

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 273**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

A61P 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2012 PCT/GB2012/000291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12131306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012 E 12719996 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2691119**

54 Título: **Preparación farmacéutica**

30 Prioridad:

31.03.2011 EP 11160736

17.01.2012 EP 12151389

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

10.12.2018

73 Titular/es:

FERRING B.V. (100.0%)

Polaris Avenue 144

2132 JX Hoofddorp, NL

72 Inventor/es:

COTTINGHAM, IAN;

PLAKSIN, DANIEL y

AHARANOV, JENNY

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 693 273 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

Preparación farmacéutica

5 La presente invención se refiere a gonadotropina coriónica humana (hCG) para su uso en el tratamiento de la esterilidad. En particular, se refiere a la modificación química, incluyendo pegilación, de gonadotropina coriónica humana (hCG) mediante la cual pueden cambiarse, por ejemplo, las propiedades químicas y/o fisiológicas de hCG.

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

10 La gonadotropina coriónica humana (hCG) se secreta de manera natural por la adenohipófisis y funciona para respaldar el desarrollo folicular y la ovulación. hCG comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos, también común para las otras hormonas de glicoproteínas LH y FSH, y una subunidad beta de 145 aminoácidos única para hCG, que dicta la especificidad de la hormona. Cada subunidad se modifica tras la traducción mediante la adición de residuos de hidratos de carbono complejos. La subunidad alfa contiene 2 sitios de glicosilación unidos a N en los aminoácidos 52 y 78 y la subunidad beta contiene 2 sitios de glicosilación unidos a N en los aminoácidos 13 y 30 y cuatro sitios de glicosilación unidos a O en los aminoácidos 121, 127, 132 y 138.

15 La hCG extraída de la orina de mujeres embarazadas [Choragon (Ferring)] se ha usado desde hace muchos años en el tratamiento de la esterilidad. La producción de hCG extraída de la orina implica la recogida y el procesamiento de grandes cantidades de orina. También está disponible una versión recombinante de hCG, Ovitrelle (Serono). Ésta se expresa en células de ovario de hámster chino (CHO). El producto de hCG recombinante conocido tiene un perfil farmacocinético diferente de la hCG producida a partir de orina humana.

20 Existe una heterogeneidad considerable asociada con preparaciones de hCG que está relacionada con diferencias en las cantidades de diversas isoformas presentes. Las isoformas de hCG individuales muestran secuencias de aminoácidos idénticas pero difieren en el grado en el que se modifican tras la traducción; las isoformas particulares se caracterizan por la heterogeneidad de las estructuras de ramificaciones de hidratos de carbono y cantidades diferentes de incorporación de ácido siálico (un azúcar terminal), ambas de las cuales parecen influir en la bioactividad de la isoforma específica.

25 La glicosilación de hCG natural es altamente compleja. Los glicanos en la hCG hipofisaria derivada de manera natural pueden contener una amplia gama de estructuras que pueden incluir combinaciones de glicanos bi, tri y tetra-anténarios. Los glicanos pueden portar modificaciones adicionales: fucosilación de núcleo, glucosamina de bisección, cadenas extendidas con acetilgalactosamina, sialilación parcial o completa, sialilación con uniones α 2,3 y α 2,6, y glucosa sustituida por galactosamina sulfatada. Además, hay diferencias entre las distribuciones de estructuras de glicano en los sitios de glicosilación individuales.

30 La glicosilación de productos de hCG recombinante ("rhCG") refleja la gama de glicosil-transferasas presentes en la línea celular huésped. El producto de rhCG existente, Ovitrelle, se deriva de células de ovario de hámster chino (células CHO) modificadas por ingeniería. La gama de modificaciones con glicano en rhCG derivada de CHO son más limitadas que las encontradas en los productos naturales, derivados de orina. Los ejemplos de la heterogeneidad de glicano reducida encontrada en rhCG derivada de CHO incluyen una falta de glucosamina de bisección y un contenido reducido de fucosilación de núcleo y extensiones de acetil-lactosamina. Además, las células CHO sólo pueden añadir ácido siálico usando la unión α 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Esto es diferente de la hCG producida de manera natural que contiene glicanos con una mezcla de ácido siálico con uniones α 2,3 y α 2,6.

35 Se ha demostrado que una preparación de FSH recombinante (Organon) difiere en cuanto a las cantidades de FSH con un punto isoelectrónico (pi) inferior a 4 (consideradas isoformas ácidas) en comparación con FSH hipofisaria, sérica o de orina posmenopáusicas (Ulloa-Aguirre *et al.* 1995). La cantidad de isoformas ácidas en las preparaciones de orina de FSH era muy superior en comparación con los productos recombinantes, Gonal-f (Serono) y Puregon (Organon) (Andersen *et al.* 2004). Esto debe reflejar un contenido molar inferior de ácido siálico en rFSH dado que el contenido de glicano con carga negativa modificado con sulfato es bajo en FSH. El contenido en ácido siálico inferior, en comparación con FSH natural, es una característica de ambos productos de FSH comercialmente disponibles y por tanto debe reflejar una limitación en el procedimiento de fabricación (Bassett y Driebergen, 2005).

45 La vida útil en circulación de FSH se ha documentado para materiales a partir de una variedad de fuentes. Algunos de estos materiales se han fraccionado basándose en la carga molecular global, según se caracteriza mediante su pi, en el que más ácido equivale a una carga negativa superior. El principal factor contribuyente de la carga molecular global es el contenido siálico total de cada molécula de FSH. Por ejemplo, rFSH (Organon) tiene un contenido en ácido siálico de aproximadamente 8 mol/mol, mientras que la FSH derivada de orina tiene un contenido en ácido siálico superior (de Leeuw *et al.* 1996). Las tasas de aclaramiento en plasma correspondientes en rata son de 0,34 y 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre *et al.* 2003). En otro ejemplo en el que se dividió una muestra de FSH recombinante en fracciones de alto y bajo pi, la potencia *in vivo* de la fracción de alto pi (contenido en ácido siálico inferior) disminuyó y tuvo una semivida en plasma más corta (D'Antonio *et al.* 1999). Los solicitantes han encontrado

que, de manera similar a FSH, el producto de hCG recombinante conocido, derivado de CHO (por ejemplo Ovitrelle) también tiene una cantidad inferior de hCG con un punto isoeléctrico (π) inferior a 4 (consideradas isoformas ácidas) en comparación con hCG de orina, lo que también refleja un contenido en ácido siálico inferior del producto de rhCG conocido en comparación con hCG de orina.

5 El contenido en ácido siálico total de hCG y rhCG no es directamente comparable ya que los ácidos siálicos se unen habitualmente de dos maneras. La hCG hipofisaria/sérica/de orina contiene ácido siálico con uniones tanto α 2,3 como α 2,6, con una predominancia del primero. Sin embargo, los productos recombinantes derivados de células CHO sólo contienen α 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Dicho de otro modo, las proteínas recombinantes expresadas usando el sistema de CHO diferirán de sus homólogos naturales en cuanto al tipo de uniones de ácido siálico terminal. Esta es otra diferencia entre productos naturales y recombinantes actuales además del contenido en ácido siálico global inferior de estos últimos, y es una consideración importante en la producción de productos biológicos para uso farmacéutico ya que los restos de hidratos de carbono pueden contribuir a los atributos farmacológicos de la molécula.

15 Por tanto, es deseable tener un producto de rhCG que reproduzca o imite más estrechamente el perfil fisicoquímico y farmacocinético del producto producido a partir de orina humana. Es deseable tener un producto de rhCG que tenga propiedad o propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con el producto recombinante conocido.

20 Los solicitantes han desarrollado una hCG recombinante derivada de ser humano que tiene un perfil más ácido que el producto derivado de CHO, Ovitrelle, y que tiene un contenido en ácido siálico superior. La investigación de los solicitantes indica que el tipo de unión de ácido siálico, α 2,3 o α 2,6, puede tener una drástica influencia sobre el aclaramiento biológico de hCG. Las líneas celulares humanas, en contraposición a líneas celulares CHO, pueden expresar hCG recombinante con ácidos siálicos unidos mediante uniones tanto α 2,3 como α 2,6.

25 Se preparó hCG recombinante con una mezcla de ácido siálico con uniones tanto α 2,3 como α 2,6 mediante modificación por ingeniería de una línea celular humana para expresar tanto rhCG como α 2,3-sialiltransferasa. El producto expresado es altamente ácido y porta una mezcla de ácidos siálicos con uniones tanto α 2,3 como α 2,6; proporcionándose esta última mediante la sialiltransferasa endógena. Esto tiene dos ventajas con respecto a rhCG expresada en células CHO convencionales: en primer lugar el material se sialila más altamente debido a las actividades combinadas de las dos sialiltransferasas; y en segundo lugar, el material se asemeja más estrechamente a la hCG natural. Es probable que esto sea biológicamente más apropiado en comparación con productos recombinantes derivados de células CHO que sólo producen ácido siálico con unión α 2,3 y tienen un contenido en ácido siálico reducido. Este es el objeto de la solicitud de patente internacional n.º PCT/GB2010/001854. Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que su hCG recombinante derivada de ser humano puede reproducir o imitar más estrechamente el perfil fisicoquímico y farmacocinético del producto de orina humano natural que otros productos recombinantes. Dicho de otro modo, la rhCG de la invención puede ser más próxima a la hCG "natural". Esto puede tener ventajas significativas con respecto a la dosificación, etc. Además, un producto más "natural" o más "humano" puede ser más deseable para el paciente, quien puede desear que la terapia, aunque en cierto sentido artificial, sea lo más "natural" posible.

40 Generalmente se conoce que la modificación química de proteínas terapéuticas, por ejemplo con polímeros solubles en agua, puede tener el resultado de cambiar las propiedades químicas y/o fisiológicas de la proteína (por ejemplo, reducir la tasa de aclaramiento, mejorar la estabilidad, etc., prolongando así el tiempo de actividad). Una clase de polímeros solubles en agua de este tipo es poli(óxido de alquileo), por ejemplo polietilenglicol (PEG). De hecho, se ha acuñado el término "PEGilar" o "pegilar" para hacer referencia a la modificación (unión) de al menos una molécula de PEG a una entidad química. Hay métodos disponibles para la unión de determinados restos de polietilenglicol, por ejemplo, Roberts M. J. *et al.*, *Adv. Drug Del. Rev.* 54: 459-476, 2002; Harris J. M. *et al.*, *Drug Delivery Systems* 40: 538-551, 2001. Se han descrito proteínas terapéuticas pegiladas, por ejemplo ADAGENX (formulación pegilada de adenosina deaminasa para tratar la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave) y ONCASPAR (L-asparaginasa pegilada para tratar a pacientes con LLA hipersensible). Sin embargo, hasta ahora no están disponibles formas pegiladas de hCG, especialmente aquellas con las propiedades apropiadas como para ser un producto comercial.

50 Según la presente invención, se proporciona una hCG modificada con polietilenglicol que tiene la fórmula (Ia)



en la que:

(R) es un polietilenglicol PEG o un metoxipolietilenglicol (mPEG);

n es 2, 3 ó 4;

55 X es un grupo de unión; e

Y es hCG.

Preferiblemente el grupo de unión X está unido en un extremo al extremo N-terminal de la hCG.

5 El grupo de unión X es un resto que une la hCG (por ejemplo que está unido en un extremo a la hCG, por ejemplo que está unido en un extremo al extremo N-terminal de la hCG) al (o a cada) grupo R (por ejemplo que también está unido al o a cada grupo R, por ejemplo que también está unido a un oxígeno terminal del o de cada grupo R). El grupo de unión X puede ser cualquier molécula de unión conocida en el campo de la pegilación.

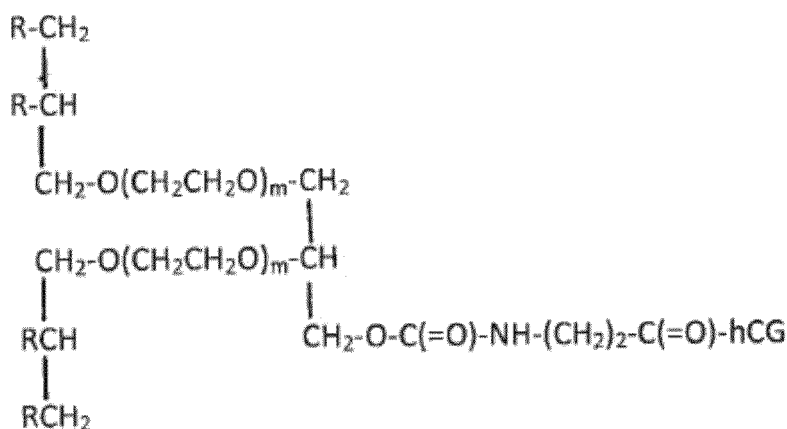
El grupo de unión X puede ser, por ejemplo, O o $-C(=O)-$ o $-(CH_2)_t-C(=O)-$ en el que t es 0 o un número entero de desde 1 hasta 10.

10 El grupo de unión X puede ser, por ejemplo, de un grupo de fórmula $(Z^1CH_2)_b-(CH_2)_z-(CHZ^2)_a-(CH_2)_u-O-C(=O)-NH-(CH_2)_r-C(=O)-$ en la que: $-C(=O)-$ está unido a Y; Z^1 y Z^2 representan un enlace a un grupo R; a y b se seleccionan cada uno independientemente de 0 y 1 con la condición de que a y b no sean ambos 0; t, u y z se seleccionan cada uno independientemente de 0 o un número entero de desde 1 hasta 10.

15 En algunos ejemplos, a, b y u son 1; t es 2 y z es 0, de modo que X es $Z^1CH_2-CHZ^2-CH_2-O-C(=O)-NH-(CH_2)_2-C(=O)-$, y la hCG modificada con polietilenglicol tiene la fórmula $CH_2R-CHR-CH_2-O-C(=O)-NH-(CH_2)_2-C(=O)-hCG$, en la que cada R es un polietilenglicol PEG o un metoxipolietilenglicol (mPEG). En un ejemplo preferido cada R es un metoxipolietilenglicol (mPEG) (véase el ejemplo 12A).

20 El grupo de unión X puede ser, por ejemplo, de un grupo de fórmula $(Z^1CH_2)_b-(CH_2)_z-(CHZ^2)_a-(CH_2)_u-O-C(=O)-NH-(CH_2)_r-C(=O)-$ en la que: $-C(=O)-$ está unido a Y; a y b se seleccionan cada uno independientemente de 0 y 1; t, u y z se seleccionan cada uno independientemente de 0 o un número entero de desde 1 hasta 10; y Z^1 y Z^2 se seleccionan cada uno independientemente de $(Z^3CH_2)_d-(CH_2)_e-(CHZ^4)_c-(CH_2)_f-O(CH_2CH_2O)_m$ en el que Z^3 y Z^4 representan un enlace a un grupo R; c y d se seleccionan cada uno independientemente de 0 y 1; e y f se seleccionan independientemente de 0 o un número entero de desde 1 hasta 10, y m es de 1 a 20, por ejemplo de 1 a 10.

25 En algunos ejemplos, a y b y u son 1, t es 2 y z es 0; $Z^1 = Z^2$ y son ambos $(Z^3CH_2)_d-(CH_2)_e-(CHZ^4)_c-(CH_2)_f-O(CH_2CH_2O)_m$ en el que c, d y f son 1, e es 0 y Z^3 y Z^4 representan un enlace a un grupo R; de modo que X es $[CH_2R-CHR-CH_2-O(CH_2CH_2O)_m]-CH_2-CH[CH_2R-CHR-CH_2-O(CH_2CH_2O)_m]-CH_2-O-C(=O)-NH-(CH_2)_2-C(=O)-$, y la hCG modificada con polietilenglicol tiene la estructura:



30 (que es $[CH_2R-CHR-CH_2-O(CH_2CH_2O)_m]-CH_2-CH[CH_2R-CHR-CH_2-O(CH_2CH_2O)_m]-CH_2-O-C(=O)-NH-(CH_2)_2-C(=O)-hCG$), en la que cada R es un polietilenglicol PEG o un metoxipolietilenglicol (mPEG). En un ejemplo preferido cada R es metoxipolietilenglicol (mPEG).

