

Método de producción de gonadotropina

La presente invención se relaciona con gonadotropinas para usar en el tratamiento de la infertilidad. En particular, se relaciona con la gonadotropina coriónica humana (hCG).

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

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es segregada principalmente por la placenta humana durante embarazo y soporta el mantenimiento del cuerpo lúteo. La hCG comprende una subunidad alfa 92 de aminoácidos (cadena α), también común a las otras glucoproteína LH y FSH, y una subunidad beta de 145 aminoácidos (cadena β) singular de la hCG, la cual dicta la especificidad de la hormona. Cada subunidad es modificada después de la traducción por la adición de residuos de carbohidratos complejos. La subunidad alfa contiene sitios de glucosilación ligados al 2-N en los aminoácidos 52 y 78 y la subunidad beta contiene sitios de glucosilación ligados al 2-N en los aminoácidos 13 y 30 y cuatro sitios de glucosilación ligados al O en los aminoácidos 121, 127, 132 y 138.

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

Existe considerable heterogeneidad asociada con las preparaciones de hCG que se relaciona con diferencias en las cantidades de diversas isoformas presentes. Las isoformas individuales de la hCG muestran secuencias de aminoácidos idénticas pero difieren en la extensión de su modificación posterior a la traducción; las isoformas particulares se caracterizan por la heterogeneidad de las estructuras de las ramificaciones de carbohidrato y cantidades diferentes de ácido siálico (un azúcar terminal) incorporado, ambas las cuales parecen tener una influencia sobre la bioactividad de la isoforma específica.

La glucosilación de los productos de hCG recombinante ("rhCG") refleja el intervalo de las glucosiltransferasas presentes en la línea de células del huésped. El producto de rhCG existente, Ovitrelle, se deriva de células de ovario de hámster chino modificadas genéticamente (CHO). El intervalo de modificaciones de los glucanos de la rhCG derivada de las CHO es más limitado que el de las que se encuentran en los productos naturales, derivados de la orina. Algunos ejemplos de la heterogeneidad reducida de los glucanos que se encuentra en la rhCG derivada de las CHO incluyen la ausencia de glucosamina bisecante y un contenido reducido de fucosilación del núcleo y extensiones de acetilactosamina. Además, las células CHO solo son capaces de adicionar ácido siálico usando el eslabonamiento $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al*, 1988, Takeuchi *et al*, 1988, Svensson *et al*, 1990).

La hCG urinaria humana (es decir, la hCG extraída de la orina de mujeres embarazadas) que se ha usado hasta la fecha en el tratamiento de la infertilidad es, en realidad, hCG placentaria; la hCG producida en la placenta (humana) y luego excretada por la orina. Esta hCG es extraída de la orina para usar como el producto farmacéutico. Bousfield et al. (Rev Endocr Metab Disord (2011) 12:289-302) afirman que "aunque las gonadotropinas hipofisarias poseen ácido siálico enlazado tanto a $\alpha 2,3$ - como a $\alpha 2,6$, la hCG placentaria y las gonadotropinas recombinantes producidas en las células de ovario de hámster chino poseen solo ácido siálico vinculado a $\alpha 2,3$ ". Así las cosas, la hCG urinaria humana (que es producida en la placenta) solo incluye sialilación $\alpha 2,3$ (como los productos recombinantes derivados de la línea celular CHO). Por tal razón, las composiciones farmacéuticas que incluyen hCG solo tienen ácido siálico vinculado a $\alpha 2,3$, pero no incluyen ácido siálico vinculado a $\alpha 2,6$. Se ha demostrado que una preparación recombinante de FSH (Organon) difiere en las cantidades de FSH con un punto isoelectrico (pi) de menos de 4 (consideradas las isoformas ácidas) en comparación con la FSH hipofisaria, sérica o urinaria postmenopáusica (Ulloa-Aguirre et al. 1995). La cantidad de isoformas ácidas en las preparaciones urinarias de FSH fue mucho más alta que la de los productos recombinantes, Gonal-f (Serono) y Puregon (Organon) (Andersen et al. 2004). Esto tiene que reflejar un menor contenido molar de ácido siálico en la rFSH porque el contenido de glucano de carga negativa modificado con sulfato es bajo en la FSH. El menor contenido de ácido siálico, comparado con la FSH natural, es una característica de ambos productos de FSH comercialmente disponibles y por consiguiente tiene que reflejar una limitación del proceso de manufactura (Bassett y Driebergen, 2005). El tiempo de vida en la circulación de FSH ha sido documentado para materiales de diversas fuentes. Algunos de estos materiales han sido fraccionados con base en la carga molecular general, caracterizada por el pl, en el cual más ácido equivale a una carga negativa más alta. El principal contribuyente a la carga molecular general es el contenido total de ácido siálico de cada molécula de FSH. Por ejemplo, rFSH (Organon) tiene un contenido de ácido siálico de cerca de 8 mol/mol, en tanto que la FSH derivada de la orina tiene un mayor contenido de ácido siálico (de Leeuw et al. 1996). Las tasas de depuración del plasma correspondiente tasas de depuración del plasma en la rata son 0,34 y 0,14 mL/min (Ulloa-Aguirre et al. 2003). En otro ejemplo en el cual un muestra de FSH recombinante se dividió en fracciones de alto y bajo pl, la potencia *in vivo* de la fracción de alto pl (menor contenido de ácido siálico) se redujo y tuvo una vida media plasmática más corta (D'Antonio et al. 1999). Los solicitantes han encontrado que, similar a FSH, el producto recombinante conocido de hCG derivado de las CHO (p.ej., Ovitrelle) también tiene una menor cantidad de hCG con un punto isoelectrico (pl) de menos de 4 (consideradas las isoformas ácidas) que la hCG urinaria, lo cual también refleja un menor contenido de ácido siálico de el producto conocido de rhCG comparado con la hCG urinaria.

Los solicitantes han desarrollado una hCG recombinante derivada de fuente humana (es decir, una hCG recombinante producida o expresada en una línea celular humana, p.ej., obtenida por modificación genética de una línea celular humana) que tiene un perfil más ácido que el producto rhCG derivado de la línea celular CHO, Ovitrelle, y que tiene un contenido más alto de ácido siálico. Esta rhCG es el sujeto de la Solicitud Internacional de Patente No.

6

PCT/GB2010/001854, publicada como WO 2011/042688. La hCG recombinante con una mezcla de ácido siálico vinculado a $\alpha 2,3$ y a $\alpha 2,6$ se obtuvo por ingeniería genética de una línea celular humana modificada para que exprese tanto rhCG como $\alpha 2,3$ sialiltransferasa. El producto expresado es altamente ácido, tiene un contenido de ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico a moles de proteína] de por ejemplo 19,1 mol/mol, y porta una mezcla de ácido siálico vinculado a $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$; este último proporcionado por la actividad endógena de sialiltransferasa. La investigación de los solicitantes indica que el tipo de vinculación de ácido siálico, $\alpha 2,3$ - o $\alpha 2,6$ -, puede tener una drástica influencia sobre la depuración biológica de la hCG. Las líneas celulares humanas, a diferencia de las líneas celulares CHO, pueden expresar hCG recombinante con ácidos siálicos enlazados por ambas vinculaciones $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$.

La línea celular de WO 2011/042688 expresa bien la hCG recombinante derivada de fuente humana. Sin embargo, la línea celular también expresa un nivel relativamente alto de la cadena β libre (subunidad beta libre), y se requirió purificación (para eliminar esta cadena β libre del producto hCG).

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

De acuerdo con la presente invención se proporciona una célula (p.ej., huésped) que se caracteriza porque tiene integrado en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG seleccionada de entre: Una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de homología con la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de la SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 4; una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de homología con la secuencia de SEQ ID NO: 4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:4); y una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:4). De preferencia la secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG no es la secuencia categorizada en el banco como AH007338 (es decir, de preferencia, la secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG no es la que se muestra en la SEQ ID NO:5). La célula además puede tener integrado en su genoma un ADNc que codifica una alfa-2,3- sialiltransferasa, por ejemplo una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 3. La célula además puede tener integrado en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena β de la hCG, por ejemplo la

4

secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:2. La célula huésped puede ser, por ejemplo, una célula PER.C6®, una célula HT1080, una célula GT-5s, etc. De preferencia la célula es una célula PER.C6® como una célula PER.C6® depositada bajo ECACC no. 96022940.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una célula PER.C6® como una célula PER.C6® depositada bajo ECACC no. 96022940, que se caracteriza porque además tiene integrado en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG. La secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG puede ser seleccionada de entre: Una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene por lo menos 90% de homología con la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 4; una secuencia que tiene por lo menos 90% de homología con la secuencia de SEQ ID NO: 4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:4); y una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia SEQ ID NO:4). De preferencia la secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG no es la secuencia categorizada en el banco como AH007338. La célula además puede tener integrado en su genoma un ADNc que codifica una alfa-2,3-sialiltransferasa, por ejemplo una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 3. La célula además puede tener integrado en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena β de la hCG, por ejemplo la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:2.

Se apreciará que el término "una secuencia que codifica la cadena α de la hCG" o "una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG" tal como se usa en este contexto también se refiere a una secuencia que codifica la cadena α de FSH (o una secuencia que codifica la cadena α de la LH) porque la cadena α de la hCG es la misma para la FSH (que para la LH).

El término "secuencia de ácidos nucleicos" tal como se usa en este contexto se relaciona con cualquier molécula de ácido nucleico que codifica polipéptidos como péptidos, proteínas etc. estas moléculas de ácidos nucleicos pueden estar hechas de ADN, ARN o análogos de los mismos. Sin embargo, las moléculas de ácidos nucleicos hechas de ADN se prefieren.

La persona medianamente versada en la materia técnica correspondiente claramente está consciente de que la modificación de una ⁴secuencia de nucleótidos de partida describe el proceso de optimización con respecto al uso de codones. Los cambios introducidos pueden identificarse fácilmente comparando la secuencia modificada y la secuencia de partida. Más aún, ambas secuencias (es decir, la secuencia de partida y la secuencia optimizada) codificarán

8

la misma secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de la cadena α de la hCG humana se revela en WO2011/042688 (referida como SEQ ID1 en ese documento), y es la descrita en Fiddes y Goodman 1979. Se categoriza en el banco bajo AH007388, y se muestra como SEQ ID NO. 5 más adelante. La secuencia de aminoácidos de la cadena β de la hCG humana se ilustra en la SEQ ID No.2, y se categoriza en el banco como NP_000728. Estas secuencias de aminoácidos corresponden a las secuencias de aminoácidos de tipo silvestre de las cadenas α y β de la hCG humana. Los términos "secuencia de ácidos nucleicos de tipo silvestre" o "la secuencia de partida de ácido nucleico" para los efectos de la presente invención se relacionan con una secuencia de ácidos nucleicos destinada a ser usada para la (sobre)expresión en una célula huésped y que no ha sido adaptada al uso de codones en la célula huésped, pero es la secuencia real de ácido nucleico de tipo silvestre que codifica la proteína. El término "secuencia optimizada de ácido nucleico" para los efectos de la presente invención se relaciona con una secuencia que ha sido modificada para expresión en una célula huésped adaptando la secuencia de la secuencia no modificada/la secuencia de partida de ácido nucleico. Una secuencia optimizada de ácido nucleico 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 α de la hCG (véase p.ej., SEQ ID No. 1 y 4, Figura 1).

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona una secuencia de polinucleótidos (p.ej., una secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena α de la hCG) que comprende una secuencia seleccionada de entre una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 4; una secuencia de ácidos nucleicos con por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 (p.ej., una secuencia de ácidos nucleicos con por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% identidad de secuencia con) el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1); y una secuencia de ácidos nucleicos con por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4 (p.ej., una secuencia de ácidos nucleicos con por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4).

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona un método para producir hCG recombinante en una célula, que comprende cultivar la célula en un medio adecuado y cosechar la proteína recombinante (hCG) de la mencionada célula y/o el mencionado medio (p.ej., cosechar la hCG recombinante de la sobrenadante del cultivo celular), tal como se usa en este contexto la célula (célula huésped) tiene integrada en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG seleccionada de entre: Una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene por lo menos 90% de homología con la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia que tiene por lo

9

menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 4; una secuencia que tiene por lo menos 90% de homología con la secuencia de SEQ ID NO: 4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:4); y una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:4). De preferencia la secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG no es la secuencia categorizada en el banco como AH007338. La célula además puede tener integrado en su genoma un ADNc que codifica una alfa-2,3-sialiltransferasa, por ejemplo una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 3. La célula además puede tener integrada en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena β de la hCG, por ejemplo la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:2. El método puede incluir uno o más pasos adicionales de purificar la hCG recombinante obtenida de la mencionada célula y/o el mencionado medio (p.ej., purificar la hCG recombinante del sobrenadante del cultivo celular).

La célula (huésped) puede ser, por ejemplo, una célula PER.C6®, una célula HT1080, una célula GT-5s, etc. De preferencia, la célula es una célula PER.C6® como una célula PER.C6® depositada bajo ECACC no. 96022940.

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona un método para producir hCG recombinante en una célula, que comprende cultivar la célula en un medio adecuado y cosechar la proteína recombinante (hCG) de la mencionada célula y/o el mencionado medio (p.ej., cosechar la hCG recombinante del sobrenadante del cultivo celular). Tal como se usa en este contexto, la célula es una célula PER.C6® (como una célula PER.C6® depositada bajo ECACC no. 96022940) que tiene integrada en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG. La secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG puede ser seleccionada de entre: Una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene por lo menos 90% de homología con la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 4; una secuencia que tiene por lo menos 90% de homología con la secuencia de SEQ ID NO: 4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:4); y una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99%

10
9

de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:4). De preferencia la secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena α de la hCG no es la secuencia categorizada en el banco como AH007338. La célula además puede tener integrado en su genoma un ADNc que codifica un alfa-2,3-sialiltransferasa, por ejemplo una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 3. La célula además puede tener integrado en su genoma una secuencia (de ácido nucleico) que codifica la cadena β de la hCG, por ejemplo la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:2. El método puede incluir uno o más pasos adicionales de purificar la hCG recombinante obtenida de la mencionada célula y/o el mencionado medio (p.ej., purificar la hCG recombinante del sobrenadante del cultivo celular).

El término "célula huésped" para los efectos de la presente invención se refiere a cualquier célula que se usa comúnmente para expresión, es decir, transcripción y traducción de secuencias de ácidos nucleicos para la producción de p.ej., polipéptidos. En particular, el término "célula huésped" u "organismo" se relaciona con procariotes, eucariotes bajos, plantas, células de insectos o sistemas de cultivo celular de mamíferos. De preferencia, la célula huésped es una célula de mamífero, más de preferencia la célula huésped es una célula humana, todavía más de preferencia una célula PERC6®.

El término "molécula de ácido nucleico recombinante" dentro del significado de la presente invención tiene por objeto comprender todo tipo de moléculas de ácidos nucleicos que puedan ser introducidos en una célula huésped y que efectúen la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que está contenida dentro de la molécula de ácido nucleico recombinante. El término incluye, por ejemplo, vectores de plásmidos y vectores virales (p.ej., vectores de adenovirus, lentivirus y retrovirus), como es bien conocido en el estado de la técnica.

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una (primera) secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena α de la hCG, la cual (primera) secuencia de ácidos nucleicos se selecciona de entre una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de homología con la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 4; una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de homología con la secuencia de SEQ ID NO: 4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:14; y una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:4). De preferencia, la molécula de ácido nucleico recombinante de este aspecto de la presente invención comprende tanto un secuencia optimizada de ácido nucleico que codifica la cadena α de la hCG humana como una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena β

de la hCG. De preferencia, la (primera) secuencia de ácidos nucleicos está bajo el control de un promotor que es activo en una célula huésped. De preferencia la molécula de ácido nucleico recombinante además comprende una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena β de la hCG. La segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena β de la hCG puede ser la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 2. La segunda secuencia de ácidos nucleicos puede estar bajo el control de un promotor separado que es activo en una célula huésped. La primera secuencia de ácidos nucleicos y/o la segunda secuencia de ácidos nucleicos pueden estar bajo el control de un promotor viral (p.ej., un promotor CMVie).

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona una célula huésped que comprende o incluye una molécula de ácido nucleico recombinante como se dijo arriba (p.ej., una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una (primera) secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena α de la hCG, la cual (primera) secuencia de ácidos nucleicos se selecciona de entre una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de homología con la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:1 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:1); una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 4; una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de homología con la secuencia de SEQ ID NO: 4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:4); y una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de homología con) la secuencia de SEQ ID NO:4 (p.ej., una secuencia que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia con (p.ej., por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con) la secuencia de SEQ ID NO:4).

Los solicitantes han encontrado que las células (células huésped), líneas celulares que incorporan estas células huésped, moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, polinucleótidos y métodos de la invención pueden producir hCG recombinante de alto rendimiento y pureza (p.ej., con poca cadena beta libre).

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona una hCG recombinante ("rhCG" o "rechCG") que incluye α 2,3- y α 2,6-sialilación. Tal como se usa en este contexto la hCG recombinante es producida en una célula tal como se describe y reivindica aquí. La hCG recombinante puede tener un contenido de ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico 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 (or preparación 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) de acuerdo con la invención puede tener un contenido de ácido siálico de 13 mol/mol.

En algunos ejemplos de la invención, la rhCG puede estar presente como una isoforma

única o como una mezcla de isoformas. La hCG recombinante (o preparación de rhCG) producida por los métodos y las células de la invención incluye $\alpha 2,3$ - y $\alpha 2,6$ -sialilación. Por sialilación se entiende la cantidad de residuos de ácido siálico presente en las estructuras de carbohidrato de la hCG. La sialilación $\alpha 2,3$ significa sialilación en la posición 2,3 (como es bien conocido del estado de la técnica); y $\alpha 2,6$ sialilación significa sialilación en la posición 2,6 (también bien conocido del estado de la técnica). Así las cosas, tal como se usa en este contexto, la redacción “% de la sialilación total puede ser $\alpha 2,3$ sialilación” se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la hCG que son sialilados en la posición 2,3. El término “% de la sialilación total es $\alpha 2,6$ -sialilación” se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la hCG que son sialilados en la posición 2,6. El término “% de la sialilación total es $\alpha 2,8$ -sialilación” se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la hCG que son sialilados en la posición 2,8.

La rhCG (o preparación de rhCG) producida por los métodos y células de acuerdo con la invención puede tener 1% a 99% de la sialilación total que es sialilación $\alpha 2,3$. La rhCG (o preparación de rhCG) producida por los métodos y células de acuerdo con la invención puede tener 1% a 90% de la sialilación total que es $\alpha 2,3$ -sialilación. La rhCG (o preparación de rhCG) de acuerdo con la invención puede tener 10% o más de la sialilación total que es sialilación $\alpha 2,3$, por ejemplo, 10% a 90% de la sialilación total puede ser sialilación $\alpha 2,3$. Por ejemplo, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 o 90% o más de la sialilación total puede ser sialilación $\alpha 2,3$, 45% a 80% de la sialilación total puede ser sialilación $\alpha 2,3$, por ejemplo 50% a 70% de la sialilación total puede ser sialilación $\alpha 2,3$, por ejemplo 55 a 65% de la sialilación total puede ser sialilación $\alpha 2,3$. La rhCG (o preparación de rhCG) puede incluir sialilación $\alpha 2,3$ en una cantidad que es de 65 a 95% de la sialilación total, por ejemplo de 70 a 90% de la sialilación total, por ejemplo de 85 a 90% de la sialilación total.

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

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

La rhCG (o preparación de rhCG) producida por los métodos y células de acuerdo con la invención puede tener un contenido de ácido siálico (cantidad de sialilación por molécula de

hCG) de (con base en la masa de proteína, en vez de la masa de proteína más carbohidrato) de 6% o más (p.ej., entre 6% y 15%, p.ej., entre 7% y 13%, p.ej., entre 8% y 12%, p.ej., entre 11% y 15%, p.ej., entre 12% y 14%) por masa.

La rhCG (o preparación de rhCG) puede ser producida o expresada en una línea celular humana, por ejemplo una línea celular PER.C6®, una línea celular HT1080 etc. La rhCG (o preparación de rhCG) puede ser producida o expresada en una línea celular derivada de fuente humana o una línea celular humana modificada como, por ejemplo, una línea celular derivada PER.C6® o una línea celular modificada PER.C6®, una línea celular modificada HT1080 o una línea celular derivada HT108020, etc. En un ejemplo preferido, la rhCG es producida o expresada en una línea celular PER.C6®, una línea celular derivada PER.C6® o una línea celular modificada PER.C6®. La rhCG que es producida o expresada en una línea celular humana (p.ej., una línea celular PER.C6®, una línea celular HT1080, una línea celular GT-5s) incluirá algo de ácido siálico vinculado a $\alpha 2,6s$ ($\alpha 2,6$ sialilación) proporcionado por actividad endógena de sialiltransferasa [de la línea celular] e incluirá algo de ácido siálico vinculado a $\alpha 2,3s$ ($\alpha 2,3$ sialilación) proporcionado por actividad endógena de sialiltransferasa [de la línea celular]. La línea celular puede ser modificada usando $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. Como alternativa o adicionalmente, la línea celular puede ser modificada usando $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa. Esto puede simplificar (y volver más eficiente) el método de producción porque la manipulación y el control de p.ej., el medio de cultivo celular para retener la sialilación pueden ser menos críticos que con procesos conocidos. El método también puede ser más eficiente porque hay poca rhCG básica producida comparada con la producción de productos conocidos de rhCG; se produce más rhCG ácida y la separación/eliminación de la hCG básica resalta menos problemática. La rhCG puede ser producida usando una $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa, por ejemplo producida usando una línea celular humana modificada usando una $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. La rhCG puede incluir ácido siálico vinculado a $\alpha 2,6s$ ($\alpha 2,6$ sialilación) proporcionado por actividad endógena de sialiltransferasa. La rhCG puede ser producida usando una $\alpha 2,3$ - y/o una $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa, por ejemplo, producida usando una línea celular humana modificada usando una $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa y/o una $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa.

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona una hCG recombinante o una preparación de hCG recombinante como se describió en este contexto, la cual es producida o expresada por los métodos que aquí se describen.

La estructura de la rhCG contiene grupos funcionales glucano. La ramificación puede tener lugar con el resultado que el glucano puede tener 1, 2, 3, 4 o más residuos de azúcar terminales o "antenas", como es bien conocido del estado de la técnica. La rhCG de acuerdo con aspectos de la invención de la invención puede tener glucanos con estructuras de glucano mono-antenarias y/o di-antenarias y/o tri-antenarias y/o tetra-antenarias. La rhCG puede incluir estructuras de glucano mono-antenarias y/o bi-antenarias y/o tri-antenarias y/o tetra-antenarias, por ejemplo con cantidades relativas como sigue: 0,1 a 3% mono-antenarias; 65% a 85% bi-antenarias; 15 a 25% tri-antenarias y 0,5 a 1,5% tetra-antenarias (p.ej., como se muestra por análisis WAX de glucanos cargados).

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona una

composición farmacéutica que comprende una hCG recombinante (rhCG) que tiene sialilación $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ -sialilación. Tal como se usa en este contexto, la hCG recombinante es producida por los métodos y/o células que aquí se revelan. La rhCG puede tener un contenido de ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico a moles de proteína] de 12 mol/mol a 15,5 mol/mol, por ejemplo 12 mol/mol a 14,9 mol/mol (p.ej., como se dijo arriba). La 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. De preferencia la rhCG de acuerdo con la invención has un contenido de ácido siálico de 13 mol/mol.

La composición farmacéutica además puede comprender FSH y/o LH. La FSH se puede obtener por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. La FSH tal como se usa en este context incluye FSH derivada de fuente humana y recombinante. La FSH derivada de fuente humana puede ser purificada de cualquier fuente adecuada (p.ej., orina) por cualquier método conocido en el estado de la técnica.

La FSH puede ser FSH recombinante – por ejemplo, expresada en una línea celular humana. Los métodos de expresar y purificar la FSH recombinante son bien conocidos del estado de la técnica.

La LH se puede obtener por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. La LH, tal como se usa en este contexto, incluye LH derivada de fuente humana y recombinante. La LH derivada de fuente humana puede ser purificada de cualquier fuente adecuada (p.ej., orina) por cualquier método conocido en el estado de la técnica. Los métodos de expresar y purificar recombinante la LH son conocidos en el estado de la técnica.

La composición farmacéutica puede ser para, o para usar en, el tratamiento de la infertilidad, p.ej., para usar en p.ej., tecnologías de reproducción asistida (ART), inducción de ovulación o inseminación intrauterina (IUI). La composición farmacéutica puede ser para, o para usar en, desencadenamiento de 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). La composición farmacéutica puede ser para, o para usar en, inducir desarrollo monofolicular en mujeres anovulatorias Tipo II de la OMS (p.ej., rhCG con rLH), para intensificar respuesta multifolicular con estimulación con LH en pacientes sometidas a COH (p.ej., rhCG con rLH), y para suplencia de COH para mejorar las tasas de implantación/embarazo (p.ej., rhCG con rLH), y/o aumentar tasas de embarazo en tecnologías de reproducción asistida. La composición farmacéutica puede ser para, o para usar en, la prevención del aborto, y/o la prevención de la prematurez. La composición farmacéutica puede ser para, o para usar en, el tratamiento de la endometriosis.

La composición farmacéutica se puede usar, por ejemplo, en indicaciones médicas en las cuales se usan preparaciones de hCG conocidas. La presente invención también proporciona el uso de rhCG y/o una preparación de rhCG de las aquí descritas (de acuerdo con aspectos de la invención) para, o en la manufactura¹¹ de un medicamento para el tratamiento de la infertilidad.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración, p.ej., oral, rectal,

15

parenteral, transdérmica (p.ej., tecnología de parches), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, pomadas o gotas) o como un aerosol bucal o nasal spray. Una composición típica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, como solución acuosa, excipientes no tóxicos, incluidos sales y preservativos, amortiguadores y similares, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences 15ª edición (Matt Publishing Company, 1975), páginas 1405 a 1412 y 1461 – 87, y el formulario nacional XIV 14ª edición (American Pharmaceutical Asociación, 1975), entre otros. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticos aceptables acuosos y no acuosos, diluyentes, solventes o vehículos incluyen agua, etanol, polioles (como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (como aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. Las composiciones de la presente invención también pueden contener aditivos como, pero sin limitaciones, preservativos, agentes humectantes, agentes emulsionantes, y agentes dispersantes. Se pueden incluir agentes antibacterianos y antimicóticos para prevenir el crecimiento de microbios e incluir, por ejemplo, m-cresol, alcohol bencílico, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Además, puede ser deseable incluir agentes isotónicos como azúcares, cloruro de sodio, y similares.

En algunos casos resulta deseable una acción de efecto prolongado para hacer más lenta la absorción la de hCG (y otros ingredientes activos, si están presentes) de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr con el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con baja solubilidad en agua. La tasa de absorción de la hCG depende entonces de su tasa de disolución la cual, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Como alternativa, absorción retardada de una forma combinada de hCG administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo la combinación de hCG en un vehículo oleoso. Se pueden hacer formas de depósito inyectable por formando matrices de microencapsulación de la hCG (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de hCG a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación de la hCG puede ser controlada. Algunos 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 compatible con los tejidos corporales. Las formulaciones inyectables puede ser esterilizadas, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o incorporando agentes esterilizantes en la forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes del uso. Las formulaciones inyectables pueden suministrarse en cualquier recipiente adecuado, p.ej., vial, jeringa prellenada, cartuchos de inyección, y similares.

Las formulaciones (p.ej., formulación inyectable) pueden ser suministradas 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 p.ej., FSH o LH) estos pueden ser adecuados para administrarlos por separado o juntos. Si se administran por separado, la

administración puede ser secuencial. El producto puede suministrarse en cualquier empaque adecuado. Por ejemplo, un producto pueden contener varias jeringas prellenadas o viales que contienen bien sea hCG, FSH, o una combinación de FSH y hCG. Las jeringas o viales pueden venir empacados en un empaque blíster u otro medio para mantener la esterilidad. Un producto opcionalmente puede contener 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 de conformidad con la práctica habitual en este campo. Véase GOODMAN y GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7a ed. En una modalidad preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para administración parenteral. Los métodos generales para la preparación de las formulaciones parenterales son conocidos del estado de la técnica y se describen en REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, supra, páginas 780-820. Las composiciones parenterales se pueden suministrar en formulación líquida o como un sólido que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de la administración. En una modalidad, las composiciones parenterales se suministran en formas de dosis unitarias para facilitar la administración y la uniformidad posológica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia a los los siguientes Ejemplos y los dibujos que se anexan, en los cuales:

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

La Figura 2 muestra el ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos derivadas de secuencia de la beta hCG;

La Figura 3 muestra el ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos derivadas de ST3GAL4;

La Figura 4 muestra un mapa de plásmidos del vector de expresión phCGalfa/beta;

La Figura 5 muestra el vector de expresión de la α 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4) vector de expresión;

La Figura 6 muestra la detección de Isoformas de rhCG por IEF coloreada con azul de Coomassie en composiciones de acuerdo con la invención (Carriles 4, 5, 6 y 7, 15 μ g por carril); la composición derivada de CHO del estado de la técnica, Ovitrelle (Carril 2, 15 μ g); y un producto urinario humano obtenido de mujeres embarazadas Novarel (Carril 3, 15 μ g); y

La Figura 7 compara la concentración de la hCG ("alfa-beta hCG") y cadena beta libre ("beta hCG") producida usando las células de la invención que incluyen la secuencia nucleica "Optimizada" de la subunidad alfa, comparada con la concentración de la hCG ("alfa-beta hCG") y la cadena beta libre ("beta hCG") producida en células comparativas ejemplares que incluyen la subunidad alfa WT (de tipo silvestre).

Ejemplos 1 a 7

Panorama del proceso de desarrollo de la línea celular

14

Un único plásmido que transporta las cadenas alfa y beta de la hCG, cada una impulsada por un Promotor CMVie separado, se transfectó en células PER.C6® por electroporación. Este plásmido portaba un casete del gen de la resistencia a la neomicina (Fig. 4) que permite la selección de transfectantes usando G418 (Geneticin). Se expandieron bancos de transfectantes y luego se sometieron a clonación de dilución limitante en placas de 96 pozos bajo selección G418. Las líneas clonales se expandieron y las colonias de alta expresión se identificaron con base en el título de hCG en el sobrenadante del cultivo celular. Cinco clones líderes se seleccionaron con base en alta productividad, y cada uno fue entonces transfectado con un segundo plásmido que expresaba el gen de la α 2,3- sialiltransferasa ST3GAL4 junto con el marcador de selección de Higromicina (Fig. 5). Cada uno de los cinco bancos de transfección fue expandido y los sobrenadantes del cultivo celular fueron valorados para determinar la concentración de hCG y la farmacocinética *in vivo* (FC). Los bancos prometedores entonces se sometieron a otra ronda de clonación de dilución limitada. Los clones se expandieron y los sobrenadantes del cultivo celular fueron valorados para determinar la concentración de hCG y galactosa expuesta sobre la proteína de hCG (por ELISA). Los que tenían un nivel bajo de galactosa expuesta se sometieron a más pruebas que incluyeron FC *en vivo*. Los clones que produjeron hCG con perfiles FC óptimos, tenían baja galactosa expuesta y expresaron la proteína en altos niveles fueron valorados y seleccionados para determinar sus características de productividad y crecimiento.

Ejemplo 1: Secuencia selección y vectores de plásmidos

La región codificadora del gen del polipéptido de la alfa hCG se muestra en la Fig. 1. La región codificadora del gen del polipéptido de la alfa hCG secuencia se denomina en este contexto como SEQ ID NO: 1.

La región codificadora del gen para polipéptido de la beta hCG se usó de acuerdo con Fiddes y Goodman (1980). La secuencia es categorizada en el banco como NP_000728 y concuerda con las secuencias proteínicas de CGbeta3, CGbeta5 y CGbeta7. La secuencia se denomina en este contexto SEQ ID NO: 2. La región codificadora del gen de la beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (α 2,3-sialiltransferasa, ST3GAL4) se usó de acuerdo con Kitagawa y Paulson (1994). La secuencia es categorizada en el banco como L23767 y en este contexto se la denomina SEQ ID NO: 3. Se usaron dos plásmidos: el primero, phCG, co-expresa cadenas alfa y beta de hCG; y el segundo expresa el gen de la sialiltransferasa ST3GAL4.

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

El phCG es una cadena alfa sintética de hCG, optimizada para el uso de codones en células de mamíferos e incluye el péptido de señal de la alfa hCG nativa. Puede ser modificado genéticamente por métodos bien conocido del estado de la técnica.

La secuencia que codifica el polipéptido de la alfa hCG (SEQ ID NO: 1) y el polipéptido de la beta hCG (NP_000728, SEQ ID NO: 2) fueron amplificados por PCR usando métodos bien

conocido del estado de la técnica (véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional de Patente publicada como WO2011/042688). El pADN de la alfa hCG fue digerido con *Bam*HI y *Nhe*I y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Nhe*I sobre un vector de expresión de mamífero impulsado por CMV (CruceCell vector pADNc3002Neo). Esto puso al gen en la orientación correcta para la expresión impulsada por un promotor CMVie con una señal BGH poliA corriente abajo. El gen de la beta hCG nativa que incluye el péptido de señal nativo fue digerido con las enzimas de restricción *As*cl y *Hpa*I y se insertó en los sitios *As*cl y *Hpa*I de manera que la expresión estaría impulsada por un segundo promotor CMVie con una señal adicional BGH poli A corriente abajo. La espina dorsal del vector también incluyó un marcador de resistencia a la neomicina así como elementos requeridos para la selección y replicación en células procarióticas. El vector fue amplificado y secuenciado usando métodos generales conocidos del estado de la técnica. Las secuencias de las cadenas optimizadas de alfa beta de hCG nativas (de tipo silvestre) se dan en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

Todas las colonias seleccionadas para secuenciación contenían las secuencias correctas de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. El plásmido phCG A+B fue seleccionado para transfección (Figura 4).

Ejemplo 2b: Construcción del vector de expresión ST3

El gen ST3GAL4 es expresado en pST3. La secuencia que codifica la beta- galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (ST3, L23767, SEQ ID NO: 3, Fig. 3) fue amplificada por PCR usando la combinación de cebadores 2,3STfw y 2,3STrev. 2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3' 2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

El ADN ST3 amplificado resultante fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *A*fIII e insertado en los sitios *Bam*HI y *A*fIII sobre el vector de expresión de mamífero impulsado por CMV que transporta un marcador de resistencia a la Higromicina (vector pADNc3002Neo) de manera que queda situado corriente abajo del promotor CMVie y corriente arriba de la secuencia BGH poliA. La espina dorsal del vector también incluyó un marcador de resistencia a la Higromicina así como elementos requeridos para la selección y replicación en células procarióticas. El vector fue amplificado como se describió arriba y se secuenció. El clon pST3#1 (Figura 5) contenía la secuencia correcta de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 y se seleccionó para transfección.

Ejemplo 3 - Transfección del plásmido

El plásmido phCG (Fig. 4), que tiene un único sitio *Pvu*I situado en el gen de la beta-lactamasa procariótica, se linealizó con *Pvu*I (New England Biolabs Cat. No. R0150). El ADN linealizado del plásmido se transfectó dentro de células PER.C6® como sigue.

Los cultivos celulares se mantuvieron en medio PERMAB completo (CD4PERMAB (Hyclone Cat. No. SH30871.01) suplementado con L-glutamina hasta una concentración final de

9

3mM (Invitrogen Cat. No. 25030-123) y Pluronic F68 a una concentración final de 1,0 g/L (Invitrogen Cat. No. 24040-032) en frascos de Erlenmeyer de 250mL. Las células se mantuvieron en una incubadora de agitación (Kuhner Climo-shaker ISF1-X) a 100 rpm, 5% CO₂ y 37°C, durante por lo menos 14 días antes de la transfección. 48 horas antes de la transfección, las células fueron transferidas a medio fresco a una densidad de 0,5x10⁶ células/mL. En 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 fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en medio PERMAB fresco antes de mezclarlas con ADN phCG linealizado. La mezcla célula/ADN fue sometida a electrochoque en la cámara de un electroporador a 250V durante 5 msec, antes de ser transferidas rápidamente a 10mL de medio PERMAB precalentado. Este proceso se repitió un total de 6 veces y las 6 transfecciones se agruparon en un único matraz de cultivo celular T-175cm². El matraz se puso en una incubadora estática a 37°C, 5% CO₂. Después de 48 horas, las células fueron resuspendidas en el volumen adecuado de PERMAB selectivo (medio PERMAB completo + G418 (125 µg/mL)) para dar una densidad de células viables de 0,5x10⁶/mL. El banco de cultivo se pasó dos veces a la semana, manteniendo las células a una densidad de 0,3x10⁶ células/mL en medio selectivo hasta cuando la viabilidad celular aumentó hasta >50%. En este punto, las células fueron transferidas a cultivos bajo agitación en matraces de Erlenmeyer de 250 mL. Después de varias semanas en cultivo con agitación, el sobrenadante del banco se muestreó y examinó para determinar la concentración de hCG. Una vez que se estableció que el banco era positivo para la expresión de hCG, las células fueron preparadas para clonación de dilución limitada.

Una suspensión de células a 0,3 células viables/mL se preparó en medio PERMAB suplementado con G-418 at 125 µg/mL. La suspensión de células se dispensó en placas de cultivo tisular de 96 pozos de fondo plano a 200 µL/well y se incubó en una atmósfera humidificada a 37°C, 5% CO₂ (Binder CB150). Las placas se escanearon regularmente usando el Genetix Clone Select Imager para rastrear el crecimiento de las células en cada pozo.

Después de dos semanas, se identificaron 535 pozos que contenían colonias de células con crecimiento activo. Los sobrenadantes de estos pozos se muestrearon y examinaron para detectar la presencia de hCG usando un kit comercial (DRG Diagnostics HCG ELISA Cat. No. EIA1469).

Con base en los resultados de estos ensayos, un total de 162 colonias se transfirieron a placas de 24 pozos que contenían 0,5 mL/pozo de medio PERMAB selectivo. Cuando las células en los pozos estaban cerca de la confluencia, el sobrenadante de cada uno de los 162 pozos se muestreó y examinó para determinar los niveles de hCG. Con base en estos resultados, 91 de las líneas celulares de mejor expresión se seleccionaron para expandirlas en matraces T-25. Estas líneas celulares se cultivaron de nuevo hasta cerca de la confluencia, momento en el cual los sobrenadantes fueron muestreados y examinados para determinar hCG como se hizo arriba. Con base 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 llevó a cabo con cada una de estas 58 líneas celulares por métodos conocidos en el estado de la

técnica y la productividad específica se expresó en pg/célula/día.

Así las cosas, en este Ejemplo un plásmido que incorpora las cadenas alfa y beta de la hCG se transfectó en células PER.C6® y los transfectantes se seleccionaron usando medio que contenía G418. Las colonias de células en crecimiento fueron tamizadas para determinar la concentración de hCG en el sobrenadante y las que expresaban el más alto nivel se expandieron aún más. Después de rondas subsiguientes de expansión y tamizaje, 20 clones que expresaban hCG se seleccionaron para estudios de crecimiento y productividad. Con base en los resultados de estos estudios, 5 clones se seleccionaron para transfección con un segunda plásmido que incorpora el gen ST3GAL4.

Ejemplo 4 - Transfección con e plásmido ST3GAL4 pST3

Se generaron clones estables como se describió arriba en el Ejemplo 3.

Los cinco mejores clones producidos por el método descrito en el Ejemplo 3 se seleccionaron para transfección con el plásmido ST3GAL4 pST3 (véase Ejemplo 2, Figura 3 y 5). La transfección se llevó a cabo por electroporación usando el mismo método descrito en el Ejemplo 3, excepto que los transformantes se seleccionaron en medio PERMAB completo suplementado con Higromicina a 0,5 µg/mL en vez de G418. Usando este método, se obtuvieron cinco bancos que expresaron hCG. Las muestras de sobrenadantes de los bancos de transfección se valoraron en un modelo farmacocinético de la rata y, con base en estos datos junto con datos del ensayo de enlace de la RCA-lectina (que mide la galactosa expuesta sobre las cadenas de hCG), un único banco se seleccionó para clonación ulterior de dilución limitada, por métodos conocidos del estado de la técnica.

Esta clonación por dilución arrojó >600 clones, cada uno de los cuales también se tamizó para determinar la expresión de la hCG y el grado de galactosa expuesta medida por enlace de RCA-lectina. Los clones con los más bajos niveles de galactosa expuesta se expandieron aún más y las muestras se sometieron FC *on vivo* y datos de enlace a lectina para corroborar. Cinco clones derivados del único banco se valoraron aún más para determinar sus características de crecimiento y productividad. Cada uno de estos clones se expandió y se hizo un banco de células de reserva de semilla siguiendo procedimientos estándar de criopreservación. Las reservas del banco de células de reserva de semilla fueron descongeladas y se encontró que eran viable.

Ejemplo 5 - Análisis por enfoque isoeléctrico.

La electroforesis se define como el transporte de moléculas cargadas a través de un solvente por un campo eléctrico. La movilidad de una molécula biológica a través de un campo eléctrico dependerá de la resistencia del campo, la carga neta sobre la molécula, el tamaño y la forma de la molécula, la fuerza iónica y propiedades del medio a través del cual migran las moléculas. El enfoque isoeléctrico (IEF) es una técnica electroforética para la separación de proteínas con base en su pI. El pI es el pH al cual una proteína no tiene carga neta y no migra

21

en un campo eléctrico. El contenido de ácido siálico de las isoformas de hCG altera sutilmente el punto pI para cada isoforma, lo cual puede ser aprovechado usando esta técnica para visualizar las isoformas hCG Per.C6 de cada clon. Los puntos isoeléctricos de las isoformas de hCG producidas por Per.C6 fueron analizados usando el enfoque isoeléctrico. La hCG de las Per.C6 fue producida como se describe en el Ejemplo 6. Las muestras de hCG Per.C6 se separaron en geles de Novex® IEF que contienen 5% de poliacrilamida en condiciones nativas a un gradiente de pH de 3,0-7,0 en una solución anfólitica a pH 3,0-7,0. Las proteínas fueron visualizadas usando tinción de azul de Coomassie, usando métodos bien conocidos del estado de la técnica.

La Figura 6 muestra la detección de isoformas de rhCG por IEF coloreada con azul de Coomassie en composiciones producidas de acuerdo con la invención con las líneas celulares clonadas hechas por el método estipulado en los Ejemplos 6 (Carriles 4, 5, 6 y 7, 15 µg por carril); la composición derivada de CHO del estado de la técnica, 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 números de moléculas de ácido siálico. La Figura 6 indica que la hCG recombinante derivada de la línea celular humana modificada genéticamente con α 2,3- sialiltransferasa (composiciones de acuerdo con la invención) es más ácida que Ovitrelle y que la hCG urinaria de mujeres embarazadas.

La Figura 7 compara la concentración de hCG ("alfa-beta hCG") y la cadena beta libre ("beta hCG") producida usando las células de la invención (es decir, usando líneas celulares hechas por el método estipulado en los Ejemplos 1 a 4) las cuales incluyen la subunidad alfa "Optimizada", comparada con la concentración de hCG ("alfa-beta hCG") y la cadena beta libre ("beta hCG") producida en células de ejemplos comparativos que incluyen la subunidad alfa WT (de tipo silvestre). La Figura 7 muestra que las células de la invención expresan altas cantidades de hCG y bajo exceso de la subunidad beta libre. En otras palabras, el rendimiento y la pureza de la hCG recombinante producida por las células y los métodos de la invención mejora marcadamente. La Tabla A indica el porcentaje de subunidades de β -hCG libre en muestras semipurificadas de varios lotes de hCG producida usando las células de la invención (es decir, usando líneas celulares hechas por el método estipulado en los Ejemplos 1 a 4), las cuales incluyen la subunidad alfa "Optimizada" ("alfa hCG Opt."), comparada con el porcentaje de subunidades de β -hCG libre en muestras semipurificadas de hCG producida en células de ejemplos comparativos que incluyen la subunidad alfa WT (de tipo silvestre) ("Alfa hCG WT"), determinada Cromatografía hidrofóbica de fenil-5PW HPLC.

La Tabla A muestra que las células de la invención expresan altas cantidades de hCG y un exceso bastante bajo de la subunidad beta libre (5,7-10,6%) comparadas con células incluyen la subunidad alfa WT (64-66%). En otras palabras, el rendimiento y la pureza de la hCG recombinante producida por las células y métodos de la invención mejora marcadamente.

