhCG) producida por medio de los procedimientos y las células según la invención puede tener un contenido de ácido siálico (cantidad de sialilación por molécula de hCG) de (con respecto a la masa de proteína, en lugar de la masa de proteína más carbohidrato) del 6% o superior (por ejemplo entre el 6% y el 15%, por ejemplo entre el 7% y el 13%, por ejemplo entre el 8% y el 12%, por ejemplo entre el 11% y el 15%, por ejemplo entre el 12% y el 14%) en masa.

La rhCG (o preparación de rhCG) puede producirse o expresarse en una línea celular humana, por ejemplo, una línea celular PER.C6®, una línea celular HT1080, etc. La rhCG (o preparación de rhCG) puede producirse o expresarse en un línea celular derivada de seres humanos o una línea celular humana modificada, por ejemplo, una línea celular derivada de PER.C6® o una línea celular PER.C6® modificada, una línea celular HT1080 modificada o una línea celular derivada de HT1080, etc. En un ejemplo preferido, la rhCG se produce o se expresa en una línea celular PER.C6®, una línea celular derivada de PER.C6® o una línea celular PER.C6® modificada. La rhCG que se produce o se expresa en una línea celular humana (por ejemplo, una línea celular PER.C6®, una línea celular HT1080, una línea celular GT-5s) incluirá algunos ácidos siálicos unidos en  $\alpha 2,6$  (sialilación en  $\alpha 2,6$ ) proporcionados por actividad de sialiltransferasa endógena [de la línea celular] e incluirá algunos ácidos siálicos unidos en  $\alpha 2,3$  (sialilación en  $\alpha 2,3$ ) proporcionados por actividad de sialiltransferasa endógena [de la línea celular]. La línea celular se puede modificar utilizando  $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. Como alternativa o adicionalmente, la línea celular puede modificarse utilizando  $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa. Esto puede simplificar (y hacer más eficaz) el procedimiento de producción porque 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 procedimiento también puede ser más eficaz porque se produce poca rhCG básica en comparación con la producción de productos de rhCG conocidos; se produce más rhCG ácida y la separación/eliminación de hCG básica es menos problemática.

La rhCG puede producirse utilizando una  $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa, por ejemplo, puede producirse utilizando una línea celular humana modificada usando una  $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. La rhCG puede incluir ácidos siálicos unidos en  $\alpha 2,6$  (sialilación  $\alpha 2,6$ ) proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena. La rhCG puede producirse utilizando una  $\alpha 2,3$ - y/o una  $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa, por ejemplo, puede producirse utilizando una línea celular humana modificada usando una  $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa y/o una  $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa.

La estructura de rhCG contiene restos de glicano. Puede producirse ramificación, con el resultado de que el glicano puede tener 1, 2, 3, 4 o más residuos terminales de azúcar o "antenas", tal como se sabe bien en la técnica. La rhCG según aspectos de la invención puede tener glicanos con estructuras de glicano mono-antenarias y/o di-antenarias y/o tri-antenarias y/o tetra-antenarias. La rhCG puede incluir estructuras de glicano mono-antenarias y/o bi-antenarias

y/o tri-antenarias y/o tetra-antenarias, por ejemplo, con las cantidades relativas siguientes: del 0,1 al 3% mono-antenarias; del 65% al 85% bi-antenarias; del 15 al 25% tri-antenarias y del 0,5 al 1,5% tetra-antenarias (por ejemplo, tal como se muestra en el análisis WAX de glicanos cargados).

- 5 Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una hCG recombinante (rhCG) que tiene sialilación en  $\alpha 2,3$  y sialilación en  $\alpha 2,6$ , produciéndose la hCG recombinante mediante los procedimientos y/o las células que se divulgan en el presente documento. La rhCG 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 12 mol/mol a 15,5 mol/mol, por ejemplo, de 12 mol/mol a 14,9 mol/mol (por ejemplo, tal como se ha establecido anteriormente). La rhCG puede tener un  
10 contenido de ácido siálico de 12,5 mol/mol a 14,5 mol/mol, por ejemplo, un contenido de ácido siálico de 12,8 mol/mol a 13,2 mol/mol. Preferentemente, la rhCG tiene un contenido de ácido siálico de 13 mol/mol.

La composición farmacéutica puede comprender además FSH y/o LH.

- 15 La FSH puede obtenerse por cualquier medio conocido en la técnica. La FSH, tal como se utiliza en el presente documento, incluye FSH derivada de seres humanos y recombinante. La FSH derivada de seres humanos se puede purificar a partir de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina) mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. La FSH puede ser FSH recombinante, por ejemplo, expresada en una línea celular humana. Los  
20 procedimientos de expresión y purificación de FSH recombinante son bien conocidos en la técnica.

- La LH puede obtenerse por cualquier medio conocido en la técnica. La LH, tal como se utiliza en el presente documento, incluye LH derivada de seres humanos y recombinante. La LH derivada de seres humanos se puede purificar a partir de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina) mediante cualquier procedimiento conocido en la  
25 técnica. Los procedimientos de expresión y purificación de LH recombinante son conocidos en la técnica.

- La composición farmacéutica puede ser para, o para su uso en, 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 puede utilizarse para desencadenar la maduración final/ovulación y luteinización, la estimulación del desarrollo folicular en mujeres con deficiencia grave de LH y FSH y/o en soporte lúteo (rhCG/rLH).  
30 La composición farmacéutica puede ser para, o para su uso en, la inducción de desarrollo monofolicular en mujeres anovulatorias de tipo II según la OMS (por ejemplo, rhCG con rLH), para mejorar la respuesta multifolicular con cebado de LH en pacientes sometidas a COH (por ejemplo, rhCG con rLH) y para complementar la COH para mejorar las tasas de implantación/embarazo (por ejemplo, rhCG con rLH) y/o aumentar las tasas de embarazo en tecnologías de reproducción asistida. La composición farmacéutica puede ser para, o para su uso en, la prevención de abortos espontáneos y/o la prevención de la prematuridad. La composición farmacéutica puede ser para, o para su uso en, el  
35 tratamiento de la endometriosis.

- La composición farmacéutica puede utilizarse, por ejemplo, en indicaciones médicas en las que se utilizan preparaciones de hCG conocidas.  
40

- Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo, oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parches), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, ungüentos o gotas) o como pulverización bucal o nasal. Una composición típica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal  
45 como una solución acuosa, excipientes no tóxicos, que incluyen sales y conservantes, tampones y similares, tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimoquinta edición (Matt Publishing Company, 1975), páginas 1405 a 1412 y 1461-87, y el formulario nacional XIV, decimocuarta edición (American Pharmaceutical Association, 1975), entre otros. Los ejemplos de portadores, 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 el aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Las composiciones también pueden contener aditivos  
50 tales como, pero sin limitación, 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, m-cresol, alcohol bencílico, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Además, puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares.  
55

- En algunos casos, para lograr una acción prolongada, es deseable ralentizar la absorción de hCG (y otros ingredientes activos, si están presentes) a partir de una inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en agua. La tasa de absorción  
60 de hCG depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma de combinación de hCG administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo la combinación de hCG en un vehículo oleoso. Pueden producirse formas de depósito inyectables formando matrices microencapsuladas de hCG (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables tales como polilactida-polglicolida. Dependiendo de la relación de hCG con respecto al polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación de hCG. Los  
65 ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polivinilpirrolidona, poli(ortoésteres), poli(anhídridos), etc. Las

formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando la hCG en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante incorporación de 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 recipiente adecuado, por ejemplo, un vial, una jeringa precargada, cartuchos de inyección y similares.