35 El grupo de unión X puede ser, por ejemplo, de un grupo de fórmula $-R^3-R^2-R^1-C(=O)-$ en la que: $-C(=O)-$ está unido a Y; R^1 es un enlace, o un grupo alquilo C_1 a C_{10} de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido, que está unido a R o a al menos un R si están presentes más de un R, y R^2 y R^3 se seleccionan cada uno independientemente de un enlace, H o un grupo alquilo C_1 a C_{10} de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido, unido a uno o más grupos R.

40 La hCG puede obtenerse mediante cualquier medio conocido en la técnica. La hCG tal como se usa en el presente documento incluye hCG derivada de ser humano y recombinante. La hCG derivada de ser humano puede purificarse a partir de cualquier fuente apropiada (por ejemplo orina) mediante cualquier método conocido en la técnica. La hCG puede ser hCG recombinante, por ejemplo expresada en una línea celular humana. En la técnica se conocen bien métodos de expresión y purificación de hCG recombinante. Preferiblemente la hCG es una hCG recombinante ("rhCG" o "rechCG"). Preferiblemente la hCG es una hCG recombinante derivada de línea celular humana.

Según la presente invención en un aspecto adicional se proporciona una preparación farmacéutica que comprende una hCG modificada con polietilenglicol de la fórmula la anterior, preferiblemente una hCG recombinante modificada con polietilenglicol, preferiblemente una hCG recombinante derivada de línea celular humana. Preferiblemente la hCG es una hCG recombinante derivada de línea celular humana modificada con polietilenglicol.

- 5 Por tanto, la invención puede proporcionar una versión recombinante modificada con polietilenglicol de hCG que porta una mezcla de ácido siálico α 2,3 y α 2,6.

Las composiciones de la presente invención se preparan preferiblemente a partir de poli(óxidos de alquileo) que son solubles en agua a las temperaturas ambiente. Dentro de este grupo están los derivados de poli(óxido de alquileo) sustituidos en alfa tales como polietilenglicoles (PEG) y metoxipolietilenglicoles (mPEG) u otros derivados de PAO sustituidos con alquilo adecuados tales como los que contienen grupos C₁ - C₄ mono o bis-terminales. Se prefieren polímeros no antigénicos de cadena lineal tales como homopolímeros de monometil-PEG. Otros poli(óxidos de alquileo) adecuados incluyen otros homopolímeros de polietilenglicol, otros copolímeros de bloque de alquil-poli(óxido de etileno) y copolímeros de copolímeros de bloque de poli(óxidos de alquileo).

15 El o al menos un R es un poli(óxido de alquileo), por ejemplo un polietilenglicol PEG o un metoxipolietilenglicol (mPEG), puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 200 y aproximadamente 40.000, por ejemplo un peso molecular de entre 200 y aproximadamente 20.000, por ejemplo un peso molecular de entre 2.000 y aproximadamente 10.000, por ejemplo un peso molecular de aproximadamente 5.000.

El polietilenglicol puede conjugarse a la hCG (por ejemplo recombinante) en un residuo de aminoácido. El polietilenglicol puede conjugarse a la hCG (por ejemplo recombinante) en el extremo N-aminoterminal de la hCG (por ejemplo recombinante) y/o el extremo C-aminoterminal de la hCG (por ejemplo recombinante). Preferiblemente el 90% o más del polietilenglicol se conjuga con el extremo N-aminoterminal de la hCG (por ejemplo recombinante). Preferiblemente el 95% o más del polietilenglicol se conjuga con el extremo N-aminoterminal de la hCG (por ejemplo recombinante). Se espera que el uso de esta hCG modificada con polietilenglicol de la invención y/o preparaciones de la invención para la estimulación ovárica controlada, en técnicas de FIV e inducción de la ovulación combinará una estimulación más natural del ovario en comparación con productos recombinantes existentes con un perfil farmacocinético potenciado. La presente invención puede proporcionar además conjugados de PEG-hCG y mPEG-hCG que tienen una o dos moléculas de PEG o mPEG (o una molécula de unión que incluye una, dos o más moléculas de PEG o mPEG) unidas de manera predominante en el extremo N-terminal de la hCG. Esto evita o reduce problemas asociados con un producto heterogéneo provocados por la pegilación en diferentes sitios en diferentes moléculas de hCG. Se apreciará que los conjugados de PEG-hCG y mPEG-hCG de la invención pueden tener una o dos moléculas de PEG o mPEG unidas en el extremo N-terminal de la hCG por medio de enlaces covalentes. Si una molécula de unión se une en el extremo N-terminal, la molécula de unión puede portar una, dos o más moléculas de PEG o mPEG.

La presente invención proporciona una hCG modificada con polietilenglicol que tiene la fórmula (Ia)

35 $(R)_n\text{-X-Y}$ (Ia)

en la que:

(R) es un polietilenglicol PEG o un metoxipolietilenglicol (mPEG);

n es 2, 3 ó 4;

X es un grupo de unión; e

40 Y es hCG.

Preferiblemente, n es 2 ó 4. Preferiblemente el grupo de unión X está unido en un extremo al extremo N-terminal de la hCG.

El grupo de unión X es un resto que une la hCG (por ejemplo, que está unido en un extremo a la hCG, por ejemplo que está unido en un extremo al extremo N-terminal de la hCG) al (o a cada) grupo R (por ejemplo que también está unido al o a cada grupo R, por ejemplo que también está unido a un oxígeno terminal del o de cada grupo R). El grupo de unión X puede ser cualquier molécula de unión conocida en el campo de la pegilación.

El grupo de unión X puede ser, por ejemplo, O o $-\text{C}(=\text{O})-$ o $-(\text{CH}_2)_t-\text{C}(=\text{O})-$ en el que t es 0 o un número entero de desde 1 hasta 10.

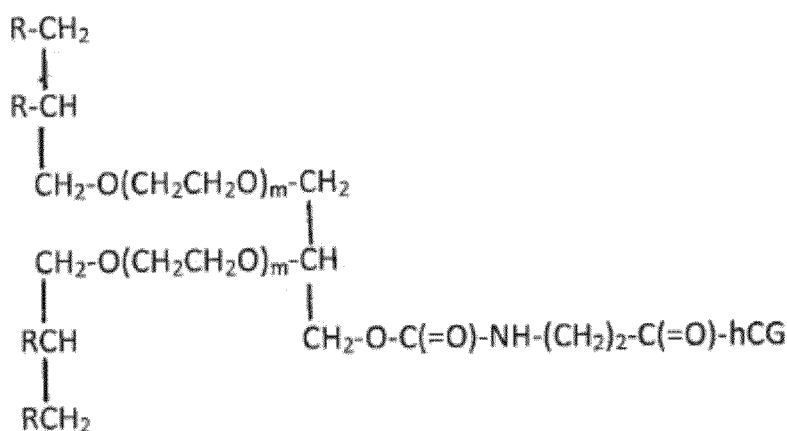
El grupo de unión X puede ser, por ejemplo, de un grupo de fórmula $(\text{Z}^1\text{CH}_2)_b-(\text{CH}_2)_z-(\text{CH}_2)_a-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_t-\text{C}(=\text{O})-$ en la que: $-\text{C}(=\text{O})-$ está unido a Y; Z¹ y Z² representan un enlace a un grupo R; a y b se seleccionan cada uno independientemente de 0 y 1 con la condición de que a y b no sean ambos 0; t, u y z se seleccionan cada uno independientemente de 0 o un número entero de desde 1 hasta 10.

En algunos ejemplos, a, b y u son 1; t es 2 y z es 0, de modo que X es $\text{Z}^1\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$

C(=O)-, y la hCG modificada tiene la fórmula $\text{CH}_2\text{R}-\text{CHR}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-\text{hCG}$. Cada R puede ser un polietilenglicol PEG o un metoxipolietilenglicol (mPEG). En un ejemplo preferido cada R es un metoxipolietilenglicol (mPEG) (véase el ejemplo 12A).

5 El grupo de unión X puede ser, por ejemplo, de un grupo de fórmula $(\text{Z}^1\text{CH}_2)_b-(\text{CH}_2)_z-(\text{CH}_2^2)_a-(\text{CH}_2)_u-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_t-\text{C}(=\text{O})-$ en la que: $-\text{C}(=\text{O})-$ está unido a Y; a y b se seleccionan cada uno independientemente de 0 y 1; t, u y z se seleccionan cada uno independientemente de 0 o un número entero de desde 1 hasta 10; y Z^1 y Z^2 se seleccionan cada uno independientemente de $(\text{Z}^3\text{CH}_2)_d-(\text{CH}_2)_e-(\text{CH}_2^4)_c-(\text{CH}_2)_f-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ en el que Z^3 y Z^4 representan un enlace a un grupo R; c y d se seleccionan cada uno independientemente de 0 y 1; e y f se seleccionan independientemente de 0 o un número entero de desde 1 hasta 10, y m es de 1 a 20, por ejemplo de 1 a 10.

En algunos ejemplos, a y b y u son 1, t es 2 y z es 0; $\text{Z}^1 = \text{Z}^2$ y son ambos $(\text{Z}^3\text{CH}_2)_d-(\text{CH}_2)_e-(\text{CH}_2^4)_c-(\text{CH}_2)_f-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ en el que c, d y f son 1, e es 0 y Z^3 y Z^4 representan un enlace a un grupo R; de modo que X es $[\text{CH}_2\text{R}-\text{CHR}-\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m]-\text{CH}_2-\text{CH}[\text{CH}_2\text{R}-\text{CHR}-\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m]-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-$, y la hCG modificada tiene la estructura:



15 (que es $[\text{CH}_2\text{R}-\text{CHR}-\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m]-\text{CH}_2-\text{CH}[\text{CH}_2\text{R}-\text{CHR}-\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m]-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-\text{hCG}$). Cada R puede ser un polietilenglicol PEG o un metoxipolietilenglicol (mPEG). En un ejemplo preferido cada R es metoxipolietilenglicol (mPEG).

20 El grupo de unión X puede ser, por ejemplo, de un grupo de fórmula $-\text{R}^3-\text{R}^2-\text{R}^1-\text{C}(=\text{O})-$ en e la que: $-\text{C}(=\text{O})-$ está unido a Y; R^1 es un enlace, o un grupo alquilo C_1 a C_{10} de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido, que está unido a R o a al menos un R si están presentes más de un R, y R^2 y R^3 se seleccionan cada uno independientemente de un enlace H, o un grupo alquilo C_1 a C_{10} de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido, unido a uno o más grupos R.

25 Las composiciones de la presente invención se preparan preferiblemente a partir de poli(óxidos de alquileno) que son solubles en agua a temperaturas ambientales. Dentro de este grupo están los derivados de poli(óxido de alquileno) sustituidos en alfa tales como polietilenglicoles (PEG) y metoxipolietilenglicoles (mPEG) u otros derivados de PAO sustituidos con alquilo adecuados tales como los que contienen grupos $\text{C}_1 - \text{C}_4$ mono o bis-terminales. Se prefieren polímeros no antigénicos de cadena lineal tales como homopolímeros de monometil-PEG. Otros poli(óxidos de alquileno) adecuados incluyen otros homopolímeros de polietilenglicol, otros copolímeros de bloque de alquil-poli(óxido de etileno) y copolímeros de copolímeros de bloque de poli(óxidos de alquileno).

30 El o al menos un R es un poli(óxido de alquileno), por ejemplo un polietilenglicol PEG o un metoxipolietilenglicol (mPEG), puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 200 y aproximadamente 40.000, por ejemplo un peso molecular de entre 200 y aproximadamente 20.000, por ejemplo un peso molecular de entre 2.000 y aproximadamente 10.000, por ejemplo un peso molecular de aproximadamente 5.000.

35 La hCG puede obtenerse mediante cualquier medio conocido en la técnica. La hCG tal como se usa en el presente documento incluye hCG derivada de ser humano y recombinante. La hCG derivada de ser humano puede purificarse a partir de cualquier fuente apropiada (por ejemplo orina) mediante cualquier método conocido en la técnica. La hCG puede ser hCG recombinante, por ejemplo expresada en una línea celular humana. En la técnica se conocen bien métodos de expresión y purificación de hCG recombinante. Preferiblemente la hCG es una hCG recombinante ("rhCG" o "rechCG"). Preferiblemente la hCG es una hCG recombinante derivada de línea celular humana.

40 Preferiblemente la hCG recombinante modificada con polietilenglicol incluye $\alpha 2,3$ -sialilación y $\alpha 2,6$ -sialilación. La rhCG puede incluir además opcionalmente $\alpha 2,8$ -sialilación.

En realizaciones de la invención, la rhCG puede estar presente como una única isoforma o como una mezcla de

isoformas.

La rhCG puede tener un contenido en ácido siálico [expresado en cuanto a una razón de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 15 mol/mol o más (ejemplo 8), por ejemplo de desde 15 mol/mol hasta 25 mol/mol, por ejemplo desde 17 mol/mol hasta 24 mol/mol, por ejemplo desde 17,7 mol/mol hasta 23 mol/mol, por ejemplo desde 18 mol/mol hasta 22 mol/mol, por ejemplo desde 19 mol/mol hasta 21 mol/mol, por ejemplo desde 19 mol/mol hasta 20 mol/mol. La rhCG puede producirse o expresarse en una línea celular humana.

La rhCG puede tener el 10% o más de la sialilación total que es α 2,3-sialilación. Por ejemplo, el 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 ó 90% o más de la sialilación total puede ser α 2,3-sialilación. La rhCG puede incluir α 2,3-sialilación en una cantidad que es de desde el 45% hasta el 80% de la sialilación total, por ejemplo del 50% al 70% de la sialilación total, por ejemplo del 55 al 65% de la sialilación total. La rhCG puede incluir α 2,3-sialilación en una cantidad que es de desde el 65 hasta el 85% de la sialilación total, por ejemplo desde el 70 hasta el 80% de la sialilación total, por ejemplo desde el 71 hasta el 79% de la sialilación total. Pueden tener el 50% o menos de la sialilación total que es α 2,6-sialilación. Por ejemplo el 45, 40, 30, 20, 10, 5% o menos de la sialilación total puede ser α 2,6-sialilación. La rhCG puede incluir α 2,6-sialilación en una cantidad que es de desde el 20-55% de la sialilación total, por ejemplo, el 30-50% de la sialilación total, por ejemplo el 35-45% de la sialilación total. La rhCG puede incluir α 2,6-sialilación en una cantidad que es de desde el 15 hasta el 35% de la sialilación total, por ejemplo desde el 20 hasta el 30% de la sialilación total, por ejemplo desde el 21 hasta el 29% de la sialilación total. La rhCG puede tener el 5% o menos de la sialilación total que es α 2,8-sialilación. Por ejemplo el 2,5% o menos de la sialilación total puede ser α 2,8-sialilación. La rhCG puede incluir α 2,8-sialilación en una cantidad que es de desde el 0 hasta el 4% de la sialilación total, por ejemplo del 0,1 al 4% de la sialilación total, por ejemplo desde el 0,5 hasta el 3% de la sialilación total, por ejemplo desde el 0,5 hasta el 2,5% de la sialilación total. La rhCG puede no tener nada de α 2,8-sialilación. Por sialilación quiere decirse la cantidad de residuos siálicos presentes en las estructuras de hidratos de carbono de hCG. α 2,3-sialilación significa sialilación en la posición 2,3 (tal como se conoce bien en la técnica) y α 2,6-sialilación en la posición 2,6 (también bien conocido en la técnica). Por tanto “% de la sialilación total puede ser α 2,3-sialilación” se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la hCG que están sialilados en la posición 2,3. El término “% de la sialilación total que es α 2,6-sialilación” se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la hCG que están sialilados en la posición 2,6.