Tabla A

22

Clon	% β -hCG libre (PHE – 5PW)
Alfa hCG WT (1G2)	64,1
Alfa hCG WT (1G2)	66,0
alfa hCG (13,8)	5,7
Opt. alfa hCG (29)	7,5
Opt. alfa hCG (29)	6,6
Opt. alfa hCG (29)	10,6

Ejemplo 6 – Panorama de producción y purificación

Se desarrolló un procedimiento para producir hCG recombinante en células PER.C6 que fueron cultivadas en suspensión en medio libre de suero. El procedimiento se describe más adelante y se aplicó a varias líneas celulares PER.C6 que producen hCG.

La hCG recombinante de un clon transfectado de α 2,3-sialiltransferasa se preparó usando los métodos de los Ejemplos 1 a 4 que se describieron arriba.

Las células se cultivaron en matraces de agitación en medio 6GRO (SAFC) hasta alcanzar una densidad celular de 1×10^6 a 3×10^6 células/mL. Las células fueron transferidas a un biorreactor de tanque de agitación de vidrio de 5 L con a una densidad de cerca de 1×10^6 células/mL. El biorreactor operó en modo de perfusión usando un medio Proper1 (Lonza).

Luego, la purificación del producto rhCG se llevó a cabo usando varios pasos de ultrafiltración, cromatografía de captura de intercambio aniónico y catiónico, cromatografía hidrofóbica y cromatografía de pseudoafinidad, por métodos bien conocidos del estado de la técnica.

Durante todos los procedimientos de cromatografía, la presencia de hCG recombinante inmunorreactiva se confirmó por ELISA (DRG EIA 1469) y IEF (Ejemplo 5).

Ejemplo 7 – Contenido de ácido siálico

El ácido siálico es un carbohidrato ligado a las proteínas que se considera como un monosacárido y se presenta en combinación con otros monosacáridos como galactosa, manosa, glucosamina, galactosamina y fucosa. El ácido siálico total sobre la rhCG purificada de acuerdo con la invención se midió usando un método basado en el método de Stanton *et. al.* (J. Biochem. Biophys. Métodos. 30 (1995), 37 – 48). El contenido total de ácido siálico en las muestras de Per.C6 hCG recombinante modificada con α 2,3-sialiltransferasa (producida por los métodos de los Ejemplos 4 y 6) se midieron y los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación [expresados en términos de una proporción de moles de ácido siálico a moles de proteína].

Ejemplo 8 – hCG Bioensayo de acuerdo con 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. La actividad se midió de acuerdo con USP (monografías USP: Gonadotropina coriónica, USPC Oficial 8/1/09-11/30/09), usando Ovitrelle como estándar. Ovitrelle tiene una actividad biológica de 26.000 UI/mg (Curr Med Res Opin. 2005 Dec; 21(12): 1969 – 76). El límite de aceptación fue >21.000 IU hCG/mg. La actividad biológica para las muestras de la hCG recombinantes derivada de línea celular humana modificada genéticamente con α 2,3-sialiltransferasa se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Muestra	1	2	3	4	5	6
Contenido de ácido siálico (SA) (μ mol SA/ μ mol hCG)	13	13	13	13	13	15
Potencia UI/mg	25363	25009	24904	24623	25645	26623
% Potencia (Ovitrelle 26.000 UI/mg)	97,5	96,2	95,8	94,7	98,6	102,4
Muestra	7	8	9	10	11	
Contenido de ácido siálico (SA) (μ mol SA/ μ mol hCG)	14	14	13	13	13	
Potencia UI/mg	27227	26142	26539	26181	24230	
% Potencia (Ovitrelle 26.000 UI/mg)	104,7	100,5	102	101	93,2	

Como se ve arriba, la potencia es similar, y puede ser mayor que la de Ovitrelle (véase por ejemplo la Muestra 7).

Referencias

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

Bassett RM, y Dribergen R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alpha, 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., and 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) Isolación, cloning y sequence analysis of the cDNA for tyhe alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 281, 351-356.

Fiddes, J. C. and 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. and Goodman, H. M. (1980) The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough 5 into the 3'-untranslated region. *Nature*, 286, 684-387.

Kagawa Y, Takasaki S, Utsumi J, Hosoi K, Shimizu H, Kochibe N, and 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.

24
24

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 and 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 and Rudd PM (2006) *Methods in Molecular Biology*, ed I Brockhausen-Schutzbach (Humana Press), 347: Glycobiology protocols, 125-144.

Steelman SL, and 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, and 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, and 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, and Padmanabhan V. (1995). Follicle stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev.* **16(6)**, 765-787.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, and 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.

75

Alfa hCG optimizada

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

```
1      ATGGACTACTACCGGAAGTA      CGCCGCCATC
      TTCCTGGTGACCCTGAGCGT GTTCCTGCAC
61      GTGCTGCACA      GCGCCCCTGA
      CGTGCAGGAC      TGCCCCGAGT
      GCACCCTGCA
10      GGAAAACCCC
121      TTCTTCAGCCAGCCTGGCGC      CCCTATCCTG
      CAGTGCATGG      GCTGCTGCTT CAGCAGAGCC
181      TACCCACACC      CCCTGCGGAG
      CAAGAAAACC      ATGCTGGTGC
      AGAAAAACGT GACCAGCGAG
15      241 AGCACCTGCT      GCGTGGCCAA
      GAGCTACAAC      CGGGTGACCG      TGATGGGCGG
CTTCAAGGTG
301 GAGAACCACA CCGCCTGCCA CTGCAGCACC TGCTACTACC ACAAGTCCT
```

Secuencia proteínica de alfa hCG optimizada

```
20
1      MDYYRKYAAI FLVTLVFLH VLHSAPDVQDCPECTLQENP
      FFSQPGAPIL QCMGCCFSRA
61 YPTPLRSKKT MLVQKNVTSE STCCVAKSYN RVTVMGGFKV ENHTACHCST
CYYHKS
```

25
Polipéptido de la beta gonadotropina coriónica humana

Número de accesoión NP_000728

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

Secuencia de nucleótidos

```
1      ATGGAGATGT      TCCAGGGGCT
      GCTGCTGTTG      CTGCTGCTGA
      GCATGGGCGG
35      GACATGGGCA
61      TCCAAGGAGC      CGCTTCGGCC
      ACGGTGCCGC      CCCATCAATGCCACCCTGGC
TGTGGAGAAG
121      GAGGGCTGCC      CCGTGTGCAT
      CACCGTCAAC      ACCACCATCTGTGCCGGCTA
CTGCCCCACC
40      181 ATGACCCGCG      TGCTGCAGGG
      GGTCTGCCG      GCCCTGCCTC      AGGTGGTGTG
22
```

26

CAACTACCGC

241	GATGTGCGCT	TCGAGTCCATCCGGCTCCCT
	GGCTGCCCCGC	GCGGCGTGAA CCCC GTGGTC
301	TCCTACGCCG	TGGCTCTCAG
	CTGTCAATGTGCACTCTGCC	GCCGCAGCAC
45	CACTGACTGC	

361 GGGGGTCCCA AGGACCACCC
 CTTGACCTGTGATGACCCCC GCTTCCAGGA
 CTCCTCTTCC
 421 TCAAAGGCC CTCCCCCAG
 CCTTCCAAGTCCATCCCGAC TCCCGGGGCC
 CTCGGACACC
 5 481 CCGATCCTCC CACAATAA

Secuencia proteínica de la beta hCG

1 MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN
 10 TTICAGYCPT
 61 MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC
 ALCRRSTTDC
 121 GGFCDHPLTC DDPRFQDSSS SKAPPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ

15
 Beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4

Número de accesoión L23767

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

1 ATGTGTCCTGCAGGCTGGAA GCTCCTGGCC
 ATGTTGGCTCTGGTCCTGGT CGTCATGGTG
 61 TGGTATTCCATCTCCCGGGA AGACAGGTAC
 ATCGAGCTTTTTTATTTTCC
 25 CATCCCAGAG
 121 AAGAAGGAGC CGTGCCTCCA
 GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG
 CCTCTAAGCT CTTTGGCAAC
 181 TACTCCCGGG ATCAGCCCATCTTCCTGCGG
 CTTGAGGATTATTTCTGGGT CAAGACGCCA
 30 241 TCTGCTTACGAGCTGCCCTA TGGGACCAAG
 GGGAGTGAGG ATCTGCTCCT
 CCGGGTGCTA
 301 GCCATCACCA GCTCCTCCATCCCCAAGAAC
 ATCCAGAGCC TCAGGTGCCG CCGCTGTGTG
 361 GTCGTGGGGA ACGGGCACCG
 GCTGCGGAAC AGCTCACTGG
 GAGATGCCAT
 35 CAACAAGTAC
 421 GATGTGGTCA TCAGATTGAACAATGCCCCA
 GTGGCTGGCT ATGAGGGTGA CGTGGGCTCC
 481 AAGACCACCA TGCCTCTCTTCTACCCTGAA
 24

TCTGCCCACCTTCGACCCCAA AGTAGAAAAC
40 541 AACCCAGACA CACTCCTCGTCCTGGTAGCT
TTCAAGGCAA TGGACTTCCA
CTGGATTGAG
601 ACCATCCTGAGTGATAAGAAGCGGGTGCGA
AAGGGTTTCTGGAAACAGCC TCCCCTCATC

28
28

```

661      TGGGATGTCA      ATCCTAAACA GATTCCGGATT
      CTCAACCCCTTCTTCATGGA GATTGCAGCT
721      GACAAACTGC      TGAGCCTGCC
      AATGCAACAG      CCACGGAAGA
      TTAAGCAGAA

GCCCACCACG
781      GGCCTGTTGG      CCATCACGCT      GGCCCTCCAC
      CTCTGTGACT      TGGTGCACAT TGCCGGCTTT
841      GGCTACCCAG      ACGCCTACAA
      CAAGAAGCAG      ACCATTCACT ACTATGAGCA

GATCACGCTC
901      AAGTCCATGG      CGGGGTCAGG
      CCATAATGTC TCCCAAGAGG      CCCTGGCCAT
10      TAAGCGGATG
961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCACG TCCTTCTGA

```

Secuencia proteínica de ST3GAL4

```

1      MCPAGWKLLA  MLALVLVVMV WYSISREDRY IELFYFPIPE
      KKEPCLQGEA ESKASKLFGN

61      YSRDQPIFLR LEDYFWVKTP SAYELPYGTK GSEDLLLRVL AITSSSIFCN
IQSLRCRRCV

121      VVGNGHRLRN      SSLGDAINKY DVVIRLNNAP
      VAGYEGDVGS      KTTMRLFYPE

20      SAHFDFCVEN

181      NPDTLLVLVA FKAMDFHWIE TILSDKKRVR KGFWKQPPLI
      WDVNFCQIRI LNPFFMEIAA

241      DKLLSLPMQQPRKIKQKPTT GLLAITLALH LCDLVHIAGF
      GYPDÍANKKQ TIHYEQITL

25      301 KSMAGSGHNV SQEALAIKRM LEMGAIKNLT SF

```

Alfa hCG optimizada chain

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

```

30
1      GCCCCTGACG      TGCAGGACTG
      CCCCAGGTGC      ACCCTGCAGG
      AAAACCCCTT CTTCAGCCAG

61      CCTGGCGCCC      CTATCCTGCAGTGCATGGGC
      TGCTGCTTCA      GCAGAGCCTA CCCCACCCCC

35      121 CTGCGGAGCA      AGAAAACCATGCTGGTGCAG
      AAAAACGTGA      CCAGCGAGAG

CACCTGCTGC

```

181 GTGGCCAAGA GCTACAACCG
GGTGACCGTG ATGGGCGGCT
TCAAGGTGGA GAACCACACC

40

241 GCCTGCCACT GCAGCACCTG CTACTACCAC AAGTCCT

Secuencia proteínica de la cadena alfa hCG optimizada

71
31

1 APDVQDCPEC TLQENPFFSQ PGAPILQCMG
 CCFSRAYPTP LRSKKTMLVQ
KNVTSESTCC

61 VAKSYNRVTM MGGFKVENHT ACHCSTCYHH KS

Polipéptido de alfa hCG

Número de accesoión AH007338

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

1 ATGGATTACT ACAGAAAATA TGCAGCTATCTTTCTGGTCA
 CATTGTCGGT GTTTCTGCAT
15 61 GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGCAGGAT
 TGCCCAGAAT GCACGCTACA
GGAAAACCCA
121 TTCTTCTCCC AGCCGGGTGC CCCAATACTT
 CAGTGCATGG GCTGCTGCTT CTCTAGAGCA
181 TATCCCACTCCACTAAGGTC CAAGAAGACG
 ATGTTGGTCCAAAAGACGT
20 CACCTCAGAG
241 TCCACTTGCT GTGTAGCTAAATCATATAAC AGGGTCACAG
 TAATGGGGGG TTTCAAAGTG
301 GAGAACCACA CGGCGTGCCA CTGCAGTACT TGTTATTATC ACAAATCTTA A

25 Secuencia proteínica de alfa hCG

1 MDYYRKYAAI FLVTLVFLH VLHSAPDVQDCPECTLQENP
 FFSQPGAPIL QCMGCCFSRA
61 YPTPLRSKKT MLVQKNVTSE STCCVAKSYN RVTVMGGFKV ENHTACHCST
CYHHKS
30

Reivindicaciones

1. Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.
2. Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 4.
3. Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos con por lo menos 97% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1.
4. Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos con por lo menos 97% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4.
5. Una célula que se caracteriza porque tiene integrada en su genoma una secuencia que codifica la cadena α de la hCG seleccionada de entre: Una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de homología con la secuencia de SEQ ID NO:1; una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con la secuencia de SEQ ID NO:1; una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 4; una secuencia que tiene por lo menos 96,5% de homología con la secuencia de SEQ ID NO: 4; y una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con la secuencia de SEQ ID NO:4.
6. Una célula de acuerdo con la reivindicación 5 que es una célula PER.C6® como una célula PER.C6® depositada bajo ECACC no. 96022940.
7. Una célula PER.C6® como una célula PER.C6® depositada bajo ECACC no. 96022940, que se caracteriza porque además tiene integrada en su genoma una secuencia que codifica la cadena α de la hCG.
8. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 que se caracteriza porque además tiene integrado en su genoma un ADNc que codifica alfa-2,3- sialiltransferasa.
9. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 que se caracteriza porque además tiene integrado en su genoma una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena β de la hCG

- 23
10. Un método para producir la proteína recombinante en una célula, que comprende cultivar una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 en un medio adecuado y cosechar la proteína recombinante de la mencionada célula y/o el mencionado medio.
 11. Un método para producir hCG recombinante en una célula, que comprende cultivar la célula en un medio adecuado y cosechar la proteína recombinante (hCG) de la mencionada célula y/o el mencionado medio. Tal como se usa en este contexto la célula es una célula PER.C6® que tiene integrada en su genoma una secuencia que codifica la cadena α de la hCG.
 12. Una hCG recombinante ("rhCG" o "rechCG") que incluye α 2,3- y α 2,6-sialilación. Tal como se usa en este contexto, la hCG recombinante es producida en una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.