Las formulaciones (por ejemplo, la formulación inyectable) se pueden suministrar como un producto que tiene composiciones farmacéuticas que contienen hCG (opcionalmente con FSH, LH, etc.) Si hay más de un ingrediente activo (es decir, hCG y, por ejemplo, FSH o LH), estas pueden ser adecuadas para la administración por separado o conjuntamente. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto puede suministrarse en cualquier envase apropiado. Por ejemplo, un producto puede contener varias jeringas precargadas o viales que contienen hCG, FSH o una combinación de FSH y hCG. Las jeringas o viales pueden envasarse en un envase de tipo blíster u otros medios para mantener la esterilidad. Un producto puede contener opcionalmente instrucciones para el uso de las formulaciones de hCG y FSH.

El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según la práctica rutinaria en este campo. Véase GOODMAN y GILMAN, THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7ª ed. En una forma de realización preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para administración parenteral. Los procedimientos generales para la preparación de las formulaciones de uso parenteral se conocen en la técnica y se describen en REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, citado anteriormente, en las páginas 780-820. Las composiciones de uso parenteral pueden suministrarse en una formulación líquida o como un sólido que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de su administración. En una forma de realización, las composiciones de uso parenteral se suministran en forma de dosificación unitaria para proporcionar facilidad la administración y uniformidad de la dosificación.

#### Descripción detallada de la invención

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

La figura 1 muestra secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos derivadas de la secuencia alfa de hCG optimizada;

La figura 2 muestra secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos derivadas de la secuencia beta de hCG;

La figura 3 muestra secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos derivadas de ST3GAL4;

La figura 4 muestra un mapa plasmídico del vector de expresión de phCGalfa/beta;

La figura 5 muestra el vector de expresión de  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4);

La figura 6 muestra la detección de isoformas de rhCG mediante tinción de IEF con azul de Coomassie en composiciones según la invención (carriles 4, 5, 6 y 7, 15  $\mu$ g por carril); la composición derivada de CHO de la técnica anterior, Ovitrelle (carril 2, 15  $\mu$ g); y un producto urinario humano obtenido de mujeres embarazadas Novarel (carril 3, 15  $\mu$ g); y

La figura 7 compara la concentración de hCG ("alfa-beta CG") y la cadena beta libre ("beta CG") producidas utilizando las células de la invención que incluyen la secuencia nucleica "optimizada" de la subunidad alfa, en comparación con la concentración de hCG ("alfa-beta CG") y cadena beta libre ("beta hCG") producidas en células de ejemplo comparativas que incluyen la subunidad alfa WT (tipo silvestre);

#### Ejemplos 1 a 7

Descripción general del proceso de desarrollo de una línea celular

Un único plásmido que porta cadenas alfa y beta de hCG, cada una controlada por un promotor CMVie separado, se transfectó en células PER.C6® mediante electroporación.

Este plásmido portaba un casete de genes de resistencia a neomicina (figura 4) que permitía la selección de transfectantes utilizando G418 (geneticina). Se expandieron mezclas de transfectantes y después se sometieron a clonación por dilución limitante en placas de 96 pocillos bajo selección por G418. Las líneas clonales se expandieron y las colonias de alta expresión se identificaron basándose en el título de hCG en el sobrenadante del cultivo celular.

Se seleccionaron cinco clones candidatos, basándose en su alta productividad, y cada uno se transfectó después con un segundo plásmido que expresaba el gen de la  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa ST3GAL4 junto con el marcador de selección



de higromicina (figura 5). Cada una de las cinco mezclas de transfección se expandió y los sobrenadantes de cultivo celular se evaluaron para determinar la concentración de hCG y la farmacocinética (PK) *in vivo*.

A continuación, las mezclas prometedoras se sometieron a otra ronda de clonación por dilución limitada. Los clones resultantes se expandieron y los sobrenadantes del cultivo celular se evaluaron para determinar la concentración de hCG y la galactosa expuesta en la proteína hCG (mediante ELISA de lectina). Aquellos con un nivel bajo de galactosa expuesta se sometieron a ensayos adicionales que incluyen PK *in vivo*. Se evaluaron y se seleccionaron los clones que produjeron hCG con perfiles de PK óptimos, que tenían un nivel reducido de galactosa expuesta y que expresaban la proteína en niveles altos, y se seleccionaron por sus características de productividad y crecimiento.

### Ejemplo 1: Selección de secuencia y vectores plasmídicos

La región codificante del gen para el polipéptido alfa de hCG se muestra en la figura 1. La región codificante del gen para la secuencia del polipéptido alfa de hCG se denomina en el presente documento SEQ ID NO: 1.

La región codificante del gen para el polipéptido beta de hCG se utilizó según Fiddes y Goodman (1980). La secuencia está registrada en el banco como NP\_000728 y es acorde con las secuencias de proteínas de CGbeta3, CGbeta5 y CGbeta7. La secuencia se denomina en el presente documento SEQ ID NO: 2

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

Se utilizaron dos plásmidos: el primero, pHCG, coexpresa las cadenas alfa y beta de hCG; y el segundo expresa el gen de la sialiltransferasa ST3GAL4.

### Ejemplo 2a: Construcción del vector de expresión de hCG

El pHCG es una cadena alfa de hCG sintética, optimizada para el uso de codones en células de mamíferos que incluyen el péptido señal alfa de hCG nativo. Puede diseñarse mediante ingeniería genética utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

La secuencia codificante del polipéptido alfa de hCG (SEQ ID NO: 1) y el polipéptido beta de hCG (NP\_000728, SEQ ID NO: 2) se amplificaron mediante PCR utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional publicada como WO2011/042688). El ADN de alfa de pHCG se digirió con *Bam*HI y *Nhe*I y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Nhe*I en un vector de expresión de mamífero dirigido por CMV (vector de Crucell pcDNA3002Neo). Este dispuso el gen en la orientación correcta para la expresión dirigida por un promotor CMVie con una señal poliA de BGH cadena abajo. El gen beta de hCG nativo, que incluye el péptido señal nativo, se digirió con las enzimas de restricción *As*cl y *Hpa*I y se insertó en los sitios *As*cl y *Hpa*I de modo que la expresión fuera dirigida por un segundo promotor CMVie con una señal poli A de BGH cadena abajo adicional. El esqueleto del vector también incluía un marcador de resistencia a neomicina, así como elementos necesarios para la selección y la replicación en células procariotas. El vector se amplificó y se secuenció utilizando procedimientos generales conocidos en la técnica. Las secuencias de las cadenas alfa de hCG optimizada y beta nativa (tipo silvestre) se proporcionan en las figuras 1 y 2, respectivamente.

