

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 258**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/59** (2006.01)

**A61K 38/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2010 PCT/GB2010/001854**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011 WO11042688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2010 E 10763000 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2486051**

54 Título: **Preparación farmacéutica que comprende HCG recombinante**

30 Prioridad:

**05.10.2009 EP 09252360**

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

**10.12.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

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

ES 2 798 258 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 que comprende HCG recombinante

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

5 Las gonadotropinas son un grupo de hormonas de glucoproteínas heterodiméricas que regulan la función gonadal en el hombre y la mujer. Incluyen la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG). La FSH recombinante se conoce por el documento WO2009/127826.

10 La gonadotropina coriónica humana (hCG) es segregada naturalmente por la glándula pituitaria anterior, y funciona para apoyar el desarrollo folicular y la ovulación. La hCG comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos, también común a las otras hormonas glicoproteicas LH y FSH, y una subunidad beta de 145 aminoácidos exclusiva de hCG, que dicta la especificidad de la hormona. Cada subunidad se modifica post-traduccionalmente mediante la adición de restos de hidratos de carbono complejos. La subunidad alfa contiene sitios de glicosilación unidos a 2-N en los aminoácidos 52 y 78, y la subunidad beta contiene sitios de glicosilación unidos a 2-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 durante muchos años en el tratamiento de la infertilidad. La producción de hCG extraída de la orina implica la recogida y el procesamiento de grandes cantidades de orina. Está disponible una versión recombinante de hCG, Ovitrelle (Serono) - véase [https://pdf.hres.ca/dpd\\_pm/00040699.PDF](https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00040699.PDF). Ésta se expresa en células de ovario de hámster chino (CHO). El producto de hCG recombinante conocido tiene un perfil farmacocinético diferente al de hCG producida a partir de orina humana. Es deseable tener un producto hCG que se replique más o imite el perfil farmacocinético del producto producido a partir de orina humana. Los productos que incluyen FSH y hCG se conocen por el documento WO2004105788.

20 Existe una considerable heterogeneidad asociada con las preparaciones de hCG, que se relaciona con las diferencias en las cantidades de diversas isoformas presentes. Las isoformas de hCG individuales exhiben secuencias de aminoácidos idénticas pero difieren en la medida en que se modifican post-traduccionalmente; las isoformas particulares se caracterizan por la heterogeneidad de las estructuras de las ramas de hidratos de carbono y por la incorporación de diferentes cantidades de ácido siálico (un azúcar terminal), que parecen influir en la bioactividad específica de la isoforma.

25 La glicosilación de hCG natural es altamente compleja. Los glicanos en la hCG pituitaria derivada naturalmente pueden contener una amplia gama de estructuras que pueden incluir combinaciones de glicanos bi-, tri- y tetra-antenarios. Los glicanos pueden llevar modificaciones adicionales: fucosilación central, glucosamina bisecante, cadenas extendidas con acetil lactosamina, sialilación parcial o completa, sialilación con enlaces  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$ , y galactosamina sulfatada sustituida por galactosa. Además, existen diferencias entre las distribuciones de las estructuras de glicanos en los sitios de glicosilación individuales. HARD K ET AL, EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 1992 DE, (1992), vol. 205, no. 2, ISSN 0014-2956, páginas 785 – 798, y KESSLER M J ET AL, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1979), vol. 254, no. 16, ISSN 0021-9258, páginas 7909 - 7914, XP002563495 [X] 1,9,11-15,17, explican la estructura de elementos de hCG.

30 La glicosilación de los productos de hCG recombinante ("rhCG") refleja el intervalo de glicosil-transferasas presentes en la línea celular hospedante. El producto de rhCG existente, Ovitrelle, deriva de las células de ovario de hámster chino (células CHO) manipuladas genéticamente. El intervalo de modificaciones de glicanos en rhCG derivada de CHO es más limitado que los encontrados en los productos naturales, derivados de la orina. Los ejemplos de la heterogeneidad reducida de glicanos que se encuentra en la rhCG derivada de CHO incluyen la falta de glucosamina bisecante y un contenido reducido de fucosilación central y extensiones de acetil lactosamina. Además, las células CHO solo pueden añadir ácido siálico usando el enlace  $\alpha 2,3$  (Kagawa et al, 1988, Takeuchi et al, 1988, Svensson et al., 1990). Esto es diferente de la hCG producida naturalmente que contiene glicanos con una mezcla de ácido siálico enlazado mediante  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$ .

35 Se ha demostrado que una preparación de FSH recombinante (Organon) difiere en las cantidades de FSH con un punto isoeléctrico (pI) por debajo de 4 (consideradas las isoformas ácidas) en comparación con la FSH de pituitaria, de suero o de orina post-menopáusica (Ulloa-Aguirre et al. 1995). La cantidad de isoformas ácidas en las preparaciones urinarias de FSH fue mucho mayor en comparación con los productos recombinantes, Gonal-f (Serono) y Puregon (Organon) (Andersen et al. 2004). Esto debe reflejar un menor contenido molar de ácido siálico en rFSH, ya que el contenido de glicano cargado negativamente modificado con sulfato es bajo en FSH. El menor contenido de ácido siálico, en comparación con la FSH natural, es una característica de ambos productos de FSH disponibles en el mercado, y por lo tanto debe reflejar una limitación en el proceso de fabricación (Bassett y Driebergen, 2005). El tiempo de vida circulatorio de la FSH ha sido documentado para materiales de una variedad de fuentes. Algunos de estos materiales se han fraccionado en función de la carga molecular global, caracterizada por su pI, en la que más ácido equivale a una carga negativa más alta. El principal contribuyente a la carga molecular general es el contenido siálico total de cada molécula de FSH. Por ejemplo, rFSH (Organon) tiene un contenido de ácido siálico de alrededor de 8

mol/mol, mientras que la FSH derivada de orina tiene un mayor contenido de ácido siálico (de Leeuw et al. 1996). Las tasas de aclaramiento plasmático correspondientes en la rata son 0,34 y 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre et al. 2003). En otro ejemplo en el que una muestra de FSH recombinante se dividió en fracciones de pl alto y bajo, la potencia in vivo de la fracción de pl alto (menor contenido de ácido siálico) disminuyó y tuvo una vida media plasmática más corta (D'Antonio et al. 1999). Los solicitantes han descubierto que, de forma similar a la FSH, el producto de hCG recombinante conocido, derivado de CHO (por ejemplo Ovitrelle), también tiene una menor cantidad de hCG con un punto isoeléctrico (pI) inferior a 4 (consideradas las isoformas ácidas) que la hCG urinaria, lo que también refleja un menor contenido de ácido siálico del producto de rhCG conocido en comparación con la hCG urinaria.

El contenido total de ácido siálico de hCG y rhCG no es directamente comparable, ya que los ácidos siálicos se enlazan comúnmente de dos maneras. La hCG hipofisaria/sérica/urinaria contiene ácido siálico enlazado tanto  $\alpha$ 2,3 como  $\alpha$ 2,6, con predominio del primero. Sin embargo, los recombinantes derivados de células CHO solo contienen  $\alpha$ 2,3 (Kagawa et al, 1988, Takeuchi et al, 1988, Svensson et al., 1990). En otras palabras, las proteínas recombinantes expresadas usando el sistema CHO diferirán de sus contrapartes naturales en su tipo de enlaces terminales de ácido siálico. Esta es otra diferencia entre los productos naturales y los recombinantes actuales, además del menor contenido general de ácido siálico 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.

El documento WO2005080585 describe la producción de glicoproteínas. El documento WO03/038100 describe la producción de proteínas. El documento WO2005/076013 describe un método para seleccionar anticuerpos específicos de glicofomas.

Por lo tanto, es deseable tener un producto de rhCG que se replique más o imite el perfil fisicoquímico y farmacocinético del producto producido a partir de la orina humana. Es deseable tener un producto de rhCG que tenga una propiedad farmacocinética mejorada o propiedades comparadas con el producto recombinante conocido.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de producción de hCG recombinante ("rhCG" o "rechCG") que incluye sialilación  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6, que comprende una etapa de producción o expresión de la rhCG en una línea celular Per.C6, en el que la línea celular Per.C6 se ha modificado para sobreexpresar  $\alpha$ 2,3sialiltransferasa.

Los solicitantes han desarrollado una hCG recombinante derivada del ser humano que tiene un perfil más ácido que el producto derivado de CHO, Ovitrelle, y que tiene un mayor contenido de ácido siálico. La investigación de los solicitantes indica que el tipo de enlace de ácido siálico,  $\alpha$ 2,3 o  $\alpha$ 2,6, puede tener una influencia drástica en el aclaramiento biológico de hCG. Las líneas celulares humanas, a diferencia de las líneas celulares CHO, pueden expresar hCG recombinante con ácidos siálicos unidos por enlaces tanto  $\alpha$ 2,3 como  $\alpha$ 2,6.

La hCG recombinante con una mezcla de ácido siálico enlazado  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 se realizó mediante ingeniería de una línea celular humana para expresar tanto rhCG como  $\alpha$ 2,3 sialiltransferasa (Ejemplos 4, 5a y 5b). El producto expresado es altamente ácido, y posee una mezcla de ácidos siálicos enlazados tanto  $\alpha$ 2,3 como  $\alpha$ 2,6; estos últimos proporcionados por la actividad de sialiltransferasa endógena. Esto tiene dos ventajas sobre la rhCG expresada en las células CHO convencionales: primero, el material está mucho más sialilado debido a las actividades combinadas de las dos sialiltransferasas; y en segundo lugar, el material se parece más a la hCG natural. Es probable que esto sea más biológicamente apropiado en comparación con los productos recombinantes derivados de células CHO que han producido solo ácido siálico enlazado  $\alpha$ 2,3 y tienen un contenido de ácido siálico disminuido.

Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que la rhCG producida por los métodos de acuerdo con la invención puede replicar o imitar más estrechamente el perfil fisicoquímico y farmacocinético del producto urinario humano natural que otros productos recombinantes. En otras palabras, la rhCG de la invención puede estar más cerca de 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, que puede desear que la terapia, aunque en un sentido artificial, sea lo más "natural" posible. Puede haber otras ventajas (por ejemplo, ventajas farmacocinéticas) en un producto de hCG recombinante que tiene una estructura de hidratos de carbono (por ejemplo, glicano) que está más cerca de la hCG natural (por ejemplo, urinaria humana) que otros productos recombinantes.

De este modo, la invención es un método de producción de una versión recombinante de hCG que posee una mezcla de ácido siálico  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6, y por lo tanto se parece más a la hCG natural. Se espera que el uso de este compuesto para la estimulación ovárica controlada, en las técnicas de FIV, y la inducción de la ovulación produzca una estimulación más natural del ovario en comparación con los productos recombinantes existentes.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de producción de hCG recombinante ("rhCG" o "rechCG") que incluye la sialilación  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6, que comprende una etapa de producción o expresión de la rhCG en una línea celular Per.C6, en el que la línea celular Per.C6 se ha modificado para sobreexpresar  $\alpha$ 2,3sialiltransferasa. La rhCG producida por los métodos de acuerdo con la invención puede incluir opcionalmente además sialilación  $\alpha$ 2,8.

La rhCG producida por los métodos de acuerdo con la invención puede estar presente como una isoforma única o como una mezcla de isoformas.

5 La rhCG producida por los métodos de acuerdo con la invención puede tener un contenido de ácido siálico [expresado en términos de una relación de moles de ácido siálico a moles de proteína] de 15 mol/mol o más (Ejemplo 8), por ejemplo de 15 mol/mol a 25 mol/mol, por ejemplo de 17 mol/mol a 24 mol/mol, por ejemplo de 17,7 mol/mol a 23 mol/mol, por ejemplo de 18 mol/mol a 22 mol/mol, por ejemplo de 19 mol/mol a 21 mol/mol, por ejemplo de 19 mol/mol a 20 mol/mol.

10 La rhCG producida por los métodos de acuerdo con la invención puede tener un 10% o más de la sialilación total que es  $\alpha$ 2,3-sialilación. Por ejemplo, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 o 90% o más de la sialilación total puede ser  $\alpha$ 2,3-sialilación. La rhCG puede incluir  $\alpha$ 2,3-sialilación en una cantidad que es de 45% a 80% de la sialilación total, por ejemplo 50% a 70% de la sialilación total, por ejemplo 55 a 65% de la sialilación total. La rhCG puede incluir  $\alpha$ 2,3-sialilación en una cantidad que es de 65 a 85% de la sialilación total, por ejemplo de 70 a 80% de la sialilación total, por ejemplo de 71 a 79% de la sialilación total. La rhCG producida por los métodos de acuerdo con la invención puede tener un 50% o menos de la sialilación total que es  $\alpha$ 2,6-sialilación. Por ejemplo, 45, 40, 30, 20, 10, 5% o menos de la sialilación total puede ser  $\alpha$ 2,6-sialilación. La rhCG puede incluir  $\alpha$ 2,6-sialilación en una cantidad que es de 20-55% de la sialilación total, por ejemplo 30-50% de la sialilación total, por ejemplo 35-45% de la sialilación total. La rhCG puede incluir  $\alpha$ 2,6-sialilación en una cantidad que es de 15 a 35% de la sialilación total, por ejemplo de 20 a 30% de la sialilación total, por ejemplo de 21 a 29% de la sialilación total. La rhCG producida por los métodos de acuerdo con la invención puede tener un 5% o menos de la sialilación total que es  $\alpha$ 2,8-sialilación. Por ejemplo, el 2,5% o menos de la sialilación total puede ser  $\alpha$ 2,8-sialilación. La rhCG puede incluir  $\alpha$ 2,8-sialilación en una cantidad que es de 0 a 4% de la sialilación total, por ejemplo 0,1 a 4% de la sialilación total, por ejemplo de 0,5 a 3% de la sialilación total, por ejemplo de 0,5 a 2,5% de la sialilación total. La rhCG de la invención puede no tener  $\alpha$ 2,8-sialilación. Por sialilación se entiende la cantidad de restos siálicos presentes en las estructuras de hidratos de carbono de hCG.  $\alpha$ 2,3-sialilación significa sialilación en la posición 2,3 (como es bien sabido en la técnica), y  $\alpha$ 2,6 sialilación en la posición 2,6 (también conocida en la técnica). Así, “% de la sialilación total puede ser  $\alpha$  2,3 sialilación” se refiere al % del número total de restos de ácido siálico presentes en la hCG que están sialilados en la posición 2,3. La expresión “% de la sialilación total que es  $\alpha$ 2,6-sialilación” se refiere al % del número total de restos de ácido siálico presentes en la hCG que están sialilados en la posición 2,6.

30 La rhCG producida por los métodos de acuerdo con la invención puede tener un contenido de ácido siálico (cantidad de sialilación por molécula de hCG) de (basado en la masa de proteína, en lugar de la masa de proteína más hidrato de carbono) de 6% o mayor (por ejemplo, entre 6% y 15%, por ejemplo entre 7% y 13%, por ejemplo entre 8% y 12%, por ejemplo entre 11% y 15%, por ejemplo entre 12% y 14%) en masa.

La hCG recombinante expresada en células de ovario de hámster chino (CHO) incluye exclusivamente la sialilación  $\alpha$  2,3.

35 La rhCG de la invención se produce o expresa en una línea celular humana. Esto puede simplificar (y hacer más eficiente) el método de producción, debido a que la manipulación y el control de, por ejemplo, el medio de crecimiento celular para retener la sialilación puede ser menos crítico que con los procesos conocidos. El método también puede ser más eficiente debido a que hay menos rhCG básica producida que en la producción de productos de rhCG conocidos; se produce más rhCG ácida, y la separación/eliminación de hCG básica es menos problemática. La rhCG se produce o expresa en una línea celular Per.C6 modificada para sobreexpresar  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa. La rhCG puede incluir ácidos siálicos enlazados  $\alpha$ 2,6 (sialilación  $\alpha$ 2,6) proporcionados por la actividad de la sialiltransferasa endógena [de la línea celular]. Alternativa o adicionalmente, la línea celular puede modificarse usando  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa.

45 La estructura de rhCG (producida por los métodos de acuerdo con la invención) contiene restos de glicano. La ramificación puede ocurrir con el resultado de que el glicano puede tener 1, 2, 3, 4 o más restos de azúcar terminales o “antenas”, como es bien conocido en la técnica. La rhCG producida por los métodos de acuerdo con la invención puede tener glicanos con presencia de sialilación en estructuras mono-anténarias y/o di-anténarias y/o tri-anténarias y/o tetra-anténarias. Preferiblemente, la hCG recombinante producida por métodos de acuerdo con la invención incluye estructuras mono(1S), di(2S), tri(3S) y tetra(4S) sialiladas. Preferiblemente, las cantidades relativas de estructuras sialiladas están en las siguientes relaciones (1S:2S:3S:4S):0,2-1%:35-40%:2,5-7%:0,5-1% (por ejemplo, como se muestra en el análisis WAX de glicanos cargados, como se establece en el Ejemplo 8 D).

Una composición farmacéutica puede comprender rhCG producida por métodos de acuerdo con la invención (por ejemplo, como se establece anteriormente). La composición farmacéutica puede comprender además FSH y/o LH.

55 La FSH se puede obtener por cualquier medio conocido en la técnica. La FSH como se usa en el presente documento incluye FSH derivada de humanos y recombinante. La FSH derivada del ser humano se puede purificar de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina) mediante cualquier método conocido en la técnica. La FSH puede ser FSH

recombinante - por ejemplo expresada en una línea celular humana. Los métodos de expresión y purificación de FSH recombinante son bien conocidos en la técnica.

5 La LH se puede obtener por cualquier medio conocido en la técnica. LH, como se usa en este documento, incluye LH derivada de seres humanos y recombinante. