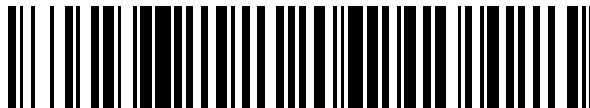


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 183**

51 Int. Cl.:

C07K 14/59 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2008** **E 08774439 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013** **EP 2170942**

54 Título: **Clon de células que producen FSH**

30 Prioridad:

28.06.2007 EP 07111257

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2013

73 Titular/es:

**BIOGENERIX AG (100.0%)
HIGH-TECH-PARK MANNHEIM JANDERSTRASSE
3
68199 MANNHEIM, DE**

72 Inventor/es:

**ARNOLD, STEFAN y
JELINEK, NANNI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 183 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

Clon de células que producen FSH

5 La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena β de la hormona estimulante del folículo (FSH) humana, en donde la secuencia de ácido nucleico se ha modificado en células CHO con respecto al uso de codones, en comparación con la secuencia de ácido nucleico de FSH humana de tipo silvestre.

La presente invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende tales secuencias de ácido nucleico y a células hospedadoras que contienen tales moléculas de ácido nucleico recombinante, así como a su uso en la producción de FSH humana recombinante.

10 Por último, la presente invención también se refiere a un método para producir células hospedadoras que expresan la hormona estimulante del folículo humana mediante la transfección de células cultivadas en suspensión en condiciones exentas de suero, con la molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención.

15 La hormona estimulante del folículo (FSH) es producida por las células gonadotrópicas de la pituitaria anterior y se libera en la circulación. La FSH actúa junto con la hormona luteinizante (LH) sobre el control de la maduración de oocitos en las hembras y de la espermatogénesis en los machos. Tanto la FSH como la LH pertenecen a una familia de glicoproteínas heterodímeras que consisten en dos cadenas α y β unidas no covalentemente, que están codificadas por genes distintos. Mientras que la secuencia de aminoácidos de la cadena α de FSH y LH es idéntica, la secuencia de aminoácidos de la cadena β es diferente en ambas proteínas. Tanto la cadena α como la β están glicosiladas. La cadena α de la FSH tiene dos sitios potenciales de glicosilación ligados a asparagina en las
20 posiciones 52 y 78, mientras que la cadena β de la FSH tiene dos sitios potenciales de glicosilación ligados a asparagina en las posiciones 7 y 24 (Olijve et al. (1996) Mol. Hum. Reprod. 2(5): 371-382).

25 La FSH humana se utiliza para tratar a mujeres con anovulación, para estimular el desarrollo multifolicular (superovulación) y en la preparación de una reproducción asistida como IVF, GIFT o ZIFT. Por otra parte, la FSH humana se utiliza para estimular la maduración de los folículos en mujeres con una producción baja o inexistente de FSH y para estimular la espermatogénesis en hombres con hipogonadismo hipogonadotrópico congénito o adquirido.

30 Originalmente, la FSH para usos medicinales se purificaba a partir de orina humana post-menopáusica. Sin embargo, esta FSH purificada tiene el inconveniente de que también contiene LH y otras proteínas contaminantes de origen humano. Por otra parte, el uso de una fuente natural de este tipo, implica una disponibilidad y consistencia limitadas del producto.

Con la llegada de la tecnología del ADN recombinante, se hizo posible producir FSH humana en cultivos de células transfectadas con secuencias de ácido nucleico que codificaban la cadena α y β . Las secuencias de ADN que codifican las cadenas α y β y los métodos para producir FSH humana recombinante, se han descrito, por ejemplo, en los documentos WO 88/10270, WO 86/04589 y EP 0 735 139.

35 Actualmente, hay dos productos comerciales de FSH humana recombinante en el mercado en Alemania, a saber, GONAL-F[®] y PUREGON[®], produciéndose ambos mediante la expresión del ADN de tipo silvestre que codifica las cadenas α y β en células CHO.

40 Sin embargo, todavía existe una necesidad de mejorar la expresión de las cadenas de FSH para perfeccionar el rendimiento y la tasa de expresión de la FSH en un número dado de células. Por tanto, un problema subyacente de la presente invención es proporcionar secuencias de ácido nucleico y moléculas de ácido nucleico recombinante a través de las cuales se pueda producir FSH humana recombinante en grandes cantidades en células eucariotas.

El documento WO 01/58493 A1 describe plásmidos que contienen genes que codifican la cadena α y la β de FSH, en donde los genes estaban adaptados para el uso de codones en células de mamífero.

45 Wang et al. (2006) Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology 20(3): 266-269 describen que el uso de codones en células CHO negativas para dhfr difiere del uso de codones en hámster chino.

Gustafsson et al. (2004) Trends in Biotechnology 22(7): 346-353 analizan que la preferencia de codones de un organismo hospedador puede influir sobre el nivel de expresión de las proteínas heterólogas.

50 El documento WO 2007/003640 A1 describe un método para cultivar células que expresan FSH en un medio exento de suero que contiene antioxidantes tales como glutatión, 2-mercaptoetanol, metionina o una combinación de ácido ascórbico y alfa-tocoferol.

De acuerdo con la presente invención, este y otros problemas se resuelven por medio de las características de la reivindicación principal.

Las realizaciones ventajosas se definen en las reivindicaciones dependientes.

De acuerdo con la presente invención, las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico modificadas que codifican la cadena α y la cadena β de la FSH humana, que se han adaptado para el uso de codones en células de ovario de hámster chino (CHO), se utilizan para la transfección de células CHO y producen un aumento significativo en la producción de FSH en las células CHO transfectadas.

5 En el contexto de la presente invención, la expresión "aumento de la producción de FSH" se refiere a la situación en la que al concluir la expresión de las secuencias de ácido nucleico modificadas en la célula hospedadora, se produce una mayor cantidad de FSH en una célula hospedadora en comparación con la situación en la que una secuencia de ácido nucleico no modificada que codifica FSH con la misma secuencia de aminoácidos, se expresa en el mismo tipo de células hospedadoras en condiciones similares, tales como por ejemplo, procedimientos de
10 transfección comparables, vectores de expresión comparables, etc.

El código genético es redundante ya que 20 aminoácidos están especificados por 61 codones de tripletes. Por lo tanto, la mayor parte de los 20 aminoácidos proteinógenos están codificados por varios tripletes de bases (codones). Sin embargo, los codones que especifican un aminoácido particular no se utilizan con la misma frecuencia en un organismo específico, sino que son los codones preferidos los que se utilizan frecuentemente, y los codones raros los que se utilizan con menos frecuencia. Dichas diferencias en el uso de codones se someten a presiones evolutivas selectivas y, en particular, a la eficacia de la traducción. Una de las razones de la baja eficacia de la traducción de los codones que están presentes pocas veces, podría ser que los grupos correspondientes de aminoacil-ARNt se agotan y, por lo tanto, ya no están disponibles para la síntesis de proteínas.
15

Por otra parte, diferentes organismos prefieren diferentes codones. Así, por ejemplo, la expresión de un ADN recombinante procedente de una célula de mamífero se lleva a cabo frecuentemente de forma imperfecta en células de *E. coli*. Por lo tanto, la sustitución de codones utilizados pocas veces por codones utilizados con frecuencia puede mejorar la expresión en algunos casos.
20

De muchos organismos se conoce la secuencia de ADN de un amplio número de genes y existen tablas a partir de las cuales se puede obtener la frecuencia del uso de codones específicos en el organismo respectivo. Mediante el uso de dichas tablas, las secuencias de proteínas se pueden traducir de forma inversa de manera relativamente exacta, para formar una secuencia de ADN que contiene los codones preferidos en el organismo respectivo, para los diferentes aminoácidos de la proteína. Las tablas para el uso de codones se pueden encontrar, entre otras, en las siguientes direcciones de Internet:
25

<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html> o

30 <http://www.entelechon.com/index.php?id=tools/index>.