Todas las colonias seleccionadas para la secuenciación contenían las secuencias correctas según la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2. Se seleccionó el plásmido pHCG A + B para la transfección (figura 4).

### Ejemplo 2b: Construcción del vector de expresión de ST3

El gen ST3GAL4 se expresa en pST3. La secuencia codificante de beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (ST3, L23767, SEQ ID NO: 3, figura 3) se amplificó mediante PCR utilizando la combinación de cebadores 2,3STfw y 2,3STrev.

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'

2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

El ADN de ST3 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *A*III y se insertó en los sitios *Bam*HI y *A*III en el vector de expresión de mamífero dirigido por CMV que porta un marcador de resistencia a higromicina (vector pcDNA3002Neo) de forma que se localizara cadena abajo del promotor de CMVie y cadena arriba de la secuencia poliA de BGH. El esqueleto del vector también incluía un marcador de resistencia a higromicina, así como elementos necesarios para la selección y la replicación en células procariotas. El vector se amplificó tal como se ha descrito anteriormente y se secuenció. El clon pST3 # 1 (figura 5) contenía la secuencia correcta según la SEQ ID NO: 3 y se seleccionó para transfección.

### Ejemplo 3: Transfección de plásmidos

El plásmido phCG (figura 4), que tiene un único sitio PvuI ubicado en el gen de la beta-lactamasa procariota, se linealizó con PvuI (New England Biolabs N° de cat. R0150). El ADN plasmídico linealizado se transfectó en células PER.C6® de la forma siguiente.

Se mantuvieron cultivos celulares en medio PERMAB completo (CD4PERMAB (Hyclone N° de cat. SH30871.01) suplementado con L-glutamina a una concentración final 3 mM (Invitrogen N° de cat. 25030-123) y Pluronic F68 a una concentración final de 1,0 g/l (Invitrogen N° de cat. 24040-032) en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Las células se mantuvieron en una incubadora con agitación (Kuhner Climo-shaker ISF1-X) a 100 rpm, 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C, durante al menos 14 días antes de la transfección. Las células se transfirieron a medio nuevo a una densidad de 0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml 48 horas antes de la transfección.

El día de la transfección, las células se contaron en un Beckman Coulter ViCell XR para determinar la densidad celular y asegurar que la viabilidad fuera > 90%. Las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en medio PERMAB nuevo antes de mezclarlas con ADN de phCG linealizado. La mezcla de células/ADN se sometió a electrochoque en la cámara de un electroporador ajustada a 250 V durante 5 ms, antes de transferirla rápidamente a 10 ml de medio PERMAB precalentado. Este proceso se repitió un total de 6 veces y las 6 transfecciones se mezclaron en un único matraz de cultivo de tejidos T-175 cm<sup>2</sup>. El matraz se dispuso en una incubadora estática ajustada a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 48 horas, las células se resuspendieron en el volumen apropiado de PERMAB selectivo (medio PERMAB completo + G418 (125 µg/ml)) para proporcionar una densidad celular viable de 0,5 x 10<sup>6</sup>/ml.

Se realizó un pasaje del cultivo de la mezcla dos veces por semana, manteniendo las células a una densidad de 0,3 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio selectivo hasta que la viabilidad celular aumentó a > 50%. En este punto, las células se transfirieron a cultivos en agitación en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Después de varias semanas en cultivo con agitación, se tomaron muestras del sobrenadante de la mezcla y se evaluó la concentración de hCG. Una vez que se estableció que la mezcla era positiva para la expresión de hCG, las células se prepararon para la clonación por dilución limitada.

Se preparó una suspensión celular a 0,3 células viables/ml en medio PERMAB suplementado con G-418 a 125 µg/ml. La suspensión celular se dispensó en placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos a 200 µl/pocillo y se incubó en una atmósfera humidificada a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> (aglutinante CB150). Las placas se escanearon con regularidad utilizando el generador de imágenes Genetix Clone Select para rastrear el crecimiento de las células en cada pocillo.

Después de dos semanas, se identificaron 535 pocillos que contenían colonias de células en crecimiento activo. Se tomaron muestras de los sobrenadantes de estos pocillos y se analizaron para determinar la hCG utilizando un kit comercial (DRG diagnostics HCG ELISA N° de cat. EIA1469). Basándose en los resultados de estos ensayos, se transfirió un total de 162 de las colonias a placas de 24 pocillos que contenían 0,5 ml/pocillo de medio PERMAB selectivo. Cuando las células de los pocillos estaban cerca de la confluencia, se tomaron muestras del sobrenadante de cada uno de los 162 pocillos y se evaluaron los niveles de hCG. Basándose en estos resultados, se seleccionaron 91 de las líneas celulares de mejor expresión para expandirlas en matraces T-25. Estas líneas celulares se cultivaron de nuevo hasta cerca de la confluencia, momento en el que se tomaron muestras de los sobrenadantes y se analizaron para determinar la hCG como anteriormente. Basándose en estos resultados, las 58 líneas celulares de mejor expresión se expandieron en matraces T-75. El análisis de la tasa de producción específica (SPR) se realizó en cada una de estas 58 líneas celulares mediante procedimientos conocidos en la técnica y la productividad específica se expresó en pg/célula/día.

Por lo tanto, en este ejemplo se transfectó un plásmido que incorporaba cadenas alfa y beta de hCG en células PER.C6® y se seleccionaron los transfectantes utilizando medio que contenía G418. Las colonias de células en crecimiento se cribaron para determinar la concentración de hCG en el sobrenadante y las que expresaban el nivel más alto se expandieron adicionalmente. Después de rondas subsiguientes de expansión y cribado, se seleccionaron 20 clones que expresaban hCG para estudios de crecimiento y productividad. Basándose en los resultados de estos estudios, se seleccionaron 5 clones para la transfección con un segundo plásmido que incorpora el gen ST3GAL4.

### Ejemplo 4: Transfección con el plásmido pST3 de ST3GAL4

Se generaron clones estables tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 3.

Los cinco mejores clones producidos mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 3 se seleccionaron para transfección con el plásmido pST3 de ST3GAL4 (véase el ejemplo 2, figuras 3 y 5). La transfección se realizó mediante electroporación utilizando el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo 3, excepto que los transformantes se seleccionaron en medio PERMAB completo suplementado con higromicina a 0,5 µg/ml en lugar de G418. Utilizando este procedimiento, se obtuvieron cinco mezclas que expresaban hCG.

Se analizaron muestras de sobrenadantes de las mezclas de transfección en un modelo farmacocinético de rata y, basándose en estos datos, junto con los datos del ensayo de unión de RCA-lectina (midiendo la galactosa expuesta en las cadenas de hCG), se seleccionó una única mezcla para clonación por dilución limitada adicional, mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Esta clonación por dilución produjo > 600 clones, cada uno de los cuales también se cribó para determinar la expresión de hCG y el grado de galactosa expuesta medido por unión de RCA-lectina. Los clones con los niveles más bajos de galactosa expuesta se expandieron adicionalmente y las muestras se sometieron a PK *in vivo* y datos de corroboración de unión a lecitina. Se evaluaron además cinco clones derivados de la única mezcla para determinar las características de crecimiento y productividad.