La rhCG puede tener un contenido en ácido siálico (cantidad de sialilación por molécula de hCG) (basándose en la masa de proteína, en vez de la masa de proteína más hidrato de carbono) del 6% o más (por ejemplo entre el 6% y el 15%, por ejemplo entre el 7% y el 13%, por ejemplo entre el 8% y el 12%, por ejemplo entre el 11% y el 15%, por ejemplo entre el 12% y el 14%) en masa.

La hCG recombinante expresada en células de ovario de hámster chino (CHO) incluye exclusivamente α 2,3-sialilación.

La rhCG puede producirse o expresarse en una línea celular humana. Esto puede simplificar (y hacer que sea más eficiente) el método de producción porque la manipulación y el control, por ejemplo, del medio de crecimiento celular para retener la sialilación pueden ser menos críticos que con procedimientos conocidos. El método también puede ser más eficiente porque se produce menos rhCG básica que en la producción de productos de rhCG conocidos; se produce más rhCG ácida y la separación/retirada de hCG básica es menos problemática. La rhCG puede producirse o expresarse en una línea celular Per.C6, una línea celular derivada de Per.C6 o una línea celular Per.C6 modificada. La línea celular puede modificarse usando α 2,3-sialiltransferasa. La rhCG puede incluir ácidos siálicos con unión α 2,6 (α 2,6-sialilación) proporcionados mediante actividad sialiltransferasa endógena [de la línea celular]. Alternativa o adicionalmente, la línea celular puede modificarse usando α 2,6-sialiltransferasa.

La rhCG puede producirse usando α 2,3-sialiltransferasa. La rhCG puede incluir ácidos siálicos con unión α 2,6 (α 2,6-sialilación) proporcionados mediante actividad sialiltransferasa endógena. La rhCG puede producirse usando α 2,3 y/o α 2,6-sialiltransferasa.

La estructura de rhCG contiene restos de glicano. Puede producirse ramificación con el resultado de que el glicano puede tener 1, 2, 3, 4 o más residuos de azúcar terminales o “antenas”, tal como se conoce bien en la técnica. La rhCG de la invención puede tener glicanos con presencia de sialilación en estructuras mono-antenarias y/o di-antenarias y/o tri-antenarias y/o tetra-antenarias. La rhCG puede incluir estructuras de glicanos mono-sialiladas, di-sialiladas, tri-sialiladas y tetra-sialiladas, por ejemplo con las siguientes cantidades relativas: el 0,1-4% de mono-sialiladas; el 35 - 45% de di-sialiladas; el 0,5 - 8% de tri-sialiladas y el 0 - 1% de tetra-sialiladas (por ejemplo, tal como se muestra mediante análisis WAX de glicanos cargados, tal como se expone en el ejemplo 8D). Preferiblemente, la hCG recombinante de la invención incluye estructuras mono(1S), di(2S), tri(3S) y tetra(4S)-sialiladas. Preferiblemente, las cantidades relativas de estructuras sialiladas se encuentran en las siguientes razones (1S:2S:4S:4S): 0,2-1%:35-40%:2,5-7%:0,5-1% (por ejemplo, tal como se muestra mediante análisis WAX de glicanos cargados, tal como se expone en el ejemplo 8D).

En un ejemplo de la presente invención, se une polietilenglicol (por ejemplo de manera covalente) a través de residuos de aminoácido de hCG (o variante agonista de la misma). Preferiblemente el polietilenglicol se une al

extremo N-terminal de la hCG. Un experto en la técnica conoce varios polietilenglicoles activados que tienen varios grupos funcionales, grupos de unión, configuraciones y pesos moleculares diferentes. Estos pueden usarse para sintetizar conjugados de PEG-hCG o conjugados de variantes agonistas de PEG-hCG, mediante métodos que se conocen en la técnica (véase por ejemplo Roberts M. J. *et al.*, Adv. Drug Del. Rev. 54: 459-476, 2002, Harris J. M. *et al.*, Drug Delivery Systems 40: 538-551, 2001).

Según la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona una composición farmacéutica que comprende una rhCG recombinante modificada con polietilenglicol de fórmula (1a), por ejemplo una rhCG recombinante modificada con polietilenglicol que incluye α 2,3-sialilación y α 2,6-sialilación (por ejemplo, tal como se expuso anteriormente). La composición farmacéutica puede comprender además FSH y/o LH.

10 Puede obtenerse FSH mediante cualquier medio conocido en la técnica. FSH tal como se usa en el presente documento incluye FSH derivada de ser humano y recombinante. La FSH derivada de ser humano puede purificarse a partir de cualquier fuente (por ejemplo orina) mediante cualquier método conocido en la técnica. La FSH puede ser FSH recombinante, por ejemplo expresada en una línea celular humana. En la técnica se conocen bien métodos de expresión y purificación de FSH recombinante.

15 Puede obtenerse LH mediante cualquier medio conocido en la técnica. LH, tal como se usa en el presente documento, incluye LH derivada de ser humano y recombinante. La LH derivada de ser humano puede purificarse de cualquier fuente apropiada (por ejemplo orina) mediante cualquier método conocido en la técnica. En la técnica se conocen métodos de expresión y purificación de LH recombinante.

20 La composición farmacéutica puede ser para el tratamiento de la esterilidad, por ejemplo para su uso, por ejemplo, en técnicas de reproducción asistida (ART), inducción de la ovulación o inseminación intrauterina (IUI). La composición farmacéutica puede usarse, por ejemplo, en indicaciones médicas en las que se usan preparaciones de hCG conocidas. La presente invención también proporciona el uso de rhCG recombinante modificada con polietilenglicol y/o una preparación de rhCG recombinante modificada con polietilenglicol descrita en el presente documento (según aspectos de la invención) para, o en la fabricación de un medicamento para, el tratamiento de la esterilidad. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para dar composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo tecnología de parche), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (povos, pomadas o colirios) o como pulverización bucal o nasal. Una composición típica comprende un portador farmacéuticamente aceptable, tal como disolución acuosa, excipientes no tóxicos, incluyendo sales y conservantes, tampones y similares, tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimoquinta edición (Matt Publishing Company, 1975), en las páginas 1405 a 1412 y 1461 - 87, y el formulario nacional XIV decimocuarta edición (American Pharmaceutical Association, 1975), entre otros.

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

40 Las composiciones de la presente invención también pueden contener aditivos tales como, pero sin limitarse a, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Pueden incluirse agentes antibacterianos y antifúngicos para prevenir el crecimiento de microbios e incluyen, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Además, puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares.

45 En algunos casos, para obtener una acción prolongada es deseable ralentizar la absorción de hCG (y otros principios activos, si están presentes) a partir de una inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en agua. La tasa de absorción de hCG depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de combinación de hCG administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo la combinación de hCG en un vehículo oleoso.

50 Pueden realizarse formas de depósito inyectables formando matrices microencapsuladas de la rhCG recombinante modificada con polietilenglicol (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la razón de hCG con respecto a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación de hCG. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polivinilpirrolidona, poliortoésteres, polianhídridos, etc. También se preparan formulaciones inyectables de depósito atrapando la hCG en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

55 Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Las formulaciones inyectables pueden administrarse en cualquier recipiente adecuado, por ejemplo vial, jeringa

precargada, cartuchos para inyección, y similares.

Las formulaciones inyectables pueden suministrarse como un producto que tiene composiciones farmacéuticas que contienen rhCG recombinante modificada con polietilenglicol (opcionalmente con FSH, LH etc.) Si hay más de un principio activo (es decir, rhCG recombinante modificada con polietilenglicol y, por ejemplo, FSH o LH) estos pueden ser adecuados para la administración por separado o conjuntamente. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto puede suministrarse en cualquier envase apropiado. Por ejemplo, un producto puede contener varias jeringas precargadas que contienen o bien hCG, FSH, o bien una combinación tanto de FSH como de hCG, las jeringas envasadas en un envase de tipo blíster u otros medios para mantener la esterilidad. Un producto puede contener opcionalmente instrucciones para usar las formulaciones de rhCG recombinante modificada con polietilenglicol y FSH.

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

20 Descripción detallada de la invención

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

la figura 1 muestra un mapa de plásmido del vector de expresión de phCGalfa/beta;

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

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

la figura 4 muestra la detección de isoformas de rhCG en preparaciones de hCG recombinante derivada de línea celular humana según la invención (pista 3, 4) mediante IEF teñidas con azul de Coomassie, en comparación con preparaciones de la técnica anterior (pista 1, 2);

30 la figura 5 muestra tasas de aclaramiento metabólico (MCR, *metabolic clearance rate*) de muestras de hCG de Per.C6 modificada por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa;

la figura 6 muestra MCR a largo plazo de muestras de hCG de Per.C6 modificada por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa;

la figura 7 muestra el análisis mediante SEC-HPLC de la hCG pegilada producida mediante el método del ejemplo 12; y

35 las figuras 8A y 8B muestran el análisis mediante SEC-HPLC de los productos de hCG pegilada de la invención producidos mediante los métodos de los ejemplos 12A y 12B.

Selección de secuencias

HCG humana

40 Se usó la región codificante del gen para el polipéptido alfa de hCG según Fiddes y Goodman (1979). La secuencia se registra en el banco como AH007338 y en el momento de la construcción no había otras variantes de esta secuencia de proteína. La secuencia se denomina en el presente documento SEQ ID 1.

Se usó la región codificante del gen para el polipéptido beta de hCG según Fiddes y Goodman (1980). La secuencia se registra en el banco como NP_000728 y concuerda con las secuencias de proteína de CGbeta3, CGbeta5 y CGbeta7. La secuencia se denomina en el presente documento SEQ ID 2

45 Sialiltransferasa

α 2,3-Sialiltransferasa - Se usó la región codificante del gen para beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (α 2,3-sialiltransferasa, ST3GAL4) según Kitagawa y Paulson (1994). La secuencia se registra en el banco como L23767 y se denomina en el presente documento SEQ ID 3.

50 α 2,6-Sialiltransferasa - Se usó la región codificante del gen para beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (α 2,6-sialiltransferasa, ST6GAL1) según Grundmann *et al.* (1990). La secuencia se registra en el banco como

NM_003032 y se denomina en el presente documento SEQ ID 4.

Ejemplos

Ejemplo 1 Construcción del vector de expresión de hCG

5 Se amplificaron las secuencias codificantes de polipéptido alfa de hCG (AH007338, SEQ ID 1) y el polipéptido beta de hCG (NP_000728, SEQ ID 2) mediante PCR usando las combinaciones de cebadores CGa-fw y CGa-rev y CGb-fw y CGb-rec, respectivamente.

CGa-fw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGGATTACTACAGAAAAATATGC-3'

CGa-rev 5'-GGATGGCTAGCTTAAGATTTGTGATAATAAC-3'

CGb-fw 5'-CCAGGCGCGCCACCATGGAGATGTTCCAGGGGCTGC-3'

CGb-rev 5'-CCGGGTAACTTATTGTGGGAGGATCGGGG-3'

10 Se digirió el ADN de polipéptido beta de hCG amplificado resultante con las enzimas de restricción *Ascl* y *HpaI* y se insertó en los sitios *Ascl* y *HpaI* en el vector de expresión de mamífero dirigido por CMV que portaba un marcador de selección de neomicina. De manera similar, se digirió el ADN de polipéptido alfa de hCG con *BamHI* y *NheI* y se insertó en los sitios *BamHI* y *NheI* en el vector de expresión que ya contenía el ADN de polipéptido beta de hCG.

15 Se usó el ADN vector para transformar la cepa DH5 α de *E.coli*. Se escogieron colonias para la amplificación y, del número que incluían el vector que contenía ambas subunidades alfa y beta de hCG, se seleccionaron veinte para secuenciación. Todas las colonias seleccionadas para secuenciación contenían las secuencias correctas según SEQ ID 1 y SEQ ID 2. Se seleccionó el plásmido phCG A+B para transfección (figura 1).

Ejemplo 2 Construcción del vector de expresión de ST3

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

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'

2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

20 Se digirió el ADN de ST3 amplificado resultante con las enzimas de restricción *BamHI* y *AflI* y se insertó en los sitios *BamHI* y *AflI* en el vector de expresión de mamífero dirigido por CMV que portaba un marcador de resistencia a higromicina. Se amplificó el vector tal como se describió previamente y se secuenció. El clon pST3#1 (figura 2) contenía la secuencia correcta según SEQ ID 3 y se seleccionó para transfección.

Ejemplo 3 Construcción del vector de expresión de ST6

25 Se amplificó la secuencia codificante de beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (ST6, NM_003032, SEQ ID 4) mediante PCR usando la combinación de cebadores 2,6STfw y 2,6STrev.

2,6STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3'

2,6STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3'

30 Se digirió el ADN de ST6 amplificado resultante con las enzimas de restricción *BamHI* y *AflI* y se insertó en los sitios *BamHI* y *AflI* en el vector de expresión de mamífero dirigido por CMV que portaba un marcador de resistencia a higromicina. Se amplificó el vector tal como se describió previamente y se secuenció. El clon pST6#11 (figura 3) contenía la secuencia correcta según SEQ ID 4 y se seleccionó para transfección.

Ejemplo 4 Expresión estable de phCG A+B en células PER.C6. Transfección, aislamiento y examen de clones.

Se generaron clones de Per.C6 que produjeron hCG mediante la expresión de ambas cadenas de polipéptido de hCG a partir de un único plásmido (véase el ejemplo 1).

35 Para obtener clones estables, se usó un agente de transfección basado en liposomas con el constructo de phCG

A+B. Se seleccionaron los clones estables en medio de selección de Per.C6 complementados con FCS al 10% y que contenían G418. Tres semanas después de la transfección, crecieron clones resistentes a G418. Se seleccionaron un total de 389 clones para aislamiento. Se cultivaron los clones aislados en medios de selección hasta que fueron confluyentes al 70-80%. Se sometieron a ensayo los sobrenadantes para determinar el contenido de proteína hCG usando un ELISA selectivo para hCG y la actividad farmacológica en el receptor de hCG en la línea celular clonada, usando un ensayo de acumulación de AMPc. Se hicieron avanzar los clones (118) que expresaron proteína funcional para expansión en cultivo a frascos de 24 pocillos, 6 pocillos y T80.

Se iniciaron estudios para determinar la productividad y calidad del material a partir de 47 clones, en frascos T80 para generar suficiente material. Se cultivaron las células en medios complementados tal como se describió previamente durante 7 días y se recogió el sobrenadante. Se determinó la productividad usando el ELISA selectivo para hCG. Se determinó el perfil isoeléctrico del material (usando el método descrito en el ejemplo 6). Se usó la información del IEF para seleccionar clones para el análisis de tasa de aclaramiento metabólico. Se seleccionaron los clones con suficiente productividad y calidad para la modificación por ingeniería con sialiltransferasa.

Ejemplo 5a El nivel de sialilación aumenta en células que sobreexpresan α 2,3-sialiltransferasa. Expresión estable de pST3 en células PER.C6 que expresan hCG; transfección, aislamiento y examen de clones.

Se generaron clones de Per.C6 que produjeron hCG altamente sialilados, mediante la expresión de α 2,3-sialiltransferasa a partir de plásmidos independientes (véase el ejemplo 2) en células Per.C6 que ya expresaban ambas cadenas de polipéptido de hCG (véase el ejemplo 4). Se seleccionaron los clones producidos a partir de células PER.C6® tal como se expone en el ejemplo 4 por sus características incluyendo productividad, buen perfil de crecimiento, producción de proteína funcional y hCG producida que incluía cierta sialilación.

Se generaron clones estables tal como se describió previamente en el ejemplo 4. Se aislaron clones del programa con α 2,3-sialiltransferasa, se expandieron y se sometieron a ensayo. El número de clones final para el estudio con α 2,3 fue de cinco. Se adaptaron los clones con α 2,3-sialiltransferasa a las condiciones de suspensión y los medios libres de suero.

Como anteriormente, se sometieron a ensayo los clones usando un ELISA selectivo para hCG, la respuesta funcional en una línea celular de receptor de hCG, IEF (ejemplo 6). También se evaluaron para determinar la tasa de aclaramiento metabólico (ejemplo 9) y bioensayo de hCG según la USP (ejemplo 10). Se compararon los resultados con una hCG recombinante disponible comercialmente (Ovitrelle, Serono) y las líneas celulares Per.C6 de hCG Parental. Se exponen muestras representativas en los ejemplos y las figuras.

En conclusión, la expresión de hCG junto con α 2,3-sialiltransferasa en células Per.C6 da como resultado niveles aumentados de hCG sialilada en comparación con células que expresan hCG únicamente.

Ejemplo 5b Expresión estable de pST3 en células PER.C6 que expresan hCG - un método diferente

El heterodímero alfa-beta producido anteriormente (ejemplo 4) tenía un bajo nivel de sialilación que da como resultado un perfil de IEF muy básico. Tal como se indicó anteriormente (ejemplo 5a), la expresión de hCG junto con α 2,3-sialiltransferasa en células Per.C6 da como resultado niveles aumentados de hCG sialilada en comparación con células que expresan hCG únicamente.

Se realizó una doble transfección de los genes de las subunidades alfa y beta de hCG junto con el gen de la enzima α 2,3-sialiltransferasa en células Per.C6 en formato de cultivo celular en suspensión. Se generaron líneas celulares mediante cotransfección del vector de hCG (dual alfa/beta, ejemplo 1) y el vector que codifica para α 2,3-sialiltransferasa (ejemplo 2) en condiciones libres de suero. Se seleccionaron los clones producidos a partir de las células PER.C6® por sus características incluyendo productividad, buen perfil de crecimiento, producción de proteína funcional, y hCG producida que incluía cierta sialilación. Se aislaron los clones, se expandieron y se sometieron a ensayo.

Como anteriormente, se sometieron a ensayo los clones usando un ELISA selectivo para hCG, la respuesta funcional en una línea celular de receptor de hCG, IEF (ejemplo 6). También se evaluaron para determinar la tasa de aclaramiento metabólico (ejemplo 9) y bioensayo de hCG según la USP (ejemplo 10). Se compararon los resultados con una hCG recombinante disponible comercialmente (Ovitrelle, Serono) y las líneas celulares Per.C6 de hCG parental. Se exponen muestras representativas en los ejemplos y las figuras (véanse los ejemplos 6, 9, 10, figuras 4 y 5). La hCG recombinante producida por los clones (es decir, hCG recombinante según la invención) tiene una sialilación mejorada significativamente (es decir, en promedio más isoformas de hCG con altos números de ácidos siálicos), en comparación con hCG expresada sin α 2,3-sialiltransferasa y Ovitrelle (véanse los ejemplos 6 y 8, figura 4).

Ejemplo 6 Análisis del punto isoeléctrico pI de isoformas de hCG producidas por Per.C6 mediante isoelectroenfoque.

La electroforesis se define como el transporte de moléculas cargadas a través de un disolvente mediante un campo eléctrico. La movilidad de una molécula biológica a través de un campo eléctrico dependerá de la intensidad del

campo, la carga neta en la molécula, el tamaño y la forma de la molécula, la fuerza iónica y las propiedades del medio a través del cual migran las moléculas.

5 El isoelectroenfoque (IEF) es una técnica electroforética para la separación de proteínas basándose en su pI. El pI es el pH al que una proteína no tiene carga neta y no migrará en un campo eléctrico. El contenido en ácido siálico de las isoformas de hCG altera de manera sutil el punto pI para cada isoforma, lo que puede aprovecharse usando esta técnica para visualizar las isoformas de hCG de Per.C6 de cada clon.

10 Se analizaron los puntos isoelectrónicos de las isoformas de hCG producidas por Per.C6 en sobrenadantes de cultivo celular usando isoelectroenfoque. Se produjeron los medios de cultivo celular a partir de clones de hCG de Per.C6 tal como se describió en los ejemplos 4, 5a y 5b. Se separaron muestras de hCG de Per.C6 en geles de IEF Novex® que contenían poliacrilamida al 5% en condiciones nativas en un gradiente de pH 3,0 - 7,0 en una disolución de anfólito de pH 3,0 - 7,0. Se visualizaron las proteínas usando tinción con azul de Coomassie, usando métodos bien conocidos en la técnica.

15 La figura 4 muestra la detección de isoformas de rhCG mediante IEF teñidas con azul de Coomassie en composiciones según la invención (pista 3, 10 µg, y pista 4, 15 µg) y la composición derivada de CHO de la técnica anterior, Ovitrelle (pista 1, Ovitrelle, 10 µg, y pista 2, Ovitrelle, 15 µg). Las bandas representan isoformas de hCG que contienen diferente número de moléculas de ácido siálico. Usando este método, se identificaron los clones que produjeron isoformas de hCG con un mayor número de moléculas de ácido siálico. La figura 4 indica que hCG recombinante derivada de líneas celulares humanas modificadas por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa tienen un perfil más ácido que Ovitrelle.

20 Ejemplo 7 Análisis de la uniones de ácido siálico de hCG de Per.C6

Se analizaron los glicoconjugados usando un método de diferenciación de glicanos basado en lectinas. Con este método, pueden caracterizarse glicoproteínas y glicoconjugados unidos a nitrocelulosa. Las lectinas reconocen selectivamente un resto particular, por ejemplo ácido siálico con uniones α 2,3. Las lectinas aplicadas se conjugan con el hapteno esteroideo, digoxigenina, que permite la detección inmunológica de las lectinas unidas.

25 Se separaron hCG de Per.C6 purificada de un clon parental (sin sialiltransferasa adicional) y un clon modificado por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa usando técnicas de SDS-PAGE convencionales. Se usó como patrón una hCG recombinante disponible comercialmente (Ovitrelle, Serono).

30 Se analizó el ácido siálico usando el kit de diferenciación de glicanos DIG (n.º de cat. 11 210 238 001, Roche) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones positivas con aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) indicaron ácido siálico con unión de manera terminal (2-6). Las reacciones positivas con aglutinina II de *Maackia amurensis* (MAA) indicaron ácido siálico con unión de manera terminal (α 2-3).

35 En resumen, el clon parental contenía bajos niveles de ácido siálico tanto α 2,3 como α 2,6. Los clones modificados por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa contenían altos niveles de uniones de ácido siálico α 2,3 y bajos niveles de uniones de ácido siálico α 2,6. El control habitual, Ovitrelle, sólo contiene uniones de ácido siálico α 2,3. Esto concuerda con lo que se sabe sobre proteínas recombinantes producidas en células de ovario de hámster chino (CHO) (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990).

En conclusión, la modificación por ingeniería de células de hCG Per.C6 con α 2,3-sialiltransferasa aumentó de manera satisfactoria el número de moléculas de ácido siálico conjugadas con la hCG recombinante en la muestra.

Ejemplos 8A y 8B Cuantificación de ácido siálico total

40 El ácido siálico es un hidrato de carbono unido a proteína que se considera que es un monosacárido y aparece en combinación con otros monosacáridos como galactosa, manosa, glucosamina, galactosamina y fucosa. Se midió el ácido siálico total en rhCG purificada según la invención usando un método basado en el método de Stanton *et al.* (J. Biochem. Biophys. Methods. 30 (1995), 37 - 48).

Ejemplo 8A

45 Se midió el contenido total en ácido siálico de hCG recombinante de Per.C6 modificada con α 2,3-sialiltransferasa (por ejemplo, el ejemplo 5a, el ejemplo 5b) y se halló que era de más de 15 mol/mol, [expresado en cuanto a una razón de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína], por ejemplo más de 18 mol/mol, por ejemplo 19,1 mol/mol. Esto puede compararse con Ovitrelle que tiene un contenido total en ácido siálico de 17,6 mol/mol.

Ejemplo 8B

50 Se midió el contenido total en ácido siálico de hCG recombinante de Per.C6 modificada con α 2,3-sialiltransferasa 080019-19 (preparada mediante los métodos del ejemplo 5b anterior) y se halló que era de 20 mol/mol, [expresado en cuanto a una razón de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína]. De nuevo, esto puede compararse favorablemente con Ovitrelle que tiene un contenido total en ácido siálico de 17,6 mol/mol. Se sometió a

prueba este ejemplo (080019-19) para cuantificar las cantidades relativas de ácido siálico α 2,3 y α 2,6 (ejemplo 8C).

Ejemplo 8C - Cuantificación las cantidades relativas de ácido siálico α 2,3 y α 2,6

Se midieron las cantidades en porcentaje relativas de ácido siálico α 2,3 y α 2,6 en rhCG purificada [ejemplo (080019-19), y otros dos ejemplos preparados mediante los métodos del ejemplo 5] usando técnicas conocidas: HPLC con fase normal (NP, *normal phase*).

Para cuantificar el ácido siálico alfa-2,3 y 2,6 en glicanos con unión a O, se realizó el siguiente análisis. Se escindieron los glicanos unidos a O de la muestra de hCG usando un kit de liberación de glicanos Orela y se separaron en NP-HPLC. Se digirieron muestras de los glicanos extraídos (extraídos como anteriormente) y combinados, con diferente sialidasas para determinar las uniones. Se realizó esta degradación enzimática de los glicanos usando alfa-2,3,6,8-sialidasa y alfa-2,3-sialidasa. Entonces volvieron a separarse los glicanos sometidos a digestión enzimática, en la columna de NP, y se identificaron los O-glicanos en la NP-HPLC usando patrones preparados. Se calcularon los porcentajes relativos y se muestran en la siguiente tabla (SA = Ácido siálico).

% de SA			Estructura
09PD84-006-3	09PD-84-04	080019-19	
63	63	59	α 2,3-SA
37	37	41	α 2,6-SA

Se halló que los porcentajes relativos estaban en los intervalos del 55% - 65% (por ejemplo, el 59%) para la α 2,3-sialilación; y del 35 al 45% (por ejemplo, el 41%) para la α 2,6-sialilación.

Ejemplo 8D Cuantificación de cantidades relativas estructuras sialiladas mono, di, tri y tetra-antenarias

Se midieron las cantidades en porcentaje relativas de estructuras mono, di, tri y tetra-sialiladas en glicanos extraídos a partir de rhCG purificada (las tres muestras usadas en el ejemplo 8C) usando técnicas conocidas.

Se inmovilizó (bloque de gel) cada muestra de rhCG, se lavó, se redujo, se alquiló y se digirió con PNGasa F durante la noche. Luego se extrajeron los N-glicanos y se procesaron. Los N-glicanos para el análisis mediante NP-HPLC y WAX-HPLC se marcaron con el fluoróforo 2AB tal como se detalla en Roile *et al*.

Se llevó a cabo HPLC de intercambio aniónico débil (WAX, *weak anion exchange*) para separar los N-glicanos por carga (ejemplo 8C) tal como se expone en Roile *et al*, con un patrón de N-glicano de fetuina como referencia. Los glicanos eluyeron según el número de ácidos siálicos que contenían. Todas las muestras incluían estructuras mono (1S), di (2S), tri (3S) y tetra (4S)-sialiladas. Se halló que las cantidades relativas de las estructuras sialiladas estaban en las siguientes proporciones (1S:2S:4S:4S): el 0,1-4%: el 35-45%: el 0,5-8%: el 0-1%.

Un ejemplo preferido, 080019-19, incluía estructuras mono (1S), di (2S), tri (3S) y tetra (4S)-sialiladas. Las cantidades relativas de las estructuras sialiladas estaban en las siguientes proporciones (1S:2S:4S:4S): el 0,1-4%: el 35-45%: el 0,5-8%: el 0-1%.

Ejemplo 9 Determinación de las tasas de aclaramiento metabólico de rhCG

Para determinar la tasa de aclaramiento metabólico (MCR) de muestras de hCG de Per.C6 modificadas por ingeniería usando α 2,3-sialiltransferasa (por ejemplo, los ejemplos 5a, 5b), se les inyectó a ratas hembra conscientes (3 animales por clon) en la vena de la cola a tiempo cero un bolo de rhCG (1 - 10 μ g/rata, basado en la cuantificación mediante ELISA de muestras, DRG EIA 1288). Se extrajeron muestras de sangre (400 μ l) de la punta de la cola a las 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 32 horas después de la inyección de la muestra de prueba. Se recogió el suero mediante centrifugación y se sometió a ensayo para determinar el contenido en hCG mediante ELISA (DRG EIA 1288). La MCR de muestras de hCG de Per.C6 modificadas por ingeniería usando α 2,3-sialiltransferasa mostró que la semivida era similar a la del patrón (figura 5). La figura 6 muestra que otras muestras de hCG modificadas por ingeniería usando α 2,3-sialiltransferasa pueden tener una semivida mejorada en comparación con el patrón (figura 6).

Ejemplo 10 – Bioensayo de hCG según la USP

Se llevó a cabo un bioensayo de hCG, para someter a ensayo la actividad específica de hCG. Se midió la actividad según la USP (Monografías de la USP: Gonadotropina coriónica, USPC Oficial 1/8/09-30/11/09), usando Ovitrelle como patrón. Ovitrelle tiene una actividad biológica de 26.000 U.I./mg (Curr Med Res Opin. Dic de 2005; 21(12): 1969 - 76). El límite de aceptación >21.000 U.I. de hCG/mg. La actividad biológica para una muestra de hCG recombinante de hCG derivada de línea celular humana modificada por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa (que tiene un contenido en ácido siálico de 19,1 mol/mol - véase el ejemplo 8) fue de 27.477 U.I. de hCG/mg.

Ejemplo 11 Visión general de producción y purificación

Se desarrolló un procedimiento para producir hCG recombinante en células PER.C6 que se cultivaron en suspensión

en medio libre de suero. El procedimiento se describe a continuación y se aplicó a varias líneas celulares PER.C6 productoras de hCG.

Se purificó hCG recombinante a partir de un clon $\alpha 2,3$ usando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976).

- 5 Para la producción de PER.C6-hCG, se adaptaron las líneas celulares a un medio libre de suero, es decir, Excell 525 (JRH Biosciences). En primer lugar, se cultivaron las células para formar una monocapa confluyente al 70%-90% en un frasco de cultivo T80. En el pase, se resuspendieron las células en el medio libre de suero, Excell 525 + L-glutamina 4 mM, hasta una densidad celular de $0,3 \times 10^6$ células/ml. Se puso una suspensión celular de 25 ml en un frasco con agitación de 250 ml y se agitó a 100 rpm a 37°C al 5% de CO₂. Después de alcanzar una densidad celular de $> 1 \times 10^6$ células/ml, se subcultivaron las células hasta una densidad celular de 0,2 ó $0,3 \times 10^6$ células/ml y se cultivaron adicionalmente en frascos con agitación a 37°C, el 5% de CO₂ y 100 rpm.

- 15 Para la producción de hCG, se transfirieron las células a un medio de producción libre de suero, es decir, VPRO (JRH Biosciences), que soporta el crecimiento de células PER.C6 hasta densidades celulares muy altas (habitualmente $> 10^7$ células/ml en un cultivo discontinuo). En primer lugar, se cultivaron las células hasta $> 1 \times 10^6$ células/ml en Excell 525, luego se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm y posteriormente se suspendieron en medio VPRO + L-glutamina 6 mM hasta una densidad de 1×10^6 células/ml. Entonces se cultivaron las células en un frasco con agitación durante 7-10 días a 37°C, el 5% de CO₂ y 100 rpm. Durante este periodo, las células crecieron hasta una densidad de $> 10^7$ células/ml. Se recogió el medio de cultivo después de que la viabilidad celular empezase a disminuir. Se centrifugaron las células durante 5 min a 1000 rpm y se usó el sobrenadante para la cuantificación y purificación de hCG. Se determinó la concentración de hCG usando ELISA (DRG EIA 1288).

- 20 Después de eso, se llevó a cabo la purificación de hCG usando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976). Esto se logró mediante cromatografía en DEAE-celulosa, filtración en gel en Sephadex G100, cromatografía de adsorción en hidroxapatita y electroforesis en poliácridamida preparativa.

- 25 Durante todos los procedimientos cromatográficos, se confirmó la presencia de hCG recombinante inmunorreactiva mediante RIA (DRG EIA 1288) e IEF (ejemplo 6).

Ejemplo comparativo 12 Pegilación

- 30 En un ejemplo de la presente invención, se une polietilenglicol (por ejemplo, de manera covalente) a través de residuos de aminoácido de hCG (o variante agonista de la misma). Preferiblemente, se une el polietilenglicol al extremo N-terminal de la hCG. Un experto en la técnica conoce varios polietilenglicoles activados que tienen varios grupos funcionales, grupos de unión, configuraciones y pesos moleculares diferentes. Estos pueden usarse para sintetizar conjugados PEG-hCG o conjugados variantes agonistas PEG-hCG, mediante métodos que se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, Roberts M. J. *et al.*, Adv. Drug Del. Rev. 54: 459-476, 2002, Harris J. M. *et al.*, Drug Delivery Systems 40: 538-551, 2001).

- 35 Se sintetizó una preparación sustancialmente homogénea de hCG pegilada de manera N-terminal usando una metoxi-PEG-hidrazina (20 kD). La metoxi-PEG-hidrazina (20 kD) está ampliamente disponible y sus usos se conocen bien en la técnica. Se usó una reacción de transaminación para eliminar el grupo de amina en el extremo N-terminal de la hCG recombinante derivada humana, para dejar un aldehído en esta posición. Una reacción química entre el grupo aldehído y la metoxi-PEG-hidrazina (20kD) conduce a pegilación de la hCG en el extremo N-terminal. Se purificó el producto de hCG pegilada a partir de la mezcla de reacción hasta $> 95\%$ (análisis mediante SEC) usando una única etapa de cromatografía de intercambio iónico, mediante métodos conocidos en la técnica.

- 40 Se concentró 1 mg/ml de rhCG purificada (producida de manera interna mediante el método del ejemplo 5b y purificada según el método del ejemplo 11) en acetato de amonio 20 mM, NaCl 150 mM (pH 8) hasta 3 mg/ml, y se condicionó a tampón de acetato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5 mediante dispositivo de ultracentrífuga de 10 KD (Vivaspin 20) a 4.000 rpm, 8°C.

- 45 **Transaminación:** Se incubó la hCG concentrada a temperatura ambiente durante 4 horas en una disolución que contenía acetato de sodio 2 M, ácido acético 0,4 M, glioxilato de sodio 0,1 M y CuSO₄ 5 mM (pH 5,5). Entonces se detuvo la reacción mediante la adición de EDTA hasta una concentración final de 20 mM. Se usó un dispositivo de ultracentrífuga de 10 KD para retirar los componentes de transaminación no deseados y se cambió el tampón a fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5).

- 50 **Pegilación:** Se preparó una disolución madre 10 mM de m-PEG-hidrazina disolviendo polvo liofilizado (NOF) en HCl 1 mM. Se preparó una disolución madre 200 mM de cianoborohidruro de sodio disolviendo polvo liofilizado (Fluka) en agua.

- 55 Se añadió una cantidad molar de 11 veces de m-PEG-hidrazina de la disolución madre 10 mM a un vial que contenía rhCG transaminada (3 mg/ml) mientras se agitaba. Inmediatamente después de eso, se añadió una cantidad molar de 75 veces de cianoborohidruro de sodio de la disolución madre, como agente reductor. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas y se monitorizó la extensión de la modificación de

hCG por PEG (pegilación) mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC); columna de HPLC Superdex-75 (GE Healthcare). Después de 24 horas, se detuvo la reacción y se diluyó 1:1 hasta 1 mg/ml con tampón de glicina 400 mM, fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,7 y se llevó a cabo un ajuste del pH final con HCl 1 M. Se filtró la mezcla de reacción con filtro de 0,2 μm , se dividió en alícuotas y se almacenó a 4°C. Se muestra el análisis mediante SEC-HPLC en la figura 7.

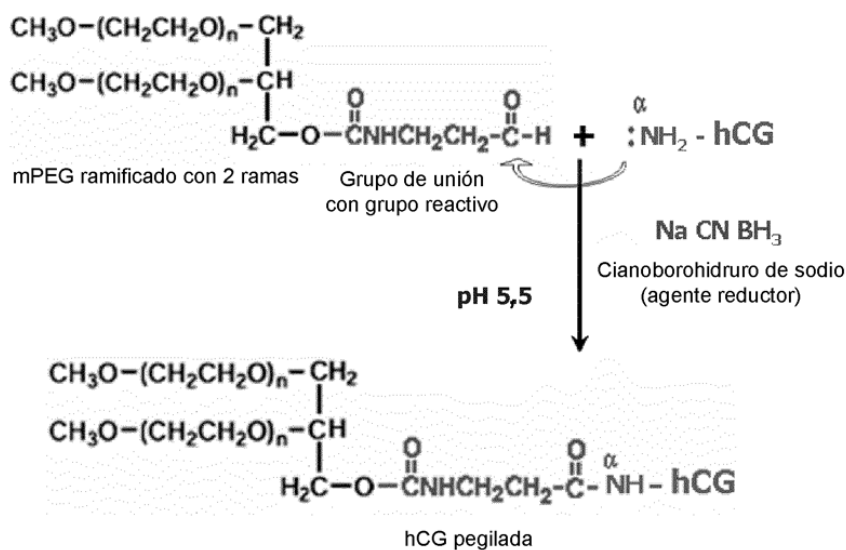
Puede observarse a partir del análisis mediante HPLC (figura 7) que el método proporcionó hCG pegilada. Se pegilaron aproximadamente el 16% de las moléculas de hCG. Se cree que el rendimiento relativamente bajo de esta reacción fue porque aproximadamente el 80%-90% de las proteínas humanizadas tienen residuos de acetilo en su extremo N-terminal, lo que significó que el rendimiento de la etapa de transaminación de hCG fue relativamente bajo.

Ejemplo 12A Pegilación usando m-PEG-aldehído con 2 ramificaciones (20 Kd):

El grupo funcional de m-PEG-aldehído interactúa principalmente con el extremo N-terminal a pH 5,5. Unos experimentos llevados a cabo con un m-PEG-aldehído lineal produjeron hCG pegilada con aproximadamente de 6 a 7 filamentos de PEG en vez de los 2 filamentos esperados. Esto implica que m-PEG-aldehído interactúa con otros aminoácidos, tales como histidina (hCG tiene 4 residuos de histidina).

Los presentes inventores hallaron que el uso de un m-PEG-aldehído con 2 ramificaciones redujo o impidió las pegilaciones no deseadas (el impedimento estérico suprime el acceso a sitios distintos del extremo N-terminal) y aumentó el rendimiento de un producto sólo con pegilación N-terminal. El procedimiento que se llevó a cabo se muestra en el esquema 1 y es tal como sigue.

Esquema 1: Pegilación de hCG con mPEG-aldehído ramificado con 2 ramas



[En los esquemas 1, 2 y 3 en el presente documento, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ es la nomenclatura habitual que representa mPEG. Los números enteros n y m en los esquemas 1, 2 y 3 no tienen el mismo significado que esos números enteros en las presentes reivindicaciones.

Se concentró 1 mg/ml de rhCG purificada (producida de manera interna mediante el método del ejemplo 5b y purificada según el método del ejemplo 11) en acetato de amonio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8 hasta 3 mg/ml y se condicionó a tampón de acetato de amonio 50 mM, NaCl 150 mM (pH 5,5) mediante un dispositivo de ultracentrífuga de 10 KD (Vivaspin 20) a 4.000 rpm, 8°C.

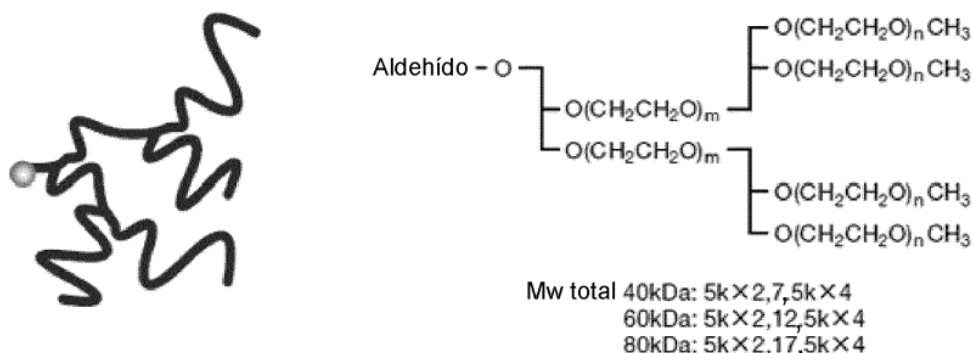
Se preparó una disolución madre 10 mM de m-PEG-aldehído con 2 ramificaciones (40 KD) disolviendo polvo liofilizado (NOF) en HCl 1 mM. Se preparó una disolución madre 200 mM de cianoborohidruro de sodio disolviendo polvo liofilizado (Fluka) en agua.

Se añadió una cantidad molar de 10 veces del m-PEG-aldehído con 2 ramificaciones de la disolución madre 10 mM a un vial que contenía rhCG (3 mg/ml), y se agitó. Inmediatamente después de eso, se añadió una cantidad molar de 75 veces de cianoborohidruro de sodio, como agente reductor, de la disolución madre. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas y se monitorizó la extensión de la modificación de hCG por PEG (pegilación) mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC); columna de HPLC Superdex-200 (GE Healthcare). Después de 24 horas, se detuvo la reacción y se diluyó 1:1 hasta 1 mg/ml con glicina 400 mM, fosfato

de sodio 50 mM, NaCl 150 mM (tampón de pH 6,7). Se llevó a cabo un ajuste del pH final con HCl 1 M. Se filtró la mezcla de reacción con filtro de 0,2 µm, se dividió en alícuotas y se almacenó a 4°C.

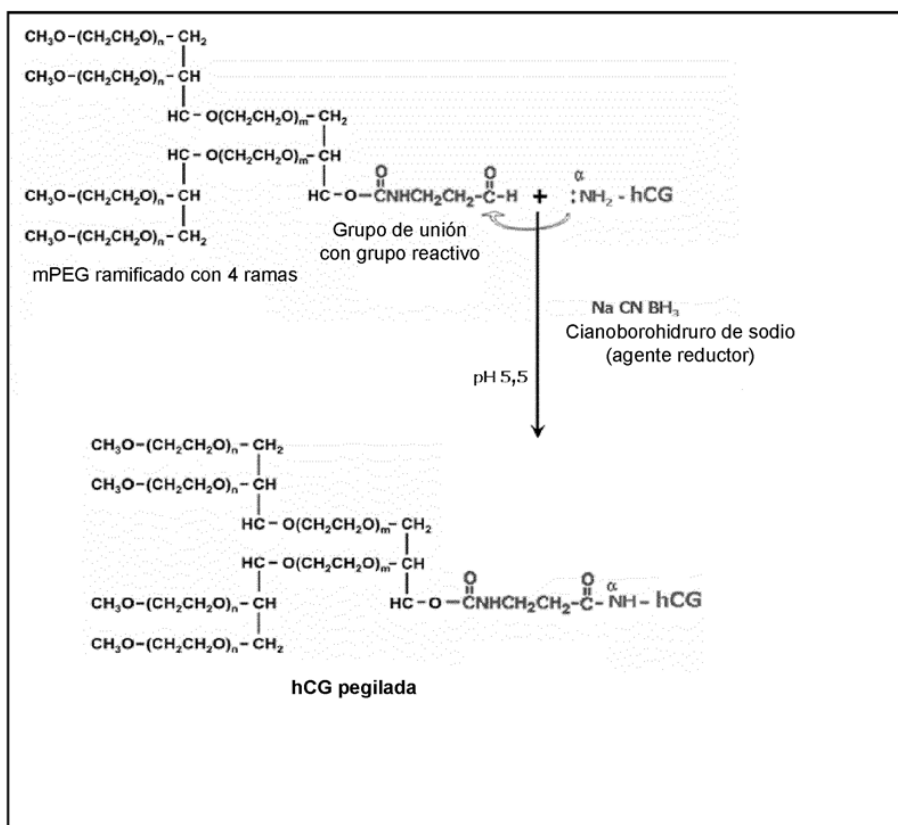
Se muestra el análisis mediante SEC-HPLC (Superdex-200 10/300 mm GL) en la figura 8A. Tal como se presenta en la figura 8-A, se observaron dos poblaciones de hCG pegilada. El primer pico eluido (n.º 1) fueron los filamentos de PEG de mayor peso molecular y el segundo pico eluido (n.º 2) fueron los filamentos de PEG de menor peso molecular. Se pegilaron el 94% de las moléculas de hCG, lo que representa un aumento considerable del rendimiento con respecto al ejemplo 12. La determinación del número de filamentos de PEG en cada población fue imposible en las condiciones de SEC usadas, porque el m-PEG-aldehído con 2 ramificaciones restante eluye al mismo TR (tiempo de retención) que la hCG pegilada. Se sometió a prueba el producto de hCG pegilada ramificada para determinar su actividad en un bioensayo (ejemplo 13).

Se apreciará que es más probable que el uso de un reactivo de m-PEG de mayor ramificación (por ejemplo, un m-PEG-aldehído con 4 ramificaciones tal como el que se representa a continuación) produzca una única población de PEG-hCG con menos filamentos de PEG (pico n.º 2 en la figura 1-B), porque un m-PEG-aldehído con 4 ramificaciones suprimirá adicionalmente el acceso a otros sitios además del extremo N-terminal.



En el esquema 2, se muestra un esquema adecuado para preparar un m-PEG-aldehído con ramificado con 4 ramas mediante un método similar al mostrado en el esquema 1 anterior.

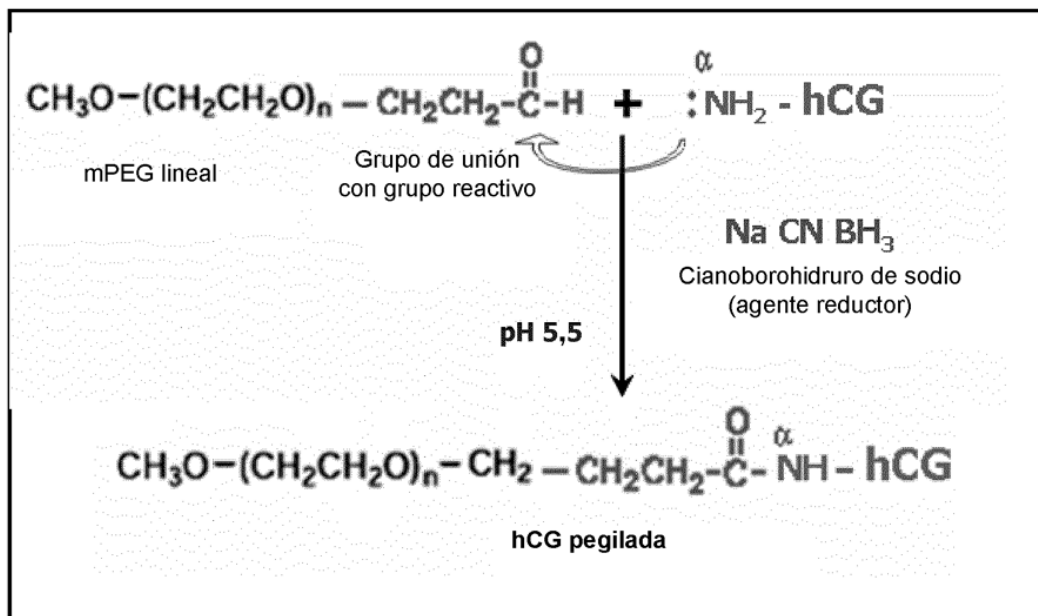
Esquema 2: Pegilación de hCG con m-PEG-aldehído con ramificado con 4 ramas



Ejemplo comparativo 12 B

Se modificó la rhCG (producida de manera interna mediante el método del ejemplo 5b y purificada según el método del ejemplo 11) con un m-PEG-aldehído lineal (10 KD), usando el método del ejemplo 12A. El procedimiento que se llevó a cabo se muestra en el esquema 3 y es tal como sigue:

- 5 Esquema 3: Pegilación de hCG con mPEG-aldehído lineal:



El análisis mediante SEC-HPLC del producto hCG pegilada lineal se presenta en la figura 8-B. Esta hCG pegilada lineal también se sometió a prueba para determinar su actividad en un bioensayo (ejemplo 13).

Ejemplo 13 - Bioensayo de hCG activada con PEG

- 10 Se produjo una hCG recombinante mediante el método del ejemplo 5b y se purificó según el método del ejemplo 11. Se asignaron 21 ratas a 3 grupos (7 ratas por grupo), y a cada rata se le inyectó tres veces, en días independientes (cada inyección en un día diferente), una de las siguientes dosis de la hCG recombinante (1 grupo = 1 dosis): 4,3 ng (ratas en el grupo A), 8,6 ng (ratas en el grupo B); y 17,1 ng (ratas en el grupo C). Después de 5 días, se sacrificaron las ratas y se pesó el útero para la determinación de potencia, según un bioensayo conocido y de rutina.
- 15 Una rata a la que se le habían inyectado 3 dosis diarias que sumaban en total 4,3 ng de la hCG recombinante tiene un peso uterino promedio de 30-40 mg después de 5 días. Una rata a la que se le habían inyectado 3 dosis diarias que sumaban en total 8,6 ng rhCG tiene un peso uterino promedio de 60-70 mg después de 5 días. Una rata a la que se le habían inyectado 3 dosis diarias de 17,1 ng rhCG tiene un peso uterino promedio de 110-120 mg después de 5 días (véase la tabla a continuación).
- 20 Los inventores sometieron a prueba los productos de la invención para determinar el potencial para proporcionar una formulación de acción prolongada que permitiría una única dosis semanal.
- Los presentes inventores usaron el mismo bioensayo para medir el peso uterino después de 5 días de tratarse las ratas con:
- 25 (i) una única inyección de hCG recombinante producida de manera interna mediante el método del ejemplo 5b y purificada según el método del ejemplo 11, que se administró a diez veces la concentración de la mayor de las tres dosis de inyección diaria, es decir a diez veces la concentración (170 ng);
- (ii) una única inyección de hCG recombinante pegilada ramificada de la invención producida mediante el método del ejemplo 12A que se administró a diez veces la concentración de la mayor de las tres dosis de inyección diaria, es decir a diez veces la concentración (170 ng); y
- 30 (iii) una única inyección de hCG recombinante pegilada lineal producida mediante el método del ejemplo 12 que se administró a diez veces la concentración de la mayor de las tres dosis de inyección diaria, es decir a diez veces la concentración (170 ng).

Se muestran los resultados en la siguiente tabla.

5 Puede observarse que el ejemplo de bioensayo de PEG-rhCG ramificada (columna 5 de la tabla) demuestra que una única inyección de la rhCG pegilada ramificada de la invención proporciona un peso uterino promedio (mg) de 134,11, aproximadamente equivalente a 3 inyecciones únicas de la mayor dosis de 17,1 ng de rhCG. Esto indica claramente que sería viable una formulación de “liberación sostenida una vez a la semana” usando la hCG pegilada de la invención. Esta capacidad para proporcionar una formulación una vez a la semana de hCG recombinante representa una ventaja importante con respecto a las formulaciones de hCG conocidas.

Peso uterino promedio (mg)					
Grupo	rhCG QS-MP 09PD-84-012	rhCG QS-MP 09PD-84-012	PEG-rhCG lineal QS-MP 09PD-84-012	PEG-rhCG ramificada QS- MP 09PD-84-012	Tampón
	3 inyecciones de 4,3 ng (grupo A), 8,6 ng (grupo B) y 17,1 ng (grupo C)	1 inyección Concentración x10 (170 ng) Grupo (i)	1 inyección Concentración x10 (170 ng) Grupo (iii)	1 inyección Concentración x10 (170 ng) Grupo (ii)	
A	38,81				
B	57,28				
C	117,23	64,05	35,22	134,11	41,9

rhCG = hCG recombinante

Bibliografía

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

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

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

15 Fiddes, J. C. y Goodman, H. M. (1979) Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 281, 351-356.

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

20 Kagawa Y, Takasaki S, Utsumi J, Hosoi K, Shimizu H, Kochibe N, y Kobata A. (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon-beta 1 and recombinant human interferon-beta 1 produced by three different mammalian cells. *J Biol Chem*. 263(33), 17508-17515.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1), 265-75.

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

Steelman SL, y Pohley FM. (1953) Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 53(6), 604-616.

30 Svensson EC, Soreghan B, y Paulson JC. (1990) Organization of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. *J Biol Chem*. 265(34):20863-20868.

Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N, y Kobata A (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 263(8), 3657-3663.

35 Ulloa-Aguirre A, MidgleyAR Jr, Beitins IZ, y 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, y Nayudu P. (2003). Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biol Reprod.* 69(2), 379-389.

5 SEQ ID 1

Polipéptido alfa de gonadotropina coriónica humana

Número de registro AH007338

Secuencia de nucleótidos de hCG alfa

```

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

```

10 Secuencia de proteína de hCG alfa

```

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

```

SEQ ID 2

Polipéptido beta de gonadotropina coriónica humana

Número de registro NP_000728

15 Secuencia de nucleótidos de hCG beta

Secuencia de nucleótidos

```

1  ATGGAGATGT  TCCAGGGGCT  GCTGCTGTTG  CTGCTGCTGA  GCATGGGCGG
GACATGGGCA
61  TCCAAGGAGC  CGCTTCGGCC  ACGGTGCCGC  CCCATCAATG  CCACCCTGGC
TGTGGAGAAG
121 GAGGGCTGCC  CCGTGTGCAT  CACCGTCAAC  ACCACCATCT  GTGCCGGCTA
CTGCCCCACC
181 ATGACCCGCG  TGCTGCAGGG  GGTCC TGCCG  GCCCTGCCTC  AGGTGGTGTG
CAACTACCGC

```

ES 2 693 273 T3

241 GATGTGCGCT TCGAGTCCAT CCGGCTCCCT GGCTGCCCCG GCGGCGTGAA
CCCCGTGGTC
301 TCCTACGCCG TGGCTCTCAG CTGTCAATGT GCACTCTGCC GCCGCAGCAC
CACTGACTGC
361 GGGGGTCCCA AGGACCACCC CTTGACCTGT GATGACCCCC GCTTCCAGGA
CTCCTCTTCC
421 TCAAAGGCC CCCCCCAG CCTTCCAAGT CCATCCCGAC TCCCGGGGCC
CTCGGACACC
481 CCGATCCTCC CACAATAA

Secuencia de proteína de hCG beta

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

SEQ ID 3

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

Número de registro L23767

Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

1 ATGTGTCCTG CAGGCTGGAA GCTCCTGGCC ATGTTGGCTC TGGTCCTGGT
CGTCATGGTG
61 TGGTATTCCA TCTCCCGGGA AGACAGGTAC ATCGAGCTTT TTTATTTTCC
CATCCCAGAG
121 AAGAAGGAGC CGTGCCCTCA GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG CCTCTAAGCT
CTTTGGCAAC
181 TACTCCCGGG ATCAGCCCAT CTCCTGCGG CTTGAGGATT ATTTCTGGGT
CAAGACGCCA
241 TCTGCTTACG AGCTGCCCTA TGGGACCAAG GGGAGTGAGG ATCTGCTCCT
CCGGGTGCTA
301 GCCATACCA GCTCCTCCAT CCCAAGAAC ATCCAGAGCC TCAGGTGCCG
CCGCTGTGTG
361 GTCGTGGGGA ACGGGCACCG GCTGCGGAAC AGCTCACTGG GAGATGCCAT
CAACAAGTAC
421 GATGTGGTCA TCAGATTGAA CAATGCCCCA GTGGCTGGCT ATGAGGGTGA
CGTGGGCTCC

ES 2 693 273 T3

481 AAGACCACCA TGC GTCTCTT CTACCCTGAA TCTGCCCCT TCGACCCCAA
AGTAGAAAAC
541 AACCCAGACA CACTCCTCGT CCTGGTAGCT TTCAAGGCAA TGGACTTCCA
CTGGATTGAG
601 ACCATCCTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCGA AAGGGTTTCT GGAAACAGCC
TCCCCTCATC
661 TGGGATGTCA ATCCTAAACA GATTGCGATT CTCAACCCT TCTTCATGGA
GATTGCAGCT
721 GACAACTGC TGAGCCTGCC AATGCAACAG CCACGGAAGA TTAAGCAGAA
GCCACCACG
781 GGCCTGTTGG CCATCAGCT GGCCCTCCAC CTCTGTGACT TGGTGCACAT
TGCCGGCTTT
841 GGCTACCCAG ACGCCTACAA CAAGAAGCAG ACCATTCCT ACTATGAGCA
GATCACGCTC
901 AAGTCCATGG CGGGGTCAGG CCATAATGTC TCCCAAGAGG CCCTGGCCAT
TAAGCGGATG
961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCACG TCCTTCTGA

Secuencia de proteína de ST3GAL4

1 MCPAGWKLLA MLALVLVVMV WYSISREDRY IELFYFPIPE KKEPCLQGEA
ESKASKLFGN
61 YSRDQPIFLR LEDYFWVKTP SAYELPYGTK GSEDL L LRVL AITSSSIPKN
IQSLRCRRCV
121 VVGNGHRLRN SSLGDAINKY DVVIRLNNAP VAGYEGDVGS KTTMRLFYPE
SAHFDPKVEN
181 NPD TLLV LVA FKAMDFHWIE TILSDKKRVR KGFWKQPPLI WDVNPKQIRI
LN PFFMEIAA
241 DKLLSLPMQQ PRKIKQKPTT GLLAITLALH LCDLVHIAGF GYPDAYNKKQ
TIHYEQITL
301 KSMAGSGHNV SQEALAIKRM LEMGAIKNLT SF

SEQ ID 4

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

Número de registro NM_003032

Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1

1 ATGATTCACA CCAACCTGAA GAAAAAGTTC AGCTGCTGCG TCCTGGTCTT TCTTCTGTTT

ES 2 693 273 T3

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

Op-

Secuencia de proteína de ST6GAL1

1 MIHTNLKKKF SCCVLVFLLF AVICVWKEKK KGSYYDSFKL QTKEFQVLKS
LGKGLAMGSDS
61 QSVSSSTQD PHRGRQTLGS LRGLAKAKPE ASFQVWNKDS SSKNLI PRLQ
KIWKNYLSMN
121 KYKVS YKGP GPG PGIKFSAEAL RCHLRDHVNV SMVEVTD FPF NTSEWEGYLP
KESIRTKAGP
181 WGRCAVSSA GSLKSSQLGR EIDDHDAVLR FNGAPTANFQ QDVGTKTTIR
LMNSQLVTTE
241 KRFLKDSL YN EGILIVWDPS VYHSDIPK WY QNPDYNFFNN YKTYRKLHPN
QPFYILKPQM
301 PWELWDILQE ISPEEI QPNP PSSGMLGIII MMTLCDQVDI YEFLPSKRKT
DVCYYYQKFF
361 DSACTMGAYH PLYEKNLVK HLNQGTDEDI YLLGKATLPG FRTIHC

5 Lista de secuencias

<110> Universidad de Durham, la Agencia de Investigación en Alimentos y Medio Ambiente (FERA), que representa a la Secretaría de Estado de Medio Ambiente, Alimentos y Asuntos Rurales

<120> Pesticida de toxina de araña

<130> PL401462WO

10 <150> Documento GB1105418.6

<151> 31-03-2011

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

5 <211> 37

<212> PRT

<213> *Hadronyche versuta*

<400> 1

Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu Asn
1 5 10 15

Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn Thr
20 25 30

Val Lys Arg Cys Asp
35

10 <210> 2

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> secuencia de toxina natural modificada

<400> 2

Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu Asn
1 5 10 15

Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn Thr
20 25 30

Val Gln Arg Cys Asp
35

<210> 3

<211> 105

20 <212> PRT

<213> *Galanthus nivalis*

<400> 3

ES 2 693 273 T3

Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu
1 5 10 15

Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val
20 25 30

Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu
35 40 45

Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val
50 55 60

Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln
65 70 75 80

Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile
85 90 95

Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly
100 105

<210> 4

<211> 153

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 4

Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu
1 5 10 15

Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val
20 25 30

Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu
35 40 45

Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val
50 55 60

Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln
65 70 75 80

Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile
85 90 95

ES 2 693 273 T3

Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Cys
 100 105 110

Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu Asn Cys Cys Ser Gln
 115 125

Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn Thr Val Lys Arg Cys
 130 135 140

Asp Val Asp His His His His His His
 145 150

<210> 5

<211> 151

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 5

His His His His His His Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln
 20 25 30

Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala
 35 40 45

Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr
 50 55 60

Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala
 65 70 75 80

Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys
 85 90 95

Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly Ala
 100 105 110

Ala Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn
 115 120 125

Glu Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly
 130 135 140

ES 2 693 273 T3

Asn Thr Val Gln Arg Cys Asp
145 150

<210> 6

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

<400> 6

Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu
1 5 10 15

Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn
20 25 30

Thr Val Lys Arg Cys Asp Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly
35 40 45

Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe
50 55 60

Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro
65 70 75 80

Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser
85 90 95

Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro
100 105 110

Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile
115 120 125

Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala
130 135 140

Thr Gly
145

10 <210> 7

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 693 273 T3

<223> Proteína de fusión

<400> 7

Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu
1 5 10 15

Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn
20 25 30

Thr Val Lys Arg Cys Asp Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly
35 40 45

Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe
50 55 60

Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro
65 70 75 80

Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser
85 90 95

Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro
100 105 110

Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile
115 120 125

Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala
130 135 140

Thr Gly Val Asp His His His His His His
145 150

<210> 8

5 <211> 146

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

10 <400> 8

ES 2 693 273 T3

Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu
1 5 10 15

Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn
20 25 30

Thr Val Gln Arg Cys Asp Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly
35 40 45

Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe
50 55 60

Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro
65 70 75 80

Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser
85 90 95

Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro
100 105 110

Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile
115 120 125

Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala
130 135 140

Thr Gly
145

<210> 9

<211> 152

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 9

ES 2 693 273 T3

Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu
1 5 10 15

Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn
20 25 30

Thr Val Gln Arg Cys Asp Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly
35 40 45

Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe
50 55 60

Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro
65 70 75 80

Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser
85 90 95

Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro
100 105 110

Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile
115 120 125

Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala
130 135 140

Thr Gly His His His His His His
145 150

<210> 10

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 10

ES 2 693 273 T3

Met Arg Phe Pro Ser Phe Leu Leu Leu Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Pro Thr Cys Ile
 85 90 95

Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu Asn Cys Cys Ser Gln Ser
 100 105 110

Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn Thr Val Gln Arg Cys Asp
 115 120 125

Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly
 130 135 140

Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys

<210> 13

<211> 735

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> ácido nucleico para péptido señal fusionado a proteína de fusión

<400> 13

```

atgagatttc cttcattttt actgctggtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt      120
tactcagatt tagaagggga tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat      180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta      240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagctgca gcatctccaa cttgtattcc atctgggtcaa      300
ccatgtccat ataatgaaaa ttgttgttct caatcttgta cttttaaaga aatgaaaat      360
ggtaaactg ttcaaagatg tgatgcggcc gccgacaata ttttgtactc cggtgagact      420
ctctctacag gggaatttct caactacgga agtttcgttt ttatcatgca agaggactgc      480
aatctgggtct tgtacgacgt ggacaagcca atctgggcaa caaacacagg tggctctctcc      540
cgtagctgct tcctcagcat gcagactgat gggaacctcg tgggtgtacaa cccatcgaac      600
aaaccgattt gggcaagcaa cactggaggc caaatggga attacgtgtg catcctacag      660
aaggatagga atgttgtgat ctacggaact gatcgttggg cactggagt ggaccatcat      720
catcatcatc attga                                                                735

```

<210> 14

10 <211> 37

<212> PRT

<213> *Mesobuthus tamulus*

<400> 14

```

Arg Cys Gly Pro Cys Phe Thr Thr Asp Pro Gln Thr Gln Ala Lys Cys
1           5           10           15

Ser Glu Cys Cys Gly Arg Lys Gly Gly Val Cys Lys Gly Pro Gln Cys
          20           25           30

Ile Cys Gly Ile Gln
          35

```

15 <210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido señal GNA

<400> 15

5 Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Leu Gly Val

1

5

10

15

Ile Thr Pro Ser Cys Leu Ser

20

<210> 16

<211> 171

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 16

ES 2 693 273 T3

Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Leu Gly Val
 1 5 10 15

Ile Thr Pro Ser Cys Leu Ser Ala Ala Ala Arg Cys Gly Pro Cys Phe
 20 25 30

Thr Thr Asp Pro Gln Thr Gln Ala Lys Cys Ser Glu Cys Cys Gly Arg
 35 40 45

Lys Gly Gly Val Cys Lys Gly Pro Gln Cys Ile Cys Gly Ile Gln Ala
 50 55 60

Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu
 65 70 75 80

Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn
 85 90 95

Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly
 100 105 110

Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu
 115 120 125

Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly
 130 135 140

Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val
 145 150 155 160

Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly
 165 170

<210> 17

<211> 516

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> ácido nucleico para proteína de fusión

<400> 17

ES 2 693 273 T3

atggctaagg caagtctcct ctttttggcc gccatcttcc ttggtgtcat cacaccatct 60
 tgcctgagtg ctgcagcaag gtgtggtcct tgctttacaa ctgatcctca aacacaagcc 120
 aagtgtagtg agtgttgtgg gcgaaaggtt ggagtatgca agggcccaca atgtatctgt 180
 ggtatacaag cggccgccga caatattttg tactccggtg agactctctc tacaggggaa 240
 tttctcaact acggaagttt cgtttttatc atgcaagagg actgcaatct ggtcttgtac 300
 gacgtggaca agccaatctg ggcaacaaac acaggtggtc tctcccgtag ctgcttcctc 360
 agcatgcaga ctgatgggaa cctcgtggtg tacaacccat cgaacaaacc gatttgggca 420
 agcaacactg gaggccaaaa tgggaattac gtgtgcatcc tacagaagga taggaatggt 480
 gtgatctacg gaactgatcg ttgggctact ggatga 516

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 18

tggtctctcc cgtagctgct t 21

10

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 19

atcgaacaaa ccgattggg 20

20 <210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 20

cggtatgtgt aaggccggat a 21

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de oligonucleótido
<400> 21
acgaccgatg ggaacactgt 20
10
<210> 22
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Secuencia de oligonucleótido
<400> 22
gcatctcaa ctgtattcc atctggtaa ccatgtccat ataataaaaa ttgtgt 57
20 <210> 23
<211> 59
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
25 <223> Secuencia de oligonucleótido
<400> 23
tctcaatctt gtacttttaa agaaaatgaa aatggaata ctgttaaag atgtgatgc 59

<210> 24
30 <211> 40
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de oligonucleótido
35 <400> 24
acgtcgtaga ggtgaacat aagtagacc agttgtaca 40

- <210> 25
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial
- 5 <220>
<223> Secuencia de oligonucleótido
<400> 25
ggtatattac ttttaacaac aagagtaga acatgaaaat tt 42
- 10 <210> 26
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
- 15 <223> Secuencia de oligonucleótido
<400> 26
ctttacttt taccattatg acaatttct acactacgcc gg 42
- <210> 27
- 20 <211> 28
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de oligonucleótido
- 25 <400> 27
taactgcagc atctccaact tgattcc 28
- <210> 28
<211> 28
- 30 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de oligonucleótido
<400> 28
- 35 ttagcgccg catcacatct ttaacag 28

REIVINDICACIONES

1. hCG modificada con polietilenglicol que tiene la fórmula (Ia)

$$(R)_n\text{-X-Y} \qquad \text{(Ia)}$$
 en la que:
 - 5 (R) es un polietilenglicol PEG o un metoxipolietilenglicol (mPEG);
 - n es 2, 3 ó 4;
 - X es un grupo de unión; e
 - Y es hCG.
2. hCG modificada con polietilenglicol según la reivindicación 1, en la que n es 2 ó 4.
- 10 3. hCG modificada con polietilenglicol según cualquier reivindicación anterior, en la que la hCG es hCG recombinante, por ejemplo una hCG recombinante derivada de línea celular humana.
4. hCG modificada con polietilenglicol según cualquier reivindicación anterior, en la que la hCG es una hCG recombinante (rhCG) que incluye α 2,3 y α 2,6-sialilación.
- 15 5. hCG modificada con polietilenglicol según cualquier reivindicación anterior, en la que la hCG es una hCG recombinante que tiene un contenido en ácido siálico [expresado en cuanto a una razón de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 15 mol/mol o más, por ejemplo una hCG recombinante que tiene un contenido en ácido siálico de desde 15 mol/mol hasta 25 mol/mol.
- 20 6. hCG modificada con polietilenglicol según cualquier reivindicación anterior, en la que la hCG es una hCG recombinante que tiene el 10% o más de la sialilación total como α 2,3-sialilación y/o el 50% o menos de la sialilación total como α 2,6-sialilación.
7. hCG modificada con polietilenglicol según cualquier reivindicación anterior, en la que la hCG es una hCG recombinante que tiene del 45% al 80% de la sialilación total como α 2,3-sialilación.
8. hCG modificada con polietilenglicol según cualquier reivindicación anterior, en la que la hCG es una hCG recombinante que tiene del 20% al 55% de la sialilación total como α 2,6-sialilación.
- 25 9. Preparación farmacéutica que comprende una hCG modificada con polietilenglicol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 10. hCG modificada con polietilenglicol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o preparación farmacéutica según la reivindicación 9, en la que un polietilenglicol o un metoxipolietilenglicol (mPEG) o un polímero soluble en agua, sustancialmente no antigénico, se conjuga con un residuo de aminoácido de la hCG.
11. hCG modificada con polietilenglicol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o preparación farmacéutica según la reivindicación 9, en la que un polietilenglicol o un metoxipolietilenglicol (mPEG) o un polímero soluble en agua, sustancialmente no antigénico, se conjuga con el extremo N-aminoterminal o el extremo C-aminoterminal de la hCG.
- 35 12. hCG modificada con polietilenglicol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o preparación farmacéutica según la reivindicación 9, en la que el 90% o más del polietilenglicol o el metoxipolietilenglicol (mPEG) o el polímero soluble en agua, sustancialmente no antigénico, se conjuga con el extremo N-aminoterminal de la hCG.
- 40 13. Composición farmacéutica (opcionalmente para su uso en el tratamiento de la esterilidad) que comprende una hCG modificada con polietilenglicol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ó 10 a 12, una preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, opcionalmente que comprende además FSH y/o LH.

Figuras 1, 2 y 3: Mapas de plásmido de los vectores de expresión de phCGalfa/beta, pST3 y pST6. CMV = promotor de citomegalovirus, BGHp(A) = secuencia de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina, fl ori – origen de replicación de fl, SV40 = promotor del virus del simio 40, Neo = marcador de resistencia a neomicina, Hyg = marcador de resistencia a higromicina, SV40 p(A) = secuencia de poliadenilación del virus del simio 40, hCG α = polipéptido alfa de gonadotropina coriónica humana, hCG β = polipéptido beta de gonadotropina coriónica humana, ST3GAL4 - α 2,3-sialiltransferasa, ST3GAL6 - α 2,6-sialiltransferasa, ColE1 = origen de replicación de ColE1, Amp - marcador de resistencia a ampicilina.

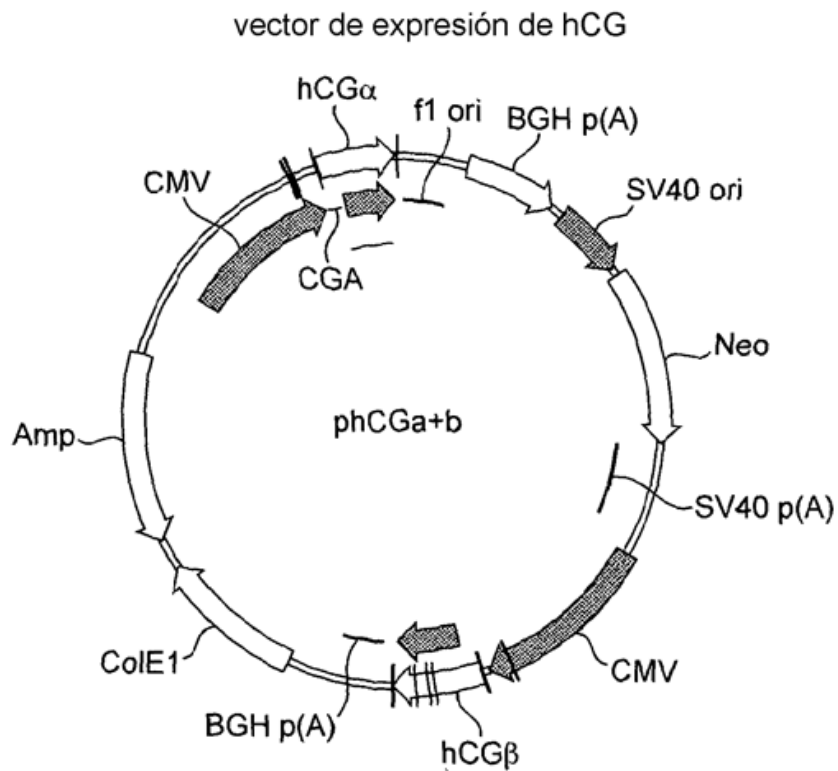


FIG. 1

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

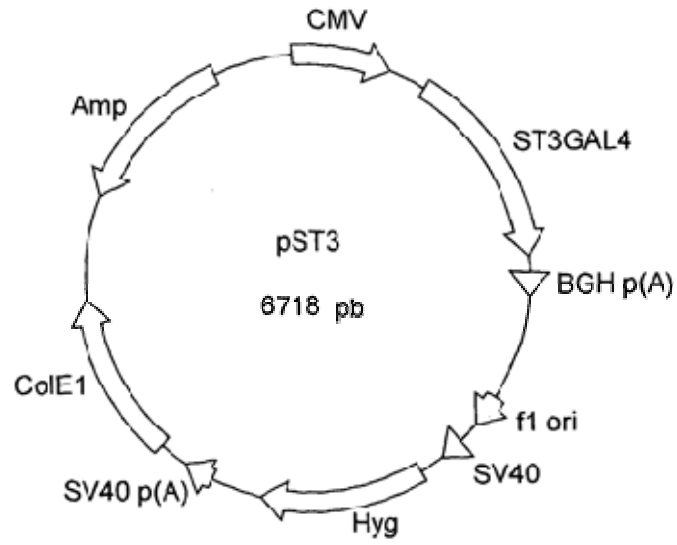


FIG. 2

vector de expresión de $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa (ST6GAL1)

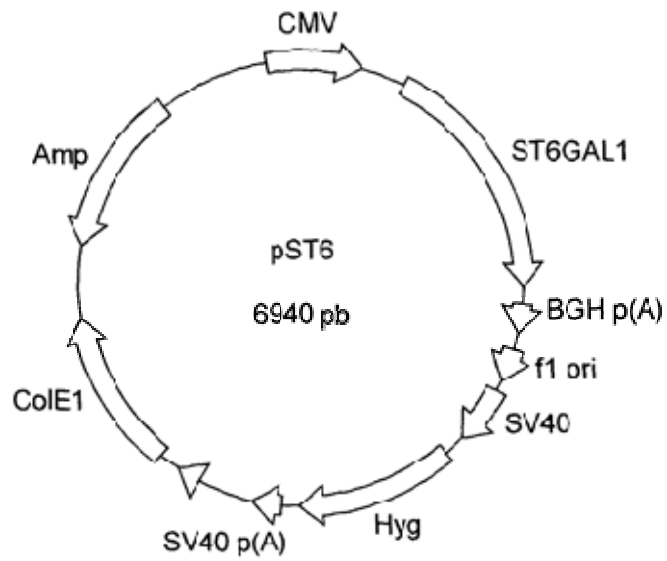


FIG. 3

Figura 4: Detección de isoformas de rhCG mediante IEF teñidas con azul de Coomassie en composiciones según la invención (pista 3, 10 µg, y pista 4, 15 µg) y la composición derivada de CHO de la técnica anterior, Ovitrelle (pista 1, Ovitrelle, 10 µg, y pista 2, Ovitrelle, 15 µg). Las bandas representan isoformas de hCG que contienen diferentes números de moléculas de ácido siálico. La figura 4 indica que las hCG derivadas de líneas celulares humanas modificadas por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa (composiciones según la invención) tienen un perfil más ácido que Ovitrelle.

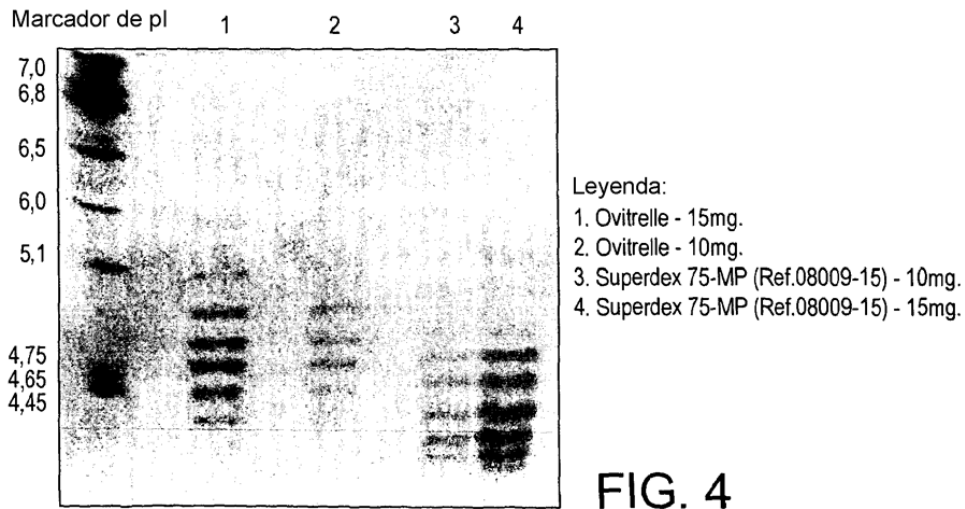


Figura 5: Tasas de aclaramiento metabólico de muestras de rhCG de Per. C6 modificada por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa. Se eligieron las muestras por su contenido en ácido siálico basado en su perfil de IEF. Se les inyectó a ratas hembra (3 animales por clon) en la vena de la cola a tiempo cero un bolo de rhCG (1 - 10 μ g/rata). Se sometieron a ensayo muestras de sangre extraídas a lo largo del tiempo para determinar el contenido en hCG mediante ELISA

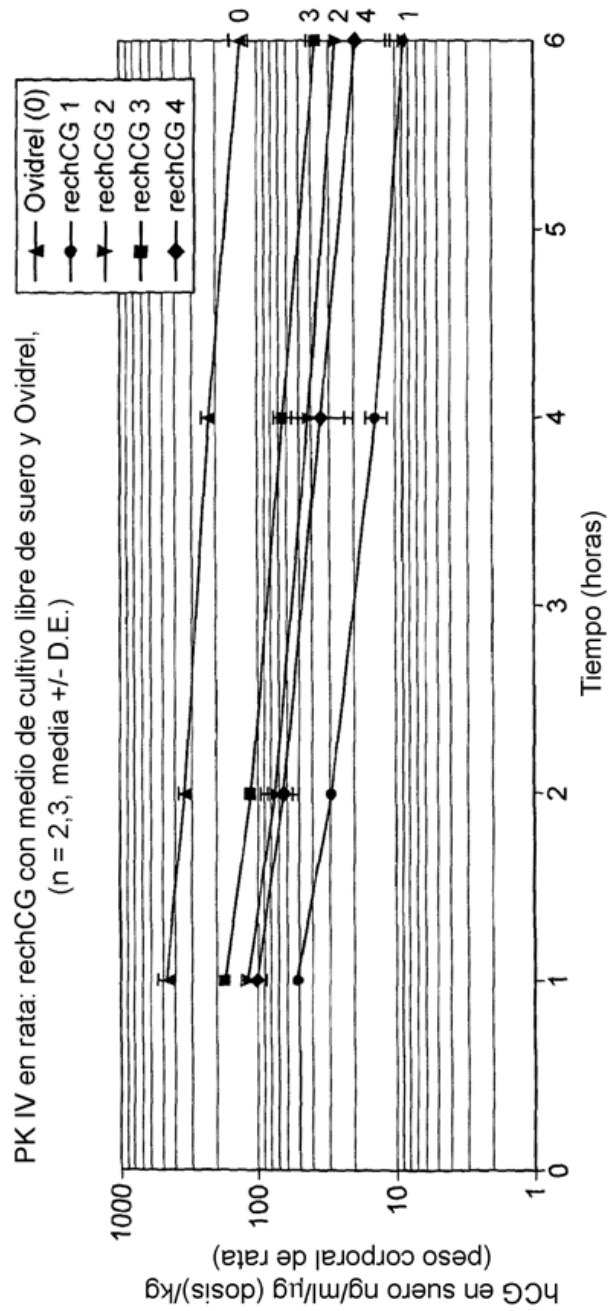


FIG. 5

Figura 6: Tasas de aclaramiento metabólico a largo plazo de muestras de rhCG de Per.C6 modificadas por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa. Se les inyectó a ratas hembra (3 animales por clon) en la vena de la cola a tiempo cero un bolo de rhCG (1 - 10 μ g/rata). Se sometieron a ensayo muestras de sangre extraídas a lo largo del tiempo para determinar el contenido en hCG mediante ELISA

Aclaramiento de hCG 8PD-81-02 08009-15 (del clon 1-G2)
en comparación con Ovitrelle (Serono)

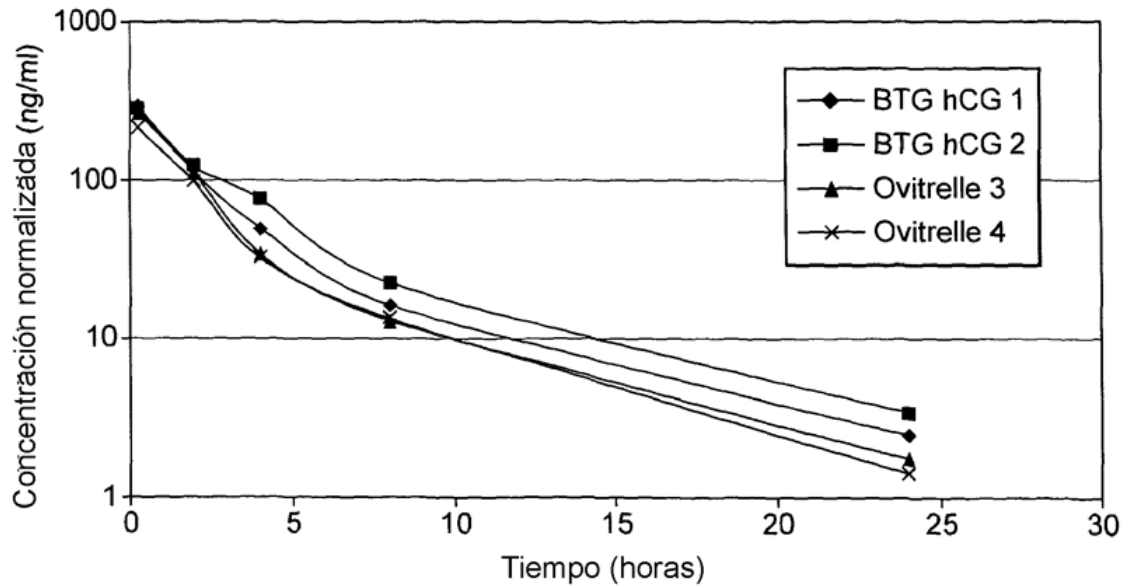


FIG. 6

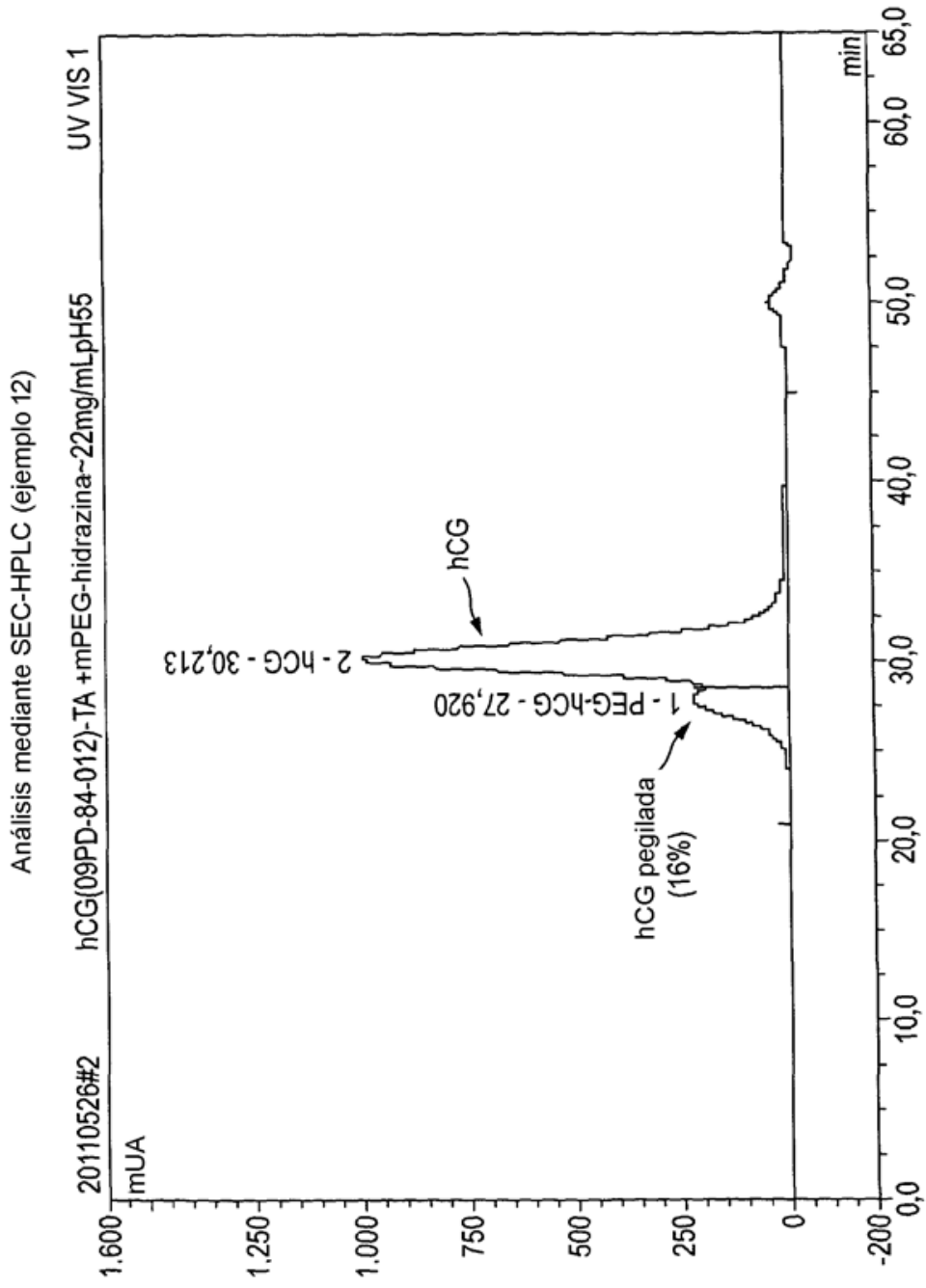


FIG. 7

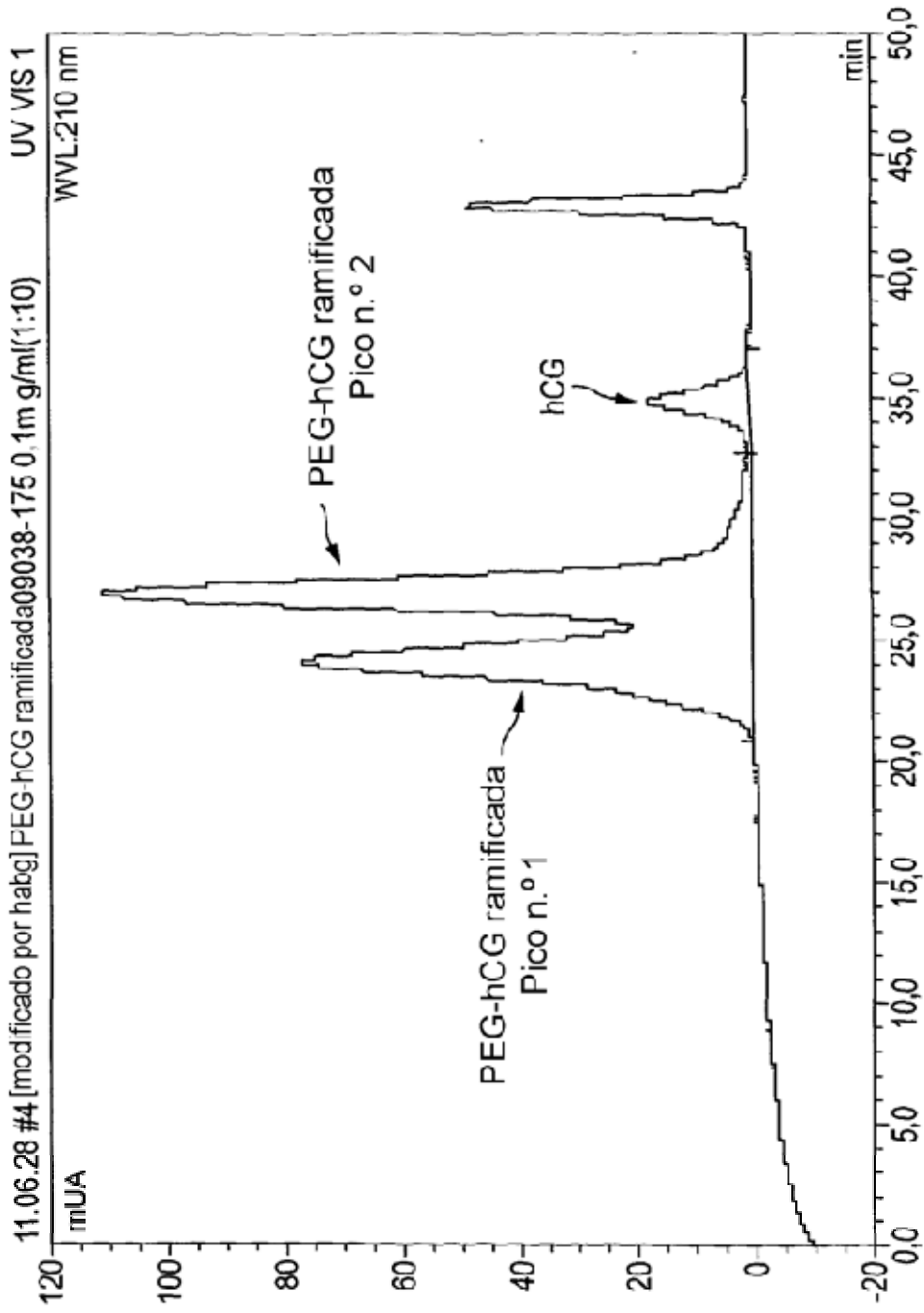


FIG. 8A

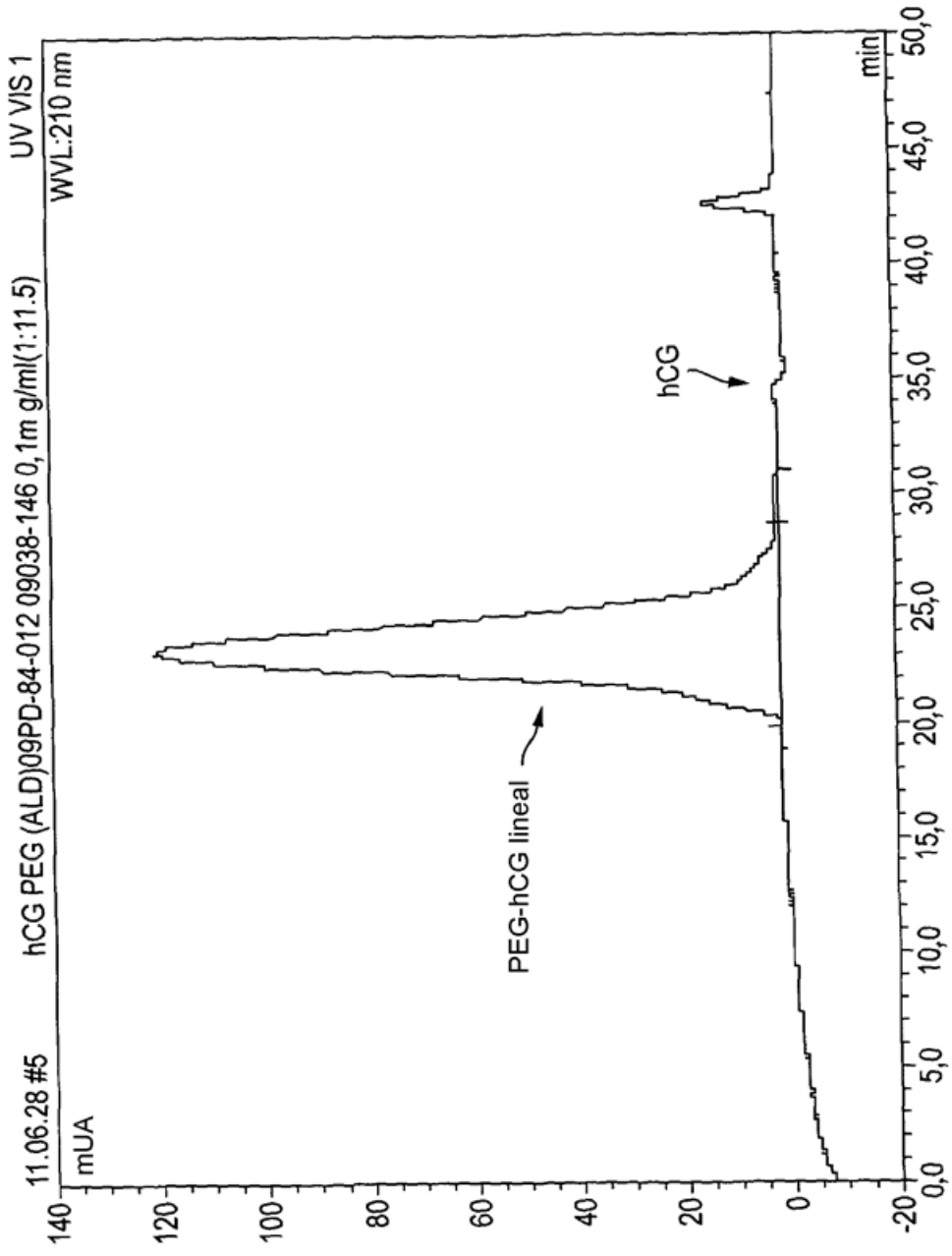


FIG. 8B