También hay programas disponibles para la traducción inversa de una secuencia de proteína, por ejemplo, la secuencia proteica de la cadena α o de la cadena β de la FSH humana, para formar una secuencia de ADN degenerado, como por ejemplo en

<http://www.entelechon.com/eng/backtranslation.html>.

35 La expresión "secuencia de ácido nucleico" para los fines de la presente invención, se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que codifica polipéptidos, tales como péptidos, proteínas, etc. Estas moléculas de ácido nucleico pueden ser de ADN, de ARN o de análogos de los mismos. Sin embargo, se prefieren las moléculas de ácido nucleico preparadas con ADN.

40 Una persona experta en la técnica es plenamente consciente de que la modificación de la secuencia de nucleótidos de partida describe el proceso de optimización con respecto al uso de codones.

Si, por ejemplo, la secuencia codificadora de una enzima de tipo silvestre ajena se ajusta al uso de codones de células CHO, los cambios introducidos se pueden identificar fácilmente comparando la secuencia modificada y la secuencia de partida (véanse las Figuras 1a y 1b). Por otra parte, ambas secuencias codificarán la misma secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la cadena α de la FSH humana se describe en SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos de la cadena β de la FSH humana se describe en SEQ ID NO: 6. Estas secuencias de aminoácidos se corresponden con las secuencias de aminoácidos de tipo silvestre de la cadena α y de la cadena β de la FSH humana, tal y como se han depositado con el número de orden J 00152 en la base de datos de EMBL y el número de orden NM_000510 en la base de datos de NCBI, respectivamente.
45

En el caso de la cadena α de la FSH humana, la secuencia de ácido nucleico de partida se muestra en SEQ ID NO: 3 y en el caso de la cadena β de la FSH humana, la secuencia de ácido nucleico de partida se muestra en SEQ ID NO: 4.
50

De acuerdo con la descripción, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana se modifica con respecto al uso de codones en las células CHO, al menos en 30 posiciones, preferiblemente al menos en 40 posiciones, en particular preferiblemente al menos en 50 posiciones, también particularmente preferible al menos en 60 o 70 posiciones, y lo más preferiblemente al menos en 75 posiciones, en comparación con la
55

secuencia de partida.

Además, de acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena β de la FSH humana se modifica con respecto al uso de codones en las células CHO, al menos en 65 posiciones en comparación con la secuencia de partida.

5 La secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la cadena β de la FSH humana es la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 1. En SEQ ID NO: 1, la región codificadora comienza en el nucleótido 56 y se extiende hasta el nucleótido 442.

10 Lo más preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico mejorada que codifica la cadena α de la FSH humana es la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 2, o una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 2, en al menos un 85%, preferiblemente en al menos un 87% o un 90%, en particular preferentemente en al menos un 92% o un 94% y lo más preferiblemente en al menos un 96%, 98% o 99% a lo largo de toda región codificadora. En SEQ ID NO: 2, la región codificadora comienza en el nucleótido 19 y se extiende hasta el nucleótido 366.

15 Las expresiones "secuencia de ácido nucleico no modificada", "secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre" o "secuencia de ácido nucleico de partida" para los fines de la presente invención, se refieren a una secuencia de ácido nucleico que se pretende utilizar para la (hiper)expresión en una célula hospedadora y que no se ha adaptado al uso de codones en la célula hospedadora, sino que es la secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre real que codifica la proteína.

20 Las expresiones "secuencia de ácido nucleico modificada" o "secuencia de ácido nucleico mejorada" para los fines de la presente invención, se refieren a una secuencia que se ha modificado para la expresión en una célula hospedadora adaptando la secuencia de la secuencia de ácido nucleico no modificada/de partida al uso de codones de la célula hospedadora. Una secuencia de ácido nucleico modificada o mejorada codifica una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la proteína codificada por la secuencia no modificada.

25 La identidad de secuencia se determina a través de una variedad de programas basados en diferentes algoritmos. En esta memoria, los algoritmos de Needleman y Wunsch o de Smith y Waterman logran resultados particularmente fiables. Para la comparación de secuencias, se utilizó el programa PileUp (Feng y Doolittle (1987) *J. Mol Evolution* 25: 351-360; Higgins et al. (1989) *CABIOS* 5: 151-153) o los programas Gap y Best Fit (Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol Biol.* 48: 443-453 y Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489), que están contenidos en el paquete de programas informáticos de GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

30 Los valores de identidad de la secuencia proporcionados en este documento en porcentaje, se determinaron con el programa Gap sobre toda la región de la secuencia, con la siguiente configuración: Peso del hueco: 50, Peso de Longitud: 3, Coincidencias Promedio: 10.000, y Desigualdades Promedio: 0,000.

35 A menos que se especifique lo contrario, dicha configuración se utilizó como configuración estándar para la comparación de secuencias.

Sin pretender estar vinculado a una hipótesis, se supone que las secuencias de ADN con codones mejorados permiten una traducción más eficaz y los ARNm formados a partir de los mismos tienen posiblemente un período de semivida más largo en la célula y, por lo tanto, están disponibles más frecuentemente para la traducción.

40 Una persona experta en la técnica está bien familiarizada con las técnicas que permiten cambiar la secuencia de ácido nucleico original de partida, a una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica polipéptidos de aminoácidos idénticos pero con diferente uso de codones. Esto puede lograrse, p. ej., mediante técnicas de mutagénesis basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, por procedimientos de clonación conocidos generalmente, por síntesis química, etc.

45 Es también un objeto de la presente invención una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la cadena β de la FSH humana, en donde la secuencia de ácido nucleico modificada es la región codificadora de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1, y en donde la secuencia de ácido nucleico modificada está bajo el control de un promotor que es activo en una célula hospedadora.

50 La expresión "promotor que es activo en una célula hospedadora" se debe entender en el sentido de que el promotor, dentro de la molécula de ácido nucleico recombinante, permite la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula hospedadora en la que se desea la expresión de la secuencia de ácido nucleico. La actividad de un promotor se determina generalmente por la presencia de factores de transcripción que son capaces de unirse al promotor y activar la transcripción.

55 Los promotores que son adecuados para la expresión de secuencias de ácido nucleico en células de mamífero, son bien conocidos por la persona experta en la técnica e incluyen promotores víricos tales como CMV, SV40, HTLV o el

promotor tardío principal de adenovirus y otros promotores tales como el promotor EF-1 α o el promotor UbC.

La expresión "célula hospedadora" 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, por ejemplo, de polipéptidos. En particular, la expresión "célula hospedadora" u "organismo" se refiere a células procariontas, eucariotas inferiores, vegetales, de insecto o a sistemas de cultivo de células de mamífero. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula de mamífero, más preferiblemente la célula hospedadora es una célula de roedor, incluso más preferiblemente la célula hospedadora es una célula de roedor que tiene un uso de codones similar al de la célula CHO y lo más preferiblemente esta célula hospedadora es una célula CHO.

La línea celular CHO hospedadora usada para la expresión de las secuencias modificadas y para la producción de FSH humana recombinante, es un derivado de una línea celular CHO-K1 y carece de actividad reductasa de dihidrofolato (dhfr). La línea celular se obtuvo a partir de DSMZ (n° de cat. ACC 126) y se adaptó a las condiciones de cultivo en suspensión y exento de suero.

Una línea celular CHO que contiene una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una primera secuencia de ácido nucleico mejorada que codifica la cadena β de la FSH humana y una segunda secuencia de ácido nucleico mejorada que codifica la cadena α de la FSH humana, se depositó el 28 marzo de 2007 en la DSMZ en Braunschweig con el número de depósito DSM ACC2833.

La expresión "molécula de ácido nucleico recombinante" en el sentido de la presente invención, comprende todos los tipos de moléculas de ácido nucleico que se pueden introducir en una célula hospedadora y pueden efectuar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que está contenida dentro de la molécula de ácido nucleico recombinante. La expresión comprende, entre otros, vectores de plásmidos y vectores víricos tales como vectores adenovíricos, retrovíricos y lentivíricos, prefiriéndose los vectores plasmídicos.

Ejemplos de vectores plasmídicos adecuados que se pueden utilizar para expresar proteínas en células de mamífero son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, la serie de vectores pCI, pSI (Promega), los vectores pcDNA[®], pCEP4, pREP4, pSHOOTER[®], pZeoSV2 (Invitrogen), pBlast, pMono, pSELECT, pVITRO y pVIVO (InVivogen). Además del promotor y de la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar, una molécula de ácido nucleico recombinante por lo general contiene otros elementos funcionales tales como secuencias de poliadenilación, genes de selección procariontas y/o eucariotas que permiten la identificación de células procariontas y/o eucariotas transformadas de forma positiva, y un origen de replicación. El experto sabe qué los elementos tiene que seleccionar para un fin específico, y qué vector plasmídico es adecuado para la expresión de una secuencia específica de ácido nucleico en una célula hospedadora específica.

Las moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden obtener por métodos convencionales de biología molecular que se describen en la bibliografía, por ejemplo, en Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York, EE.UU.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención comprende tanto una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la cadena β de la FSH humana como una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana se selecciona a partir de una secuencia de ácido nucleico mejorada que codifica la cadena α de la FSH humana que se selecciona a partir del grupo que consiste en la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 2, las secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de al menos el 85% con la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2, la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico no modificada, tal y como se representa en SEQ ID NO: 3 y las secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de al menos el 70% con la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico tal y como se muestra en SEQ ID NO: 3.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana puede estar bajo el control del mismo promotor que la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena β de la FSH humana, por ejemplo, por medio de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), o puede estar bajo el control de un promotor distinto. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana está bajo el control de un promotor distinto. Más preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena β mejorada de la FSH humana, está bajo el control de un promotor de SV40 y la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana está bajo el control de un promotor de CMV. Lo más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención tiene la secuencia de ácido nucleico descrita en SEQ ID NO: 7.

La presente invención se refiere además a una célula hospedadora que contiene una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico mejorada que codifica la cadena β de la FSH humana y que contiene además una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana, que se selecciona a partir de una secuencia de ácido nucleico modificada, seleccionada entre el grupo que consiste en la región codificadora de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 y las secuencias de nucleótidos

que tienen una identidad de secuencia de al menos el 85% con la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico, tal y como se describe en SEQ ID NO: 2 y la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico no modificada, tal y como se describe en SEQ ID NO: 3 y las secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de al menos el 70% con la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico, tal y como se describe en SEQ ID NO: 3.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana puede estar presente en la misma molécula de ácido nucleico recombinante que la secuencia de ácido nucleico mejorada que codifica la cadena β de la FSH humana, o se puede introducir en la célula hospedadora en una molécula de ácido nucleico recombinante distinta. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana está presente en la misma molécula de ácido nucleico recombinante que la secuencia de ácido nucleico mejorada que codifica la cadena β de la FSH humana.

La célula hospedadora se puede seleccionar a partir de sistemas de cultivo de células de mamífero, tales como células NIH3T3, células CHO, células COS, células 293, células Jurkat, células BHK y células HeLa. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula de roedor, más preferiblemente la célula hospedadora es una célula de roedor que tiene un uso de codones similar al de la célula CHO y lo más preferiblemente, esta célula hospedadora es una célula CHO.

Es también un objeto de la presente invención un cultivo celular que comprende las células hospedadoras que contienen una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la cadena β de la FSH humana y una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en la secuencia de ácido nucleico no modificada y la secuencia de ácido nucleico modificada, tal y como se han definido anteriormente, en un medio de cultivo adecuado.

El cultivo celular se obtiene cultivando las células hospedadoras en un medio de cultivo adecuado en condiciones que apoyan el crecimiento de las células hospedadoras.

La expresión "células en cultivo" se debe entender en el sentido de que las células se mantienen *in vivo* en condiciones que permiten la proliferación, el metabolismo normal de las células y la formación de la proteína recombinante. Esto significa que las células se proporcionan con todos los nutrientes necesarios, así como con oxígeno y se mantienen a un pH adecuado y una osmolaridad adecuada. Las células se pueden cultivar de cualquier manera adecuada. Preferiblemente, las células se cultivan como un cultivo en suspensión, por ejemplo, en matraces o en matraces giratorios. El término "cultivo" incluye el cultivo por lotes, el cultivo por lotes con alimentación, así como cultivos de perfusión y otros métodos de cultivo adecuados.

El "cultivo en suspensión" significa que las células no se adhieren a una superficie, pero se distribuyen en el medio de cultivo.

El "cultivo por lotes", en el sentido de la presente invención, es un método de cultivo en el que ni se añade medio de cultivo ni se retira durante el cultivo.

Un "método por lotes con alimentación", en el sentido de la presente invención, es un método de cultivo en el que se añade medio de cultivo durante el cultivo, pero no se retira.

"Cultivo en perfusión" dentro del alcance de la presente invención, es un método de cultivo en el que durante el cultivo se retira medio de cultivo y se añade nuevo medio de cultivo.

El medio de cultivo tiene con preferencia únicamente un bajo contenido en suero, por ejemplo, un contenido máximo de 1% (v/v) en suero; lo más preferiblemente, el medio está exento de suero. Ejemplos de medios de cultivo adecuados son medios basales tales como RPMI 1640, DMEM, F12, ProCHO5 o eRDF, que se pueden mezclar entre sí y con suplementos de acuerdo con la necesidad de las células. Además de glucosa y aminoácidos, el medio puede contener agentes quelantes tales como ácido tricarbóxico aurina (ATA), sales inorgánicas tales como sales de fosfato, poliaminas y sus precursores, tales como putrescina, hormonas tales como insulina, antioxidantes tales como ácido ascórbico y mezclas de vitaminas, precursores de lípidos tales como etanolamina y sustancias protectoras de las células tales como Pluronic F68. El experto sabe qué medio de cultivo utilizar para el cultivo de un tipo específico de células. Preferiblemente, el medio de cultivo es ProCHO5.

Es también un objeto de la presente invención un método en el que una célula hospedadora de acuerdo con la presente invención se cultiva en primer lugar en un medio de cultivo adecuado durante un cierto período de tiempo y después se recoge el material sobrenadante del cultivo celular.

El "material sobrenadante del cultivo celular" es el medio del cultivo celular que estaba en contacto con las células durante un cierto período de tiempo y que luego se ha separado de las células. El material sobrenadante del cultivo celular contiene la proteína recombinante producida por las células. Las células se pueden separar del material sobrenadante mediante técnicas convencionales de separación, tales como filtración y centrifugación. En cultivos a largo plazo, el material sobrenadante de las células hospedadoras de acuerdo con la presente invención contiene

concentraciones de FSH de al menos 500 ng/ml, preferiblemente al menos 1000 ng/ml, más preferiblemente al menos 1500 ng/ml y lo más preferiblemente al menos 2000 ng/ml.

5 La FSH humana recombinante se puede purificar desde el material sobrenadante del cultivo celular a través de una o varias etapas de purificación. Los métodos de purificación adecuados son conocidos por el experto e incluyen la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía en hidroxipatita, la cromatografía de afinidad y la filtración en gel. Los métodos para purificar la FSH humana recombinante se describen, por ejemplo, en los documentos WO 00/63248, WO 2006/051070 y WO 2005/063811.

10 Para la administración como medicamento, la FSH humana recombinante, purificada se mezcla con uno o varios excipientes para obtener una formulación que se puede administrar a los pacientes. Las formulaciones adecuadas para la FSH humana recombinante se describen, entre otros, en los documentos EP 0 853 945, EP 1 285 665, EP 0 974 359, EP 1 188 444 y EP 1 169 349.

15 La célula hospedadora de la presente invención se produce mediante la transfección de células con una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención que comprende solo la secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la cadena β de la FSH humana o también una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana. Alternativamente, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena β y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena α pueden estar presentes en moléculas de ácido nucleico recombinantes distintas que se introducen en la célula hospedadora ya sea de forma simultánea o sucesivamente.

20 Los métodos de transfección adecuados son conocidos por una persona experta en la técnica e incluyen, por ejemplo, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación y lipofección. Los kits comercialmente disponibles para la transfección, tales como SuperFect, PolyFect, Effectene (Qiagen), TransFast[®], Profection[®], Transfectam[®] (Promega) y TransPass[®] (NEB) también se pueden utilizar. Preferiblemente, las células se transfectan mientras que están en suspensión y se transfectan en condiciones exentas de suero.

25 Para la producción de la FSH humana recombinante a escala comercial, las células se transfectan generalmente de forma estable, lo que significa que las células transformadas con éxito se seleccionan después de la transfección a través de un agente de selección que mata a las células no transfectadas, mientras que las células transfectadas que contienen el gen de resistencia, continúan creciendo. Los reactivos de selección adecuados incluyen antibióticos tales como zeocina, neomicina y puomicina y otros fármacos como el metotrexato.

La presente invención se ilustra por medio de los siguientes ejemplos, que no deben entenderse como limitantes.

Ejemplos

30 1. Clonación de una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico mejoradas que codifican la cadena α y la cadena β de la FSH humana

35 Se utilizó una cadena principal de vector pUC18 que ya contenía un sitio de poliadenilación y de corte y empalme de SV40 y un casete del gen dhfr que consistía en un promotor de RSV, el gen de la reductasa de dihidrofolato de ratón y un sitio de poliadenilación y de corte y empalme de SV40. El gen de la reductasa de dihidrofolato permite la selección de células transfectadas positivamente y la amplificación del gen transfectado con el fármaco metotrexato.

Las secuencias no modificadas de la cadena α y la cadena β de la FSH humana se obtuvieron de Fiddes y Goodman (1979) Nature 281: 351-356 y Jameson et al. (1988) Mol. Endocrinol. 2(9): 806-815, respectivamente. Estas secuencias se mejoraron de forma que las regiones codificadoras se adaptaron al uso de codones en los genes CHO utilizados con frecuencia.

40 Por otra parte, un codón de detención adicional se introdujo para asegurar la terminación eficaz de la traducción. Las secuencias de nucleótidos mejoradas en la cadena β y la cadena α , se describen en SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente, y una comparación de las secuencias de ácidos nucleicos de tipo silvestre modificadas se muestran en las Figs. 1a y 1b. La comparación de secuencias muestra que la secuencia de ácido nucleico modificada y la no modificada que codifican la cadena α de la FSH humana, son idénticas en un 80%, mientras que
45 la secuencia de ácido nucleico modificada y la no modificada que codifican la cadena β de la FSH humana son idénticas en un 85%.

Las secuencias modificadas se insertaron por separado en dos copias de la cadena principal de pUC18, cortándolas con las enzimas de restricción *SacI* y *NcoI* y ligándolas a continuación.

50 El promotor de CMV y el promotor de SV40 se amplificaron a partir de un ADN molde adecuado con los siguientes cebadores, introduciendo simultáneamente un sitio de restricción *Ascl* y *Pacl* (subrayado en los siguientes cebadores):

Cebador Asc-CMV-F

5' - GGC GCG CCT TTT GCT CAC ATG GCT CG - 3' (SEQ ID NO: 8)

Cebador Pac-CMV-R

5' - CCT TAA TTA AGA GCT GTA ATT GAA CTG GGA GTG -3' (SEQ ID NO: 9)

Cebador Asc-SV40-F

5' - GGC GCG CCG CAT ACG CGG ATC TG - 3' (SEQ ID NO: 10)

5 Cebador Pac-SV40-R

5' - CCT TAA TTA AGT TCG AGA CTG TTG TGT CAG AAG A - 3' (SEQ ID NO: 11)

El promotor de CMV se introdujo en el plásmido que contenía la cadena α de la FSH humana cortando el plásmido con las enzimas de restricción *Ascl* y *Pacl* y ligándolo, y el promotor de SV40 se introdujo en el plásmido que contenía la cadena β de la FSH humana cortando el plásmido con las enzimas de restricción *Ascl* y *Pacl* y ligación.

10 Finalmente, el casete de expresión de la cadena β de la FSH humana que comprendía el promotor de SV40, la secuencia de ácido nucleico que codificaba la cadena β y la señal de poliadenilación de SV40, se amplificó con los siguientes cebadores, introduciendo al mismo tiempo un sitio de restricción *NotI* tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' del elemento amplificado (subrayado en las siguientes cebadores):

Cebador beta-NotI-F

15 5' - GCG GCC GCA TAC GCG GAT CTG C - 3' (SEQ ID NO: 12)

Cebador beta-NotI-R

5' - GCG GCC GCT CAC TCA TTA GGC ACC CCA GG - 3' (SEQ ID NO: 13)

20 A continuación, el elemento amplificado se insertó en el plásmido cortado con *NotI* que contenía la cadena α de la FSH humana. El plásmido resultante que contenía tanto la secuencia de ácido nucleico mejorada que codificaba la cadena α y la secuencia de ácido nucleico mejorada que codificaba la cadena β , se muestra en la Fig. 2. La secuencia del plásmido con las dos secuencias de ácido nucleico mejoradas se describe en SEQ ID NO: 7.

2. Transfección transitoria de células CHO con moléculas de ácido nucleico recombinante que contienen diferentes combinaciones de las cadenas α y β de FSH humana

25 Los plásmidos que contenían ya sea una secuencia de ácido nucleico mejorada que codificaba la cadena α o una secuencia de ácido nucleico mejorada que codificaba la cadena β , en combinación con la cadena β o la cadena α de tipo silvestre correspondiente, o que contenían ambas secuencias mejoradas, se produjeron tal y como se ha descrito en 1) más arriba. El ADN se mezcló con el medio ProCHO5 (Lonza) que contenía glutamina 8 mM sin HT hasta un volumen total de 200 μ l. A continuación, se añadieron 20 μ l del reactivo SuperFect (Qiagen) a la solución de ADN y se mezclaron. A continuación, esta mezcla se incubó durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.

30 Partes alícuotas que contenían $1,68 \times 10^6$ células CHO se centrifugaron (5 minutos, 800 rpm, 18-25°C), se retiró el material sobrenadante y las células se resuspendieron en 1,1 ml de medio de cultivo de ProCHO5 que contenía glutamina 8 mM sin HT. La suspensión se transfirió a continuación a la mezcla de ADN, después de que la mezcla de ADN se hubiera incubado durante 5-10 minutos, se mezcló y se transfirió a un pocillo de una placa de 6 pocillos. Las células se incubaron durante 3 horas a 37°C, en donde la incubación produjo la adherencia de las células. Se retiró el material sobrenadante, las células se lavaron tres veces con 1 ml de PBS y, a continuación se añadió medio de cultivo de nuevo aporte (2 ml de ProCHO5 que contenía glutamina 8 mM sin HT). Después de incubar durante 2 días a 37°C, se retiró el material sobrenadante y se centrifugó. El material sobrenadante se concentró (factor de concentración 16,67) y la concentración de FSH se determinó en un lector de ELISA (Anogen). Los resultados de esta medición se muestran en la Fig. 3.

40 Los resultados muestran que la introducción de una cadena α modificada en combinación con una cadena β de tipo silvestre, produce una reducción de la expresión de casi el 50% en comparación con una combinación de dos cadenas de tipo silvestre. En contraste, la introducción de una cadena β modificada, tanto en combinación con una cadena α de tipo silvestre como con la cadena α modificada, produce una expresión transitoria de FSH que se ve reforzada por un factor de 1,5 - 3, en comparación con la combinación de la cadena α de tipo silvestre y la cadena β de tipo silvestre. Por lo tanto, en particular el uso de la cadena β modificada produce una mejora significativa de la expresión de FSH después de una transfección transitoria, mientras que la cadena α modificada no influye positivamente en la producción de FSH.

Breve descripción de los dibujos

50 Fig. 1: Comparación de las secuencias de ácido nucleico no modificadas y modificadas que codifican la cadena α y la cadena β de la FSH humana

- a) Comparación de secuencias de la secuencia de ácido nucleico modificada y no modificada que codifica la cadena α de la FSH humana

pXM17ss# 6: parte de un plásmido que contiene la secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la cadena α de la FSH humana (SEQ ID NO: 2)

5 wt α FSH: secuencia de nucleico no modificada que codifica la cadena α de la FSH humana (SEQ ID NO: 3)

El codón de iniciación y los codones de detención se muestran en negrita.

- b) Comparación de secuencias de la secuencia de ácido nucleico modificada y no modificada que codifica la cadena β de la FSH humana

10 Problema ("query"): secuencia de ácido nucleico no modificada que codifica la cadena β de la FSH humana (SEQ ID NO: 4)

Objeto ("subject"): secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la cadena β de la FSH humana (SEQ ID NO: 1)

Los codones de iniciación y de detención se muestran en negrita.

15 Fig. 2: Mapa de la molécula de ácido nucleico recombinante que contiene tanto la secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la cadena α de la FSH humana, como la secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la cadena β de la FSH humana.

Fig. 3: Análisis de la expresión de diferentes combinaciones de las cadenas α y β después de la expresión transitoria en células CHO

20 Se muestra la expresión relativa de FSH en relación con células que expresan una combinación de las cadenas α y β de tipo silvestre.

w/w: cadena α y cadena β no modificadas

s/w: cadena α modificada y cadena β no modificada

w/s: cadena β modificada y cadena α no modificada

s/s: cadena α y cadena β modificadas

25

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Biogenerix AG		
	<120> Clon FSH		
	<130> B 8700 / RN		
10	<150> EP07111257		
	<151> 28.06.2007		
	<160> 13		
15	<170> PatentIn versión 3.3		
	<210> 1		
	<211> 471		
	<212> ADN		
20	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cadena beta modificada		
25	<400> 1		
	aggatccccg ggtacctccc cgcggggagg cgcgcccctt aattaagccg ccaccatgaa	60	
	gaccctgcag ttcttcttcc tgttctgctg ctggaaggcc atctgctgca acagctgcga	120	
	gctgaccaac atcaccatcg ccatcgagaa ggaggagtgc aggttctgca tcagatcaa	180	
	caccacctgg tgcgccgat actgctacac cagggacctg gtgtacaagg accccgccag	240	
	gccaagatc cagaagacct gcaccttcaa ggagctggtg tacgagaccg tgagggtgcc	300	
	cggctgcgcc caccacgcc acagcctgta cacctacccc gtggccaccc agtgccactg	360	
	cggcaagtgc gacagcgaca gcaccgactg caccgtgagg ggcctgggcc ccagctactg	420	
	cagcttcggc gagatgaagg agtaatgacc atggcatgcg agctcgaatt c	471	
30	<210> 2		
	<211> 372		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Cadena alfa modificada		
	<400> 2		
	cttaattaag ccgccagcat ggactactac aggaagtacg ccgccatctt cctggtgacc	60	
	ctgagcgtgt tcctgcacgt gctgcacagc gcccagacg tgcaggactg ccccagatgc	120	
	acctgcagg agaaccatt cttcagccag cccggagccc ccatcctgca gtgcatgggc	180	
	tgctgcttca gcagggccta cccaccccc ctgaggagca agaagaccat gctggtgcag	240	
	aagaacgtga ccagcgagag cacctgctgc gtggccaaga gctacaacag ggtgaccgtg	300	
	atgggcggct tcaaggtgga gaaccacacc gcctgccact gcagcacctg ctactaccac	360	
	aagagctaat ga	372	
40	<210> 3		

ES 2 432 183 T3

<211> 369
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 3
 ctttaattaag cgcagcat ggattactac agaaaatatg cagctatctt tctggtcaca 60
 ttgtcgggtgt ttctgcatgt tctccattcc gctcctgatg tgcaggattg cccagaatgc 120
 acgctacagg aaaaccatt cttctcccag ccgggtgccc caatacttca gtgcatgggc 180
 tgctgcttct ctagagcata tcccactcca ctaaggcca agaagacgat gttggcca 240
 aagaacgtca cctcagagtc cacttgctgt gtagctaaat catataacag ggtcacagta 300
 atgggggggtt tcaaagtgga gaaccacacg gcgtgccact gcagtacttg ttattatcac 360
 aaatcttaa 369

<210> 4
 <211> 474
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 4
 aggatccccg ggctacctcc ccgcggggag gcgcgccct taattaagcc gccaccatga 60
 agacactcca gtttttcttc cttttctgtt gctggaaagc aatctgctgc aatagctgtg 120
 agctgaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc ataagcatca 180
 acaccacttg gtgtgctggc tactgctaca ccagggatct ggtgtataag gaccagcca 240
 ggcccaaat ccagaaaaca tgtacctca aggaactggt atatgaaaca gtgagagtgc 300
 ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacatacc agtggccacc cagtgtcact 360
 gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggcctgggg cccagctact 420
 gctcctttgg tgaaatgaaa gaataaacat gccatggcat gcgagctcga attc 474

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

20 <400> 5
 Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
 20 25 30
 Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
 35 40 45
 Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
 50 55 60
 Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
 65 70 75 80
 Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly

ES 2 432 183 T3

85

90

95

Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
 100 105 110

Tyr His Lys Ser
 115

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

<400> 6

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
 1 5 10 15

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
 20 25 30

Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
 35 40 45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
 50 55 60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg
 65 70 75 80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
 85 90 95

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
 100 105 110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
 115 120 125

10 Glu

- <210> 7
- <211> 8983
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Plásmido

20 <400> 7

ggaataagaa agcggccgct cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg 60
 gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac 120
 atgattacga attcgagctc ggtacccggg gatccagaca tgataagata cattgatgag 180

ES 2 432 183 T3

tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttattttgtga aattttgtgat 240
 gctattgctt tattttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc 300
 attcatttta tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaac 360
 ctctacaaat gtggtatggc tgattatgat ctctagtcaa ggcactatac atcaaatatt 420
 ccttattaac ccctttacaa attaaaaagc taaaggtaca caatTTTTga gcatagttat 480
 taatagcaga cactctatgc ctgtgtggag taagaaaaaa cagtatgtta tgattataac 540
 tgttatgcct acttataaag gttacagaat atttttccat aattttcttg tatagcagtg 600
 cagctttttc ctttgtgggtg taaatagcaa agcaagcaag agttctatta ctaaacacag 660
 catgactcaa aaaacttagc aattctgaag gaaagtcctt ggggtcttct acctttctct 720
 tcttttttgg aggagtagaa tgttgagagt cagcagtagc ctcatcatca ctagatggca 780
 tttcttctga gcaaaacagg ttttctcat taaaggcatt ccaccactgc tcccattcat 840
 cagttccata ggttggaatc taaaatacac aaacaattag aatcagtagt ttaacacatt 900
 atacacttaa aaatTTTtata tttaccttag agctttaa at ctctgtaggt agtttgtcca 960
 attatgtcac accacagaag taaggttcct tcacaaagat cccactacag aagcaatcta 1020
 cagtctctat tgcagtttgt aacccccctc ccctcccccc ttttaactg aatgagatcg 1080
 aatgttaggt ccatgcagtt cttggtcaat gttaacgaaa gtccaacgtt ccgttcgcgc 1140
 ggggacagcc cgtccgcaaa gcggggcagc ccgcaggcgg cccctcgagg tcgacgggat 1200
 cgataagctt ggtaccgagc tcggatccac tagtaacggc cgccagtgtg ctggaattcg 1260
 gcttgagctc aggcgtcttc ccagcatggc tctgtccctg agtttaaagc tgctctctga 1320
 atgcttctg ctctgggccc tcaagttggc cctgtgacat ccttagatct cagagttgct 1380
 ctctggacag ttctcttggc ccctgagatg tcattgctgg cactggagtg tccatggcca 1440
 ttactcctc atctcgccga agctgcagta gctggggccc aggccctca cgggtgcagtc 1500
 ggtgctgtcg ctgtcgcact tgccgcagtg gcactgggtg gccacggggt aggtgtacag 1560
 gctgtcggcg tgggtggcgc agccgggcac cctcacggtc tcgtacacca gctcctttaa 1620
 ggtgcaggtc ttctggatct tgggcctggc ggggtccttg tacaccaggt ccctggtgta 1680
 gcagtatccg gcgcaccagg tgggtttgat gctgatgcag aacctgcact cctccttctc 1740
 gatggcgatg gtgatgttgg tcagctcgca gctgttgag cagatggcct tccagcagca 1800
 gaacaggaag aagaactgca ggtccttcat ggtggcggct taattaagtt cgagactgtt 1860
 gtgtcagaag aatcaagctt tttgcaaaag cctaggcctc caaaaaagcc tcctcactac 1920
 ttctggaata gctcagaggc cgaggcggcc tcggcctctg cataaataaa aaaaattagt 1980
 cagccatggg gcggagaatg ggcggaactg ggcggagtta ggggcgggat gggcggagtt 2040
 aggggcggga ctatggttgc tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgcctgct 2100
 ggggagcctg gggactttcc acacctggtt gctgactaat tgagatgcat gctttgtata 2160
 cttctgcctg ctggggagcc tggggacttt ccacacccta actgacacac attccacagc 2220
 tggttctttc cgcctcagaa ggtacctaac caagttcctc tttcagaggt tatttcaggc 2280

ES 2 432 183 T3

catggtgctg cgcagatcgc ggccgctaaa ctaaggcgcg ccttttgctc acatggctcg 2340
 acagatcttc aatattggcc attagccata ttattcattg gttatatagc ataaatcaat 2400
 attggctatt ggccattgca tacgttgat ctatatcata atatgtacat ttatattggc 2460
 tcatgtccaa tatgaccgcc atgttggcat tgattattga ctagttatta atagtaatca 2520
 attacgggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta 2580
 aatggccccg ctggctgacc gcccacgac ccccgccat tgacgtcaat aatgacgtat 2640
 gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg 2700
 taaactgcc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac 2760
 gtcaatgacg gtaaattggcc cgcttggcat tatgcccagt acatgacctt acgggacttt 2820
 cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg 2880
 cagtacacca atgggctgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc 2940
 attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt 3000
 aacaactgcg atcgcccgcc ccgttgacgc aaatgggctg taggcgtgta cgggtgggagg 3060
 tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag 3120
 tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa 3180
 gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta 3240
 agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga gaccaataga aactgggctt gtcgagacag 3300
 agaagactct tgcgtttctg ataggcacct attggtctta ctgacatcca ctttgccttt 3360
 ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat tacagctctt aattaagccg ccagcatgga 3420
 ctactacagg aagtacgccg ccattcttct ggtgaccctg agcgtgttcc tgcacgtgct 3480
 gcacagcgcc ccagacgtgc aggactgccc cgagtgcacc ctgcaggaga acccattctt 3540
 cagccagccc ggagccccca tcctgcagtg catgggctgc tgetttagca gggcctaccc 3600
 cccccctg aggagcaaga agaccatgct ggtgcagaag aacgtgacca gcgagagcac 3660
 ctgctgcgtg gccaaagact acaacagggt gaccgtgatg ggcggcttca aggtggagaa 3720
 ccacaccgcc tgccactgca gcacctgcta ctaccacaag agctaattgac catggacact 3780
 ccagtgccag caatgacatc tcaggggcca gaggaactgt ccagagagca actctgagat 3840
 ctaaggatgt cacagggcca acttgagggc ccagagcagg aagcattcag agagcagctt 3900
 taaactcagg gacagagcca tgctgggaag acgcctgagc tcaagccgaa ttccagcaca 3960
 ctggcgcccg ttactagtgg atccgagctc ggtaccaagc ttatcgatac cgtcgacctc 4020
 gaggggcccg ctgcgggctg ccccgtttg cggacgggct gtccccgcg gaacggaacg 4080
 ttggactttc gttaacattg accaagaact gcatggacct aacattcgat ctcatcagct 4140
 attaaagggg ggagggggag ggggttataa actgcaatag agactgtaga ttgcttctgt 4200
 agtgggatct ttgtgaagga accttacttc tgtggtgtga cataattgga caaactacct 4260
 acagagatth aaagctctaa ggtaaatata aaatttttaa gtgtataatg tgtaaaacta 4320

ES 2 432 183 T3

ctgattctaa ttgtttgtgt attttagatt ccaacctatg gaactgatga atgggagcag 4380
 tgggtggaatg cctttaatga ggaaaacctg ttttgctcag aagaaatgcc atctagtgat 4440
 gatgaggcta ctgctgactc tcaacattct actcctccaa aaaagaagag aaaggtagaa 4500
 gacccaag agctttccttc agaattgcta agttttttga gtcattgctgt gtttagtaat 4560
 agaactcttg cttgctttgc tatttacacc acaaaggaaa aagctgcact gctatacaag 4620
 aaaattatgg aaaaatattc tgtaaccttt ataagtaggc ataacagtta taatcataac 4680
 atactgtttt ttcttactcc acacaggcat agagtgtctg ctattaataa ctatgctcaa 4740
 aaattgtgta ccttttagctt ttttaattgt aaaggggta ataaggaata tttgatgtat 4800
 agtgccttga ctagagatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt 4860
 aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt 4920
 taacttgttt attgcagctt ataatggta caaataaagc aatagcatca caaatttcac 4980
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 5040
 ttatcatgtc tggatccccg ggtaccgagc tcgaattcgt aatcatgtca tagctgtttc 5100
 ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 5160
 gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgctg cgctcactgc 5220
 ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 5280
 ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct 5340
 cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactaaa ggcggtaata cggttatcca 5400
 cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aagccagga 5460
 accgtaaaaa ggccgcgctg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc 5520
 acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg 5580
 cgtttcccc tggaagctcc ctctgtcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat 5640
 acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtagg 5700
 atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc 5760
 agcccgaccg ctgctcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg 5820
 acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 5880
 gtgctacaga gttcttgaag tggtgcccta actacggcta cactagaaga acagtatttg 5940
 gtatctgctc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttgtagc tcttgatccg 6000
 gcaaacaac caccgctggt agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca 6060
 gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga 6120
 acgaaaactc acgttaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga 6180
 tccttttaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttgg 6240
 ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt 6300
 catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat 6360
 ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggctcca gatttatcag 6420

ES 2 432 183 T3

caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct 6480
ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt 6540
tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg 6600
cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca 6660
aaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgcag aagtaagttg gccgcagtgt 6720
tatcactcat ggttatggca gcaactgata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat 6780
gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcccgcac 6840
cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa 6900
aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt 6960
tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt 7020
tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggataa 7080
gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt 7140
atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataacaaa 7200
taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta 7260
tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg 7320
gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt 7380
aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtggt ggcgggtgtc 7440
ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgagc 7500
ccaagactgc cactgcactc cagcctggtt cccaatagac cctgaaggcc ctacaggtg 7560
tcttccaac ctgccccttg ctccatacca cccgcctcca ccccataata ttatacaagg 7620
acacctagtc aaacaaaatg atgcaactta attttattag gacaaggctg gtgggactg 7680
gagtagcacc ttccacgacc aggagaggca ctggggaggg gtcacagga tgccaccgg 7740
gcagctagaa gccacagctg cagttagtct ttcttctcgt agacttcaa cttatactg 7800
atgcctttt cctcctggac ctacagagag acgcctgggt attctgggag aagtttatat 7860
ttcccaaat caatttctgg gaaaaacgtg tcactttaa attcctgcat gatcctgtc 7920
acaagagtc tgaggtggcc tggttgattc atggcttctt ggtaaacaga actgcctccg 7980
actatccaaa ccatgtctac tttacttgcc aattccggtt gttcaataag tcttaaggca 8040
tcatccaaac ttttgcaag aaaatgagct cctcgtggtg gttctttgag ttcttactg 8100
agaactatat taattctgtc ctttaaaggt cgattcttct caggaatgga gaaccaggtt 8160
ttcctacca taatcaccag attctgttta ccttccactg aagaggttgt ggtcattctt 8220
tggaagtact tgaactcgtt cctgagcggg gccagggta ggtctccgtt cttgccaatc 8280
cccatatttt gggacacggc gacgatgagc ttcaatggtc gaaccatgat ggaagcttgg 8340
aggtgcacac caatgtggtg aatggtcaa tggcgtttat tgtatcgagc taggcactta 8400
aatacaatat ctctgcaatg cggaattcag tggttcgtcc aatccatgct agaccgtct 8460

ES 2 432 183 T3

gttgccttcc taataaggca cgatcgtacc accttacttc caccaatcgg catgcacggt 8520
gctttttctc tccttgtaag gcatgttgct aactcatcgt taccatgttg caagactaca 8580
agagtattgc ataagactac atttccccct ccctatgcaa aagcgaaact actatatcct 8640
gaggggactc ctaaccgctg acaaccgaag ccccgtttt cgcctaaaca caccctagtc 8700
ccctcagata cgcgtatatac tggcccgtac atcgcggaagc agcgcaaaac gcctaaccct 8760
aagcagattc ttcattgcaat tgctgggtcaa gccttgcctt gttgtagctt aaattttgct 8820
cgcgcactac tcagcgacct ccaacacaca agcagggagc agatactggc ttaactatgc 8880
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgggtg cactctcagt acaatctgct 8940
ctgcagatct ggcctccgcg ccgggttttg ggcctcccg cgg 8983

5 <210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador Asc-CMV-F
<400> 8
ggcgcgcctt ttgctcacat ggctcg 26

15 <210> 9
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial
<

20 <220>
<223> Cebador Pac-CMV-R
<400> 9
cctaattaa gagctgtaat tgaactggga gtg 33

25 <210> 10
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador Asc-SV40-F
<400> 10
ggcgcgccgc atacgcggat ctg 23

35 <210> 11
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador Pac-SV40-R

45 <400> 11
cctaattaa gttcgagact gttgtgtcag aaga 34

50 <210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 432 183 T3

<220>

<223> Cebador beta-NotI-F

<400> 12

5 gcggccgcat acgcggatct gc 22

<210> 13

<211> 29

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador beta-NotI-R

<400> 13

15 gcggccgctc actcattagg caccccagg 29

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena β de la hormona estimulante del folículo (FSH) humana, que es la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una primera secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1, bajo el control de un promotor que es activo en una célula hospedadora.
3. Molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 2, que comprende adicionalmente una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la hormona estimuladora del folículo (FSH) humana que se selecciona a partir del grupo que consiste en la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 2 y secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de al menos el 85% con la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico tal y como se describe en SEQ ID NO: 2.
- 10 4. Molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 2, que comprende adicionalmente una segunda secuencia de ácido nucleico que se selecciona a partir del grupo que consiste en la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 3 y secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de al menos el 70% con la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico tal y como se describe en SEQ ID NO: 3.
- 15 5. Molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 3 o 4, en la que la segunda secuencia de ácido nucleico está bajo el control de un promotor distinto.
6. Molécula de ácido nucleico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la primera secuencia de ácido nucleico y/o la segunda secuencia de ácido nucleico está bajo el control de un promotor vírico.
- 20 7. Molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 6, en la que la primera secuencia de ácido nucleico está bajo el control de un promotor de SV40.
8. Molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 6, en la que la segunda secuencia de ácido nucleico está bajo el control de un promotor de CMV.
- 25 9. Molécula de ácido nucleico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que tiene la secuencia de ácido nucleico tal y como se describe en SEQ ID NO: 7.
10. Célula hospedadora que contiene una molécula de ácido nucleico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9.
- 30 11. Célula hospedadora según la reivindicación 10, que es una célula de mamífero.
12. Célula hospedadora según la reivindicación 10 o 11, que es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
13. Célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que tiene el número de depósito DSM ACC2833.
- 35 14. Célula hospedadora que contiene una primera molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 2, y una segunda molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la hormona estimuladora del folículo (FSH) humana que se selecciona a partir del grupo que consiste en la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 2, teniendo las secuencias de ácido nucleico una identidad de secuencia de al menos el 85% con la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico tal y como se describe en SEQ ID NO: 2 y la secuencia de ácido nucleico tal y como se describe en SEQ ID NO: 3.
- 40 15. Cultivo celular que comprende la célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en un medio de cultivo adecuado.
16. Método para la producción de FSH humana recombinante, que comprende las etapas de:
 - cultivar una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en un medio de cultivo adecuado; y
 - recoger el material sobrenadante del cultivo celular.
- 45 17. Método según la reivindicación 16, que comprende adicionalmente la etapa de purificación de la FSH humana recombinante a partir del material sobrenadante del cultivo c.
18. Método para producir la célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende transfectar células en cultivo en suspensión en condiciones exentas de suero con una molécula de ácido
- 50

nucleico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9.

- 5 19. Método para producir la célula hospedadora según la reivindicación 14, que comprende transfectar células en cultivo en suspensión en condiciones exentas de suero con una primera molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 2 y una segunda molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de la hormona estimuladora del folículo (FSH) humana que se selecciona a partir del grupo que consiste en la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 2, teniendo las secuencias de ácido nucleico una identidad de secuencia de al menos el 85% con la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico tal y como se describe en SEQ ID NO: 2 y la secuencia de ácido nucleico tal y como se describe en SEQ ID NO: 3.
- 10 20. Uso de una secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1 o de las dos secuencias de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1 y 2 para la producción *in vitro* de FSH humana recombinante.

ES 2 432 183 T3

pXM17ss 3457	3398	cttaattaagccgccagcatggactactacaggaagtacgccgccatcttctctggtgacc	
wt α FSH 124	65	cttaattaagccgccagcatggattactacagaaaatatgcagctatctttctggtcaca	
pXM17ss 3517	3458	ctgagcgtgttctctgcacgtgctgcacagcgcgccagacgtgcaggactgccccgagtg	
wt α FSH 184	125	ttgtcgggtgttctgcacgttctccattccgctcctgatgtgcaggattgccagaatgc	
pXM17ss 3577	3518	accctgcaggagaaccattcttcagccagccggagccccatcctgcagtgcattgggc	
wt α FSH 244	185	acgctacaggaaaaccattcttctccagccgggtgccccataacttcagtgcattgggc	
pXM17ss 3637	3578	tgctgcttcagcagggcctacccccccccctgaggagcaagaagaccatgctggtgcag	
wt α FSH 304	245	tgctgcttctctagagcatatcccaactccactaaggccaagaagacgatgttggtcaa	
pXM17ss 3697	3638	aagaacgtgaccagcgagagcacctgctgctggccaagagctacaacagggtgaccgtg	
wt α FSH 364	305	aagaacgtcacctcagagtcacttgctgtgtagctaaatcatataacagggtcacagta	
pXM17ss 3757	3698	atggcggttcaaggtggagaaccacaccgctgccactgcagcacctgctactaccac	
wt α FSH 424	365	atggggggttcaaagtggaaccacacggcgtgccactgcagtacttgttattatcac	
pXM17ss	3758	aagagctaatga	3769
wt α FSH	425	aaatcttaa	433

Fig. 1a

```

Problema : 1  aggatccccgggtacctccccgcggggaggcgcgccccttaattaagccgccaccatga 60
                |||
Objeto : 2  aggatccccggg-tacctccccgcggggaggcgcgccccttaattaagccgccaccatga 60

Problema : 61  agacactccagtttttcttctttctgttgctggaagcaatctgctgcaatagctgtg 120
                |||
Objeto : 61  agaccctgcagttcttcttctgttctgctgctggaagccatctgctgcaacagctgtg 120

Problema : 121 agctgaccaacatcaccattgcaatagagaaagaagaatgtcgtttctgcataagcatca 180
                |||
Objeto : 121 agctgaccaacatcaccatcgccatcgagaaggaggagtgcaggttctgcatcagcatca 180

Problema : 181 acaccacttggtgtgctggctactgctacaccagggatctggtgtataaggaccagcca 240
                |||
Objeto : 181 acaccacttggtgtgctggatactgctacaccaggacctggtgtacaaggaccccgcca 240

Problema : 241 ggcccaaatccagaaaacatgtacctcaaggaactggtatatgaaacagtgagagtgc 300
                |||
Objeto : 241 ggccaagatccagaagacctgcacctcaaggagtggtgtacgagaccgtgaggggtgc 300

Problema : 301 ccggctgtgctcaccatgcagattccttgatatacataccagtggccaccagtgctact 360
                |||
Objeto : 301 ccggctgccccaccacgcccagcctgtacacctacccctggccaccagtgccact 360

Problema : 361 gtggcaagtgtgacagcgacagcactgattgtactgtgagggcctggggccagctact 420
                |
Objeto : 361 gcggcaagtgtgacagcgacagcaccgactgcaccgtgagggcctggggccagctact 420

Problema : 421 gctcctttggtgaaatgaaagaataacatgccatggcatgagctcgaattc 474
                ||
Objeto : 421 gcagcttcgagagatgaaggagtaatga--ccatggcatgagctcgaattc 472
    
```

Fig. 1b

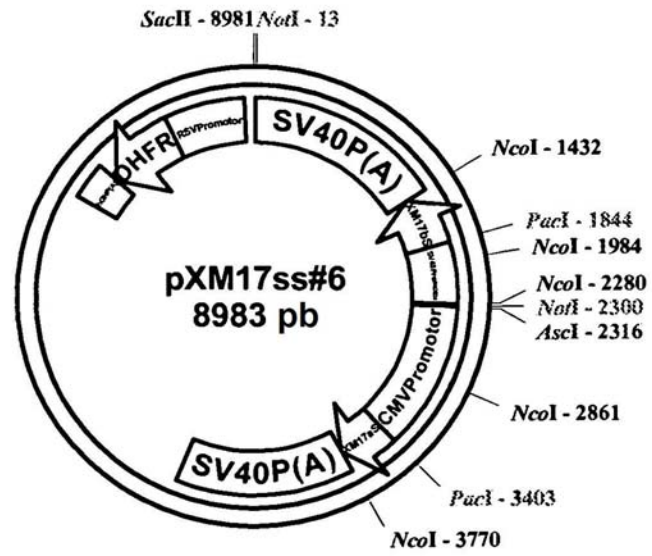


Fig. 2

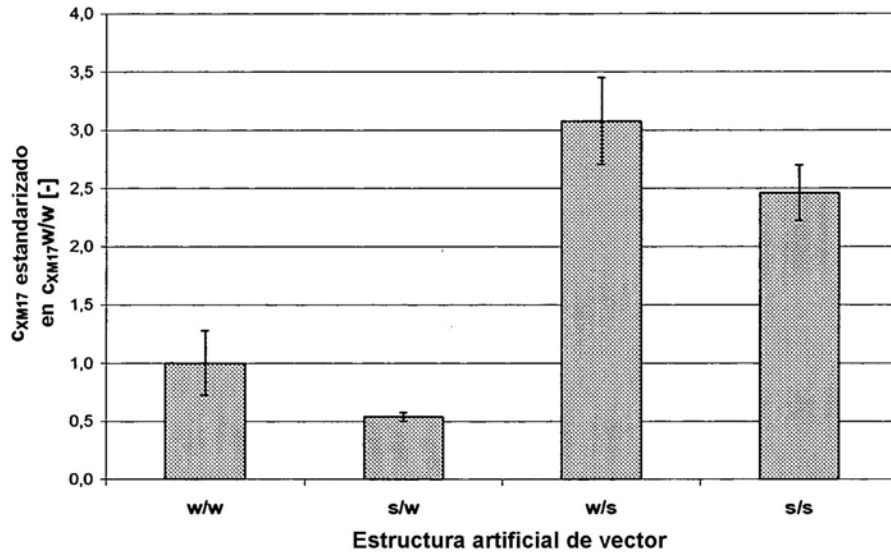


Fig. 3