Cada uno de estos clones se expandió y se produjo un banco celular de reservas para siembra siguiendo procedimientos estándar de criopreservación. Las reservas del banco celular de reservas para siembra se descongelaron y se comprobó que eran viables.

#### **Ejemplo 5: Análisis por enfoque isoelectrónico**

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

El enfoque isoelectrónico (IEF) es una técnica electroforética para la separación de proteínas en función de su pI. El pI 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 hCG altera sutilmente el punto pI para cada isoforma, que se puede explotar utilizando esta técnica para visualizar las isoformas de hCG de Per.C6 de cada clon.

Los puntos isoelectrónicos de las isoformas de hCG producidas por Per.C6 se analizaron utilizando enfoque isoelectrónico. La hCG de Per.C6 se produjo tal como se describe en el ejemplo 6.

Las muestras de hCG de Per.C6 se separaron en geles Novex® IEF que contenían poliacrilamida al 5% en condiciones nativas en un gradiente de pH 3,0 - 7,0 en una solución anfótera a pH 3,0 - 7,0. Las proteínas se visualizaron usando tinción con azul de Coomassie, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

La figura 6 muestra la detección de isoformas de rhCG mediante tinción de IEF con azul de Coomassie en composiciones producidas según la invención producidas a partir de las líneas celulares clonadas preparadas mediante el procedimiento establecido en los ejemplos 6 (carriles 4, 5, 6 y 7, 15 µg por carril); la composición derivada de CHO de la técnica anterior, Ovitrelle (carril 2, 15 µg); y un producto urinario humano obtenido de mujeres embarazadas Novarel (carril 3, 15 µg). Las bandas representan isoformas de hCG que contienen diferentes cantidades de moléculas de ácido siálico. La figura 6 indica que la hCG recombinante derivada de la línea celular humana genomanipulada con α2,3-sialiltransferasa (composiciones según la invención) es más ácida que Ovitrelle y la hCG urinaria de mujeres embarazadas.

La figura 7 compara la concentración de hCG ("alfa-beta hCG") y la cadena beta libre ("beta hCG") producidas utilizando las células de la invención (es decir, utilizando líneas celulares producidas mediante el procedimiento establecido en los ejemplos 1 a 4) que incluyen la subunidad alfa "optimizada", en comparación con la concentración de hCG ("alfa-beta hCG") y la cadena beta libre ("beta hCG") producidas en células de ejemplo comparativas, incluida la subunidad alfa WT (de tipo silvestre). La figura 7 muestra que las células de la invención expresan altas cantidades de hCG y un bajo exceso de la subunidad beta libre. En otras palabras, se mejora significativamente el rendimiento y la pureza de la hCG recombinante producida por las células y los procedimientos de la invención.

La tabla A indica el porcentaje de subunidades de β-hCG libres en muestras semipurificadas de varios lotes de hCG producidos utilizando las células de la invención (es decir, utilizando líneas celulares preparadas mediante el procedimiento establecido en los ejemplos 1 a 4) que incluyen la subunidad alfa "optimizada" ("alfa hCG opt."), en comparación con el porcentaje de subunidades de β-hCG libres en muestras semipurificadas de hCG producidas en células de ejemplo comparativas, incluida la subunidad alfa WT (de tipo silvestre) ("alfa hCG WT"), según se determina mediante cromatografía HPLC con fenil-5PW hidrófobo.

La tabla A muestra que las células de la invención expresan altas cantidades de hCG y un exceso bastante menor de la subunidad beta libre (5,7 - 10,6%) en comparación con las células que incluyen la subunidad alfa WT (64 - 66%). En otras palabras, se mejora significativamente el rendimiento y la pureza de la hCG recombinante producida por las células y los procedimientos de la invención.

Tabla A

| Clon                 | % de $\beta$ -hCG libre (PHE-5PW) |
|----------------------|-----------------------------------|
| alfa hCG WT (1G2)    | 64,1                              |
| alfa hCG WT (1G2)    | 66,0                              |
| alfa hCG opt. (13,8) | 5,7                               |
| alfa hCG opt. (29)   | 7,5                               |
| alfa hCG opt. (29)   | 6,6                               |
| alfa hCG opt. (29)   | 10,6                              |

**Ejemplo 6: Descripción general de la producción y la purificación**

Se desarrolló un procedimiento para producir hCG recombinante en células PER.C6 que se cultivaron en suspensión en medio carente de suero. El procedimiento se describe a continuación y se aplicó a varias líneas celulares PER.C6 productoras de hCG.

Se preparó hCG recombinante de un clon transfectado con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa utilizando los procedimientos de los ejemplos 1 a 4 descritos anteriormente.

Las células se cultivaron en matraces con agitación en medio 6GRO (SAFC) hasta que se logró una densidad celular de  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  células/ml. Las células se transfirieron a un biorreactor de tanque con agitación de vidrio de 5 l con una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml. El biorreactor operó en modo de perfusión utilizando un medio Proper1 (Lonza).

Posteriormente, se llevó a cabo la purificación del producto rhCG utilizando varias etapas de ultrafiltración, cromatografía de captura de intercambio aniónico y catiónico, cromatografía hidrófoba y cromatografía de pseudoafinidad, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Durante todos los procedimientos cromatográficos, la presencia de hCG recombinante inmunorreactiva se confirmó mediante ELISA (DRG EIA 1469) e IEF (ejemplo 5).

**Ejemplo 7: Contenido de ácido siálico**

El ácido siálico es un carbohidrato unido a proteína que se considera un monosacárido y se presenta en combinación con otros monosacáridos tales como galactosa, manosa, glucosamina, galactosamina y fucosa. El ácido siálico total en rhCG purificada según la invención se midió utilizando un procedimiento basado en el procedimiento de Stanton et al. (J. Biochem. Biophys. Methods. 30 (1995), 37 - 48).

Se midió el contenido total de ácido siálico de las muestras de hCG recombinante de Per.C6 modificada con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (producida mediante los procedimientos de los ejemplos 4 y 6) y los resultados se proporcionan en la tabla 1 siguiente [expresados en términos de una relación de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína].

**Ejemplo 8: Bioensayo de hCG según la USP**

Se llevó a cabo un bioensayo de hCG, con el fin de determinar la actividad específica de hCG, para cada una de las muestras de la tabla 1 siguiente. La actividad se midió según la USP (USP Monographs: Chorionic Gonadotropin, USPC Official 8/1/09-11/30/09), utilizando Ovitrelle como patrón. El Ovitrelle tiene una actividad biológica de 26.000 UI/mg (Curr Med Res Opin. 2005 de diciembre; 21 (12): 1969 - 76). El límite de aceptación fue  $> 21.000$  UI de hCG/mg. La actividad biológica para muestras de hCG recombinantes de hCG derivadas de líneas celulares humanas genomanipuladas con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

| Muestra                                                                             | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Contenido de ácido siálico (AS)<br>( $\mu\text{mol}$ de AS/ $\mu\text{mol}$ de hCG) | 13    | 13    | 13    | 13    | 13    | 15    |
| Potencia UI/mg                                                                      | 25363 | 25009 | 24904 | 24623 | 25645 | 26623 |
| % de potencia<br>(Ovitrelle 26000 UI/mg)                                            | 97,5  | 96,2  | 95,8  | 94,7  | 98,6  | 102,4 |
| Muestra                                                                             | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    |       |
| Contenido de ácido siálico (AS)<br>( $\mu\text{mol}$ de AS/ $\mu\text{mol}$ de hCG) | 14    | 14    | 13    | 13    | 13    |       |
| Potencia UI/mg                                                                      | 27227 | 26142 | 26539 | 26181 | 24230 |       |
| % de potencia<br>(Ovitrelle 26000 UI/mg)                                            | 104,7 | 100,5 | 102   | 101   | 93,2  |       |

Tal como se observó anteriormente, la potencia es similar y puede ser superior a la de Ovitrelle (véase, por ejemplo, la muestra 7).

#### 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.

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

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.

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.

Fiddes, J. C. y Goodman, H. M. (1980) The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. *Nature*, 286, 684-387.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

- 5 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.

#### Alfa de hCG optimizada

#### 10 Secuencia de nucleótidos de alfa de hCG optimizada (SEQ ID NO: 1)

```

1  ATGGACTACT  ACCGGAAGTA  CGCCGCCATC  TTCCTGGTGA  CCCTGAGCGT
GTTCTCTGCAC
61  GTGCTGCACA  GCGCCCCTGA  CGTGCAGGAC  TGCCCCGAGT  GCACCCTGCA
GGAAAACCCC
121  TTCTTCAGCC  AGCCTGGCGC  CCCTATCCTG  CAGTGCATGG  GCTGCTGCTT
CAGCAGAGCC
181  TACCCACCCC  CCCTGCGGAG  CAAGAAAACC  ATGCTGGTGC  AGAAAAACGT
GACCAGCGAG
241  AGCACCTGCT  GCGTGGCCAA  GAGCTACAAC  CGGGTGACCG  TGATGGGCGG
CTTCAAGGTG
301  GAGAACCACA  CCGCCTGCCA  CTGCAGCACC  TGCTACTACC  ACAAGTCCT

```

#### Secuencia de proteínas de alfa de hCG optimizada

- 15
- ```

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

```

#### Polipéptido beta de gonadotropina coriónica humana

#### 20 Número de acceso NP\_000728

#### Secuencia de nucleótidos de beta de hCG (SEQ ID NO: 2)

#### Secuencia de nucleótidos

- 25
- ```

1  ATGGAGATGT  TCCAGGGGCT  GCTGCTGTTG  CTGCTGCTGA  GCATGGGCGG
GACATGGGCA
61  TCCAAGGAGC  CGCTTCGGCC  ACGGTGCCGC  CCCATCAATG  CCACCCTGGC
TGTGGAGAAG
121  GAGGGCTGCC  CCGTGTGCAT  CACCGTCAAC  ACCACCATCT  GTGCCGGCTA
CTGCCCCACC
181  ATGACCCGCG  TGCTGCAGGG  GGTCTTGCCG  GCCCTGCCTC  AGGTGGTGTG
CAACTACCGC
241  GATGTGCGCT  TCGAGTCCAT  CCGGCTCCCT  GGCTGCCCGC  GCGGCGTGAA
CCCCGTGGTC
301  TCCTACGCCG  TGGCTCTCAG  CTGTCAATGT  GCACTCTGCC  GCCGCAGCAC
CACTGACTGC
361  GGGGGTCCCA  AGGACCACCC  CTTGACCTGT  GATGACCCCC  GCTTCCAGGA
CTCCTCTTCC
421  TCAAAGGCCC  CTCCCCCAG  CCTTCCAAGT  CCATCCCGAC  TCCCGGGGCC
CTCGGACACC
481  CCGATCCTCC  CACAATAA

```

**Secuencia de proteínas de beta de hCG**

1 MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN  
TTICAGYCPT  
61 MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC  
ALCRRSTTDC  
121 GGPKDHPLTC DDPREFQDSSS SKAPPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ

**5 Beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4**

Número de acceso L23767

**Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4 (SEQ ID NO: 3)**

10

|     |             |            |             |            |            |
|-----|-------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1   | ATGTGTCTCTG | CAGGCTGGAA | GCTCCTGGCC  | ATGTTGGCTC | TGGTCCTGGT |
|     | CGTCATGGTG  |            |             |            |            |
| 61  | TGGTATTCCA  | TCTCCCGGGA | AGACAGGTAC  | ATCGAGCTTT | TTTATTTTCC |
|     | CATCCCAGAG  |            |             |            |            |
| 121 | AAGAAGGAGC  | CGTGCCTCCA | GGGTGAGGCA  | GAGAGCAAGG | CCTCTAAGCT |
|     | CTTTGGCAAC  |            |             |            |            |
| 181 | TACTCCCGGG  | ATCAGCCCAT | CTTCTGCGG   | 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  | TGCGTCTCTT | CTACCCTGAA  | TCTGCCCACT | TCGACCCCAA |
|     | AGTAGAAAAC  |            |             |            |            |
| 541 | AACCCAGACA  | CACTCCTCGT | CCTGGTAGCT  | TTCAAGGCAA | TGGACTTCCA |
|     | CTGGATTGAG  |            |             |            |            |
| 601 | ACCATCCTGA  | GTGATAAGAA | GCGGGTGCGA  | AAGGGTTTCT | GGAAACAGCC |
|     | TCCCCTCATC  |            |             |            |            |
| 661 | TGGGATGTCA  | ATCCTAAACA | GATTTCGGATT | CTCAACCCCT | TCTTCATGGA |
|     | GATTGCAGCT  |            |             |            |            |
| 721 | GACAAACTGC  | TGAGCCTGCC | AATGCAACAG  | CCACGGAAGA | TTAAGCAGAA |
|     | GCCCACCACG  |            |             |            |            |
| 781 | GGCCTGTTGG  | CCATCACGCT | GGCCCTCCAC  | CTCTGTGACT | TGGTGACAT  |
|     | TGCCGGCTTT  |            |             |            |            |
| 841 | GGCTACCCAG  | ACGCCTACAA | CAAGAAGCAG  | ACCATTCACT | ACTATGAGCA |
|     | GATCACGCTC  |            |             |            |            |
| 901 | AAGTCCATGG  | CGGGGTCAGG | CCATAATGTC  | TCCCAAGAGG | CCCTGGCCAT |
|     | TAAGCGGATG  |            |             |            |            |
| 961 | CTGGAGATGG  | GAGCTATCAA | GAACCTCACG  | TCCTTCTGA  |            |

**15 Secuencia de proteínas de ST3GAL4**

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

#### Cadena alfa de hCG optimizada

#### 5 Secuencia de nucleótidos de la cadena alfa de hCG optimizada (SEQ ID NO: 4)

1 GCCCCTGACG TGCAGGACTG CCCCAGAGTGC ACCCTGCAGG AAAACCCCTT  
CTTCAGCCAG  
61 CCTGGCGCCC CTATCCTGCA GTGCATGGGC TGCTGCTTCA GCAGAGCCTA  
CCCCACCCCC  
121 CTGCGGAGCA AGAAAACCAT GCTGGTGCAG AAAACGTGA CCAGCGAGAG  
CACCTGCTGC  
181 GTGGCCAAGA GCTACAACCG GGTGACCGTG ATGGGCGGCT TCAAGGTGGA  
GAACCACACC  
241 GCCTGCCACT GCAGCACCTG CTACTACCAC AAGTCCT

#### Secuencia de proteínas de la cadena alfa de hCG optimizada

10

1 APDVQDCPEC TLQENPFFSQ PGAPILQCMG CCFSRAYPTP LRSKKTMLVQ  
KNVTSESTCC  
61 VAKSYNRVTV MGGFKVENHT AHCSTCYHH KS

#### Polipéptido alfa de hCG

#### 15 Número de acceso AH007338

#### Secuencia de nucleótidos de alfa de hCG (SEQ ID NO: 5)

1 ATGGATTACT ACAGAAAATA TGCAGCTATC TTTCTGGTCA CATTGTCCGT  
GTTTCTGCAT  
61 GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGCAGGAT TGCCCAGAAT GCACGCTACA  
GGAACCCCA  
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 TGTTATTATC ACAAATCTTA A

20

#### Secuencia de proteínas de alfa de hCG



# ES 2 837 111 T3

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

## Listado de secuencias

|    |                                                                   |     |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | <110> Ferring Pharmaceutical A/S                                  |     |
|    | <120> Procedimiento de producción de gonadotropina                |     |
| 10 | <130> P/68899.WO01                                                |     |
|    | <150> 15164965.4                                                  |     |
|    | <151> 24/04/2015                                                  |     |
| 15 | <160> 12                                                          |     |
|    | <170> PatentIn versión 3.5                                        |     |
| 20 | <210> 1                                                           |     |
|    | <211> 349                                                         |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
|    | <213> Homo sapiens                                                |     |
| 25 | <400> 1                                                           |     |
|    | atggactact accggaagta cgccgccatc ttcctggtga ccctgagcgt gttcctgcac | 60  |
|    | gtgctgcaca gcgcccctga cgtgcaggac tgccccgagt gcaccctgca ggaaaacccc | 120 |
|    | ttcttcagcc agcctggcgc ccctatcctg cagtgcattg gctgctgctt cagcagagcc | 180 |
|    | tacccacccc ccctgcggag caagaaaacc atgctggtgc agaaaaacgt gaccagcgag | 240 |
|    | agcacctgct gcgtggccaa gagctacaac cgggtgaccg tgatgggcgg cttcaaggtg | 300 |
|    | gagaaccaca ccgcctgcca ctgcagcacc tgctactacc acaagtcct             | 349 |
| 30 | <210> 2                                                           |     |
|    | <211> 498                                                         |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
|    | <213> Homo sapiens                                                |     |
|    | <400> 2                                                           |     |
|    | atggagatgt tccaggggct gctgctgttg ctgctgctga gcatgggcgg gacatgggca | 60  |
|    | tccaaggagc cgcttcggcc acggtgccgc cccatcaatg ccaccctggc tgtggagaag | 120 |
|    | gagggctgcc ccgtgtgcat caccgtcaac accaccatct gtgccggcta ctgcccacc  | 180 |
|    | atgacccgcg tgctgcaggg ggtcctgccg gccctgcctc aggtggtgtg caactaccgc | 240 |
|    | gatgtgcgct tcgagtccat ccggctccct ggctgccgc gcggcgtgaa ccccggtggtc | 300 |
|    | tcctacgccg tggctctcag ctgtcaatgt gactctgcc gccgcagcac cactgactgc  | 360 |
|    | gggggtccca aggaccaccc cttgacctgt gatgaccccc gcttccagga ctctcttcc  | 420 |
|    | tcaaaggccc ctccccccag ccttccaagt ccatcccgac tcccggggcc ctcgacacc  | 480 |
| 35 | ccgatcctcc cacaataa                                               | 498 |
| 40 | <210> 3                                                           |     |
|    | <211> 999                                                         |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
|    | <213> Homo sapiens                                                |     |

<400> 3

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atgtgtcctg caggctggaa gtcctggcc atgttggtc tggctcctggt cgtcatggtg  | 60  |
| tggattacca tctcccgga agacaggtac atcgagcttt tttattttcc catcccagag  | 120 |
| aagaaggagc cgtgcctcca gggtaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggcaac  | 180 |
| tactcccggt atcagcccat cttcctgcgg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca | 240 |
| tctgcttacg agctgccta tgggaccaag gggagttagg atctgctcct ccgggtgcta  | 300 |
| gccatcacca gtcctccat cccaagaac atccagagcc tcagggtccg ccgctgtgtg   | 360 |
| gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgccat caacaagtac | 420 |
| gatgtggtca tcagattgaa caatgccccca gtggtgggt atgagggtga cgtgggctcc | 480 |
| aagaccacca tgcgtctctt ctaccctgaa tctgccact tcgaccccaa agtagaaaac  | 540 |
| aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag  | 600 |
| accatcctga gtgataagaa gcgggtgcga aagggtttct ggaaacagcc tcccctcatc | 660 |
| tgggatgtca atcctaaca gattcgatt ctcaaccct tcttcatgga gattgcagct    | 720 |
| gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gccaccacg  | 780 |
| ggcctgttgg ccatcacgct ggccctccac ctctgtgact tgggtcacat tgccggcttt | 840 |
| ggctaccag acgcctacaa caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc  | 900 |
| aagtccatgg cggggtcagg ccataatgtc tccaagagg ccctggccat taagcggatg  | 960 |
| ctggagatgg gagctatcaa gaacctcacg tccttctga                        | 999 |

5

<210> 4

<211> 277

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 4

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| gcccctgacg tgcaggactg ccccgagtgc accctgcagg aaaaccctt cttcagccag | 60  |
| cctggcgccc ctatcctgca gtgcatgggc tgctgcttca gcagagccta cccaccccc | 120 |
| ctgcgagca agaaaacat gctggtgcag aaaaacgtga ccagcgagag cacctgctgc  | 180 |
| gtggccaaga gctacaaccg ggtgaccgtg atggcggtt tcaagtgga gaaccacacc  | 240 |
| gcctgccact gcagcacctg ctactaccac aagtcct                         | 277 |

15

<210> 5

<211> 351

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20

<400> 5

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggtca cattgtcggg gtttctgcat | 60  |
| gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaacca  | 120 |

# ES 2 837 111 T3

ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcacgg gctgctgctt ctctagagca 180  
tatcccactc cactaaggtc caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag 240  
tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagtg 300  
gagaaccaca cggcgtgccca ctgcagtact tgttattatc acaaattctta a 351

<210> 6  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

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> 7  
<211> 165  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile  
20 25 30

# ES 2 837 111 T3

Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr  
35 40 45

Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val  
50 55 60

Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg  
65 70 75 80

Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val  
85 90 95

Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu  
100 105 110

Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu  
115 120 125

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro  
130 135 140

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr  
145 150 155 160

Pro Ile Leu Pro Gln  
165

<210> 8  
<211> 332  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Cys Pro Ala Gly Trp Lys Leu Leu Ala Met Leu Ala Leu Val Leu  
1 5 10 15

Val Val Met Val Trp Tyr Ser Ile Ser Arg Glu Asp Arg Tyr Ile Glu  
20 25 30

Leu Phe Tyr Phe Pro Ile Pro Glu Lys Lys Glu Pro Cys Leu Gln Gly  
35 40 45

Glu Ala Glu Ser Lys Ala Ser Lys Leu Phe Gly Asn Tyr Ser Arg Asp  
50 55 60

Gln Pro Ile Phe Leu Arg Leu Glu Asp Tyr Phe Trp Val Lys Thr Pro  
65 70 75 80

# ES 2 837 111 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9  
<211> 92  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9

# ES 2 837 111 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 10  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 10

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> 11  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 11

ccaggatccg ccaccatgtg tctgcaggc tggaagc 37

<210> 12  
<211> 35  
<212> ADN

## ES 2 837 111 T3

<213> Homo sapiens

<400> 12

5      ttttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg

35

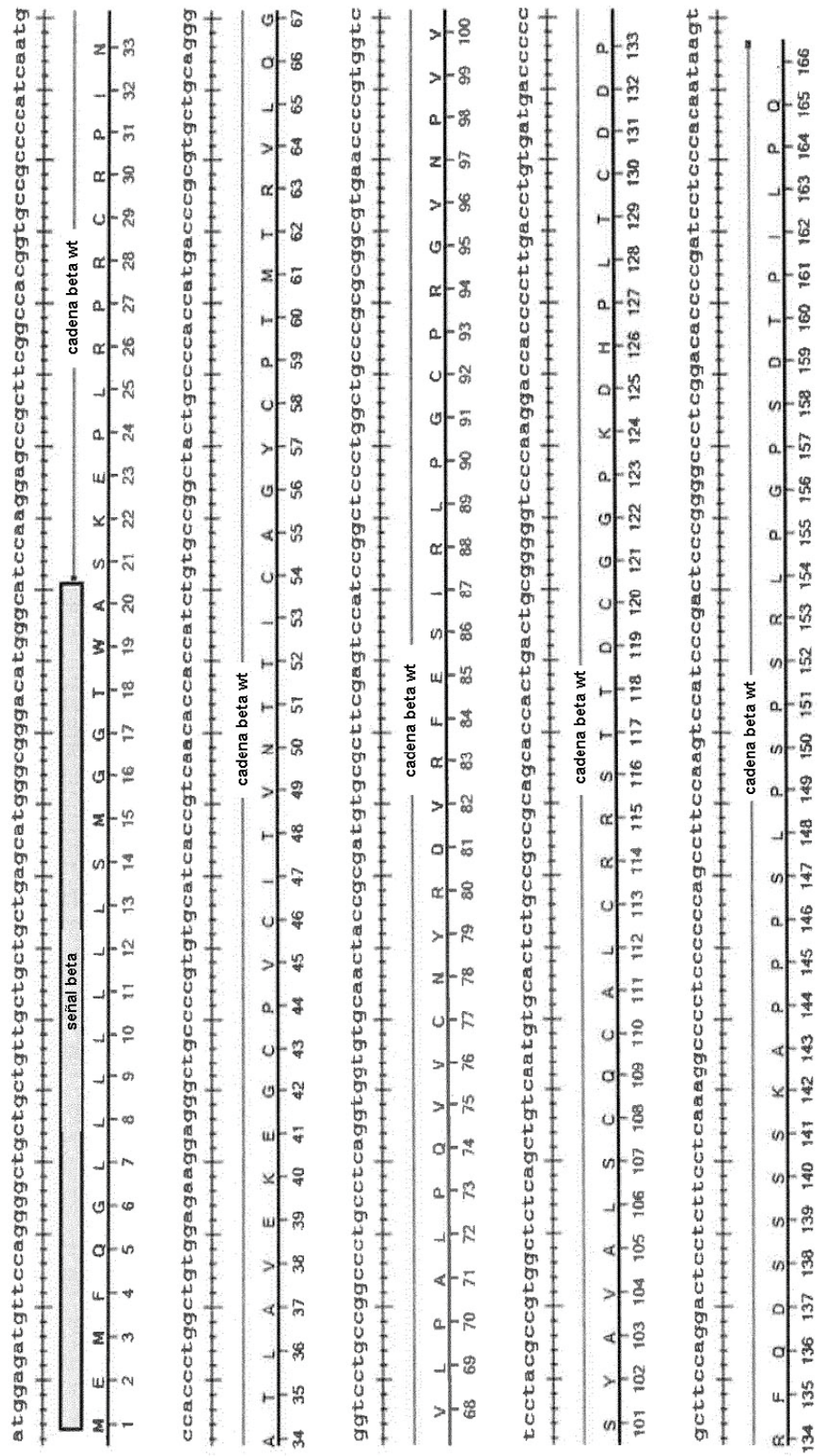
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 1; o una secuencia de ácido nucleico con al menos un 97% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1.
- 10 2. Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 4; o una secuencia de ácido nucleico con al menos un 97% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4.
- 15 3. Una célula caracterizada por que comprende integrada en su genoma una secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  de hCG seleccionada de entre: una secuencia según la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene al menos un 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene al menos un 97% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 1; una secuencia según la SEQ ID NO: 4; una secuencia que tiene al menos un 96,5% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 4; y una secuencia que tiene al menos un 97% de homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 4.
- 20 4. Una célula según la reivindicación 3, que es una célula PER.C6®.
- 25 5. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizada por que además comprende integrado en su genoma un ADNc que codifica alfa-2,3-sialiltransferasa.
6. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizada por que además comprende integrada en su genoma una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena  $\beta$  de hCG.
7. Un procedimiento para producir proteína recombinante en una célula que comprende cultivar una célula según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 en un medio adecuado y recolectar la proteína recombinante de dicha célula y/o dicho medio.
- 30 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que la proteína recombinante es hCG.



| señal alfa |    |    |    |    |    |    |    |    |    | cadena alfa opt |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1          | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11              | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| M          | D  | Y  | Y  | R  | K  | Y  | A  | A  | I  | F               | L  | V  | T  | L  | S  | V  | F  | L  | H  | V  | L  | H  | S  | A  | P  | D  | V  | Q  | D  | C  | P  | E  | C  | T  | L  | Q  | E  | N  | P  |
| 1          | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11              | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| F          | F  | S  | Q  | P  | G  | A  | P  | I  | L  | Q               | C  | M  | G  | C  | C  | F  | S  | R  | A  | Y  | P  | T  | P  | L  | R  | S  | K  | K  | I  | M  | L  | V  | Q  | K  | N  | V  | T  | S  | E  |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 17         | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27              | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Figura 2: cadena beta de tipo silvestre





27

Figuras 4 y 5: Mapas plasmídicos de los vectores de expresión phCGalfa/beta y pST3. CMV = promotor de citomegalovirus, BGHp(A) = secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina, f1 ori = origen de replicación f1, SV40 = promotor del virus simio 40, Neo = marcador de resistencia a neomicina, Hyg = marcador de resistencia a higromicina, SV40 p(A) = secuencia de poliadenilación del virus simio 40, hCG  $\alpha$  = polipéptido alfa de gonadotropina coriónica humana, hCG  $\beta$  = polipéptido beta de gonadotropina coriónica humana, ST3GAL4 =  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa, ST6GAL1 =  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa, ColEI = origen de replicación ColEI, Amp = marcador de resistencia a ampicilina.

Figura 4: vector de expresión de phCG

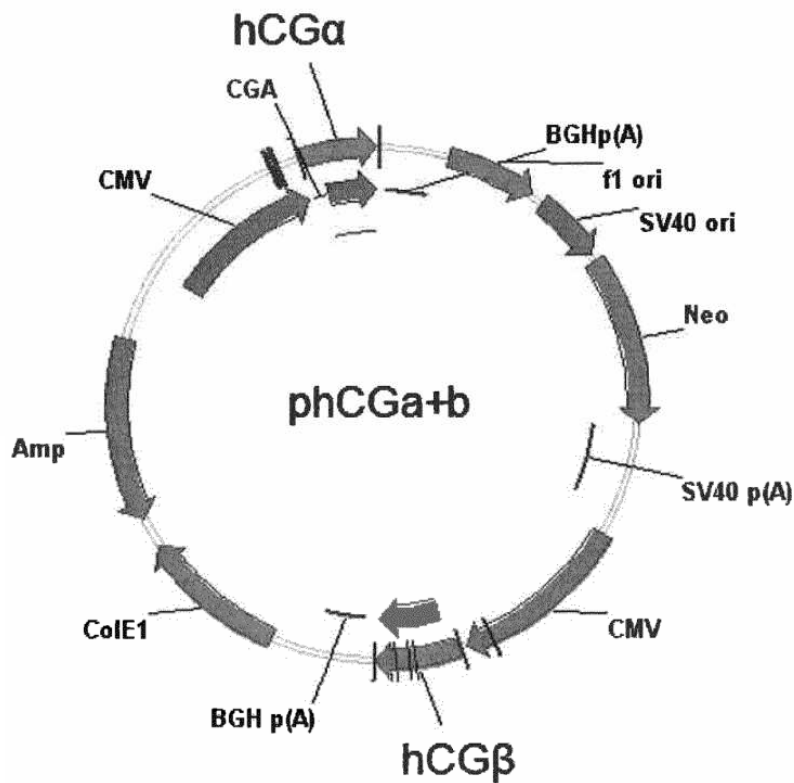


Figura 5: vector de expresión de  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4)

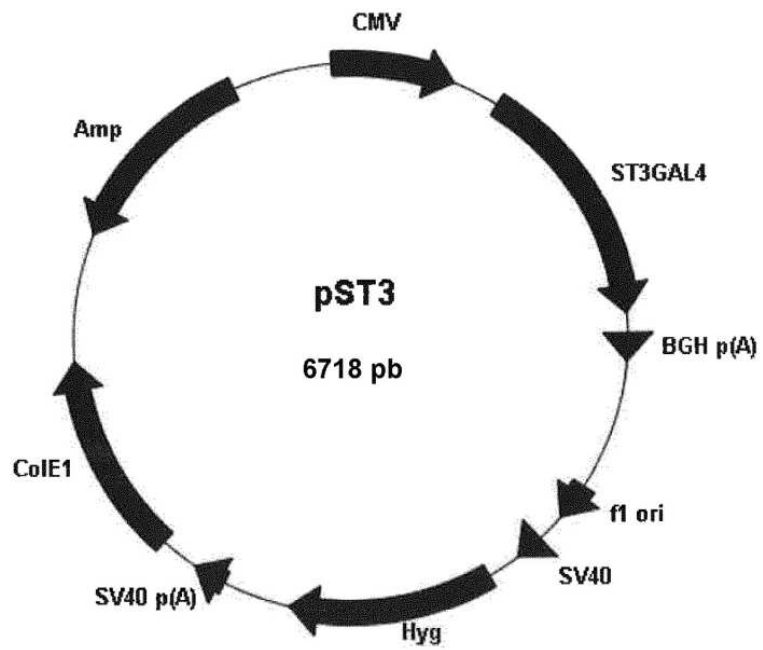




Figura 6: muestra la detección de isoformas de rhCG mediante tinción de IEF con azul de Coomassie en composiciones según la invención (carriles 4, 5, 6 y 7, 15 µg por carril); la composición derivada de CHO de la técnica anterior, Ovitrelle (carril 2, 15 µg); y un producto urinario humano obtenido de mujeres embarazadas Novarel (carril 3, 15 µg); marcador de IEF (carril 1 (pI desde el superior: 7,0, 6,8, 6,5, 6,0, 5,1 y 4,75, respectivamente))

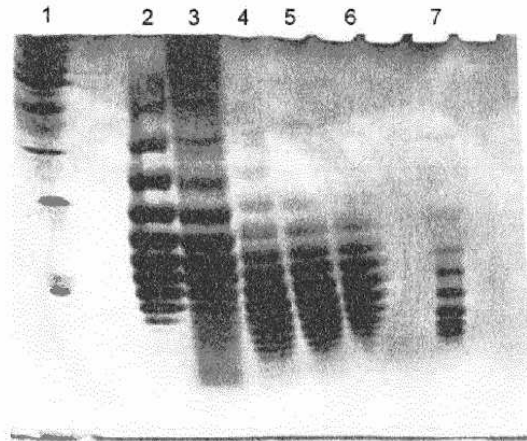


FIG. 6

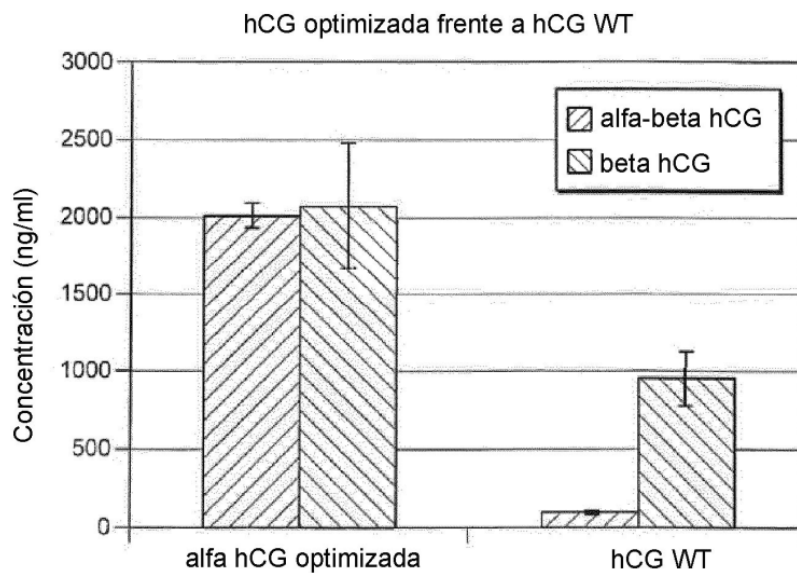


FIG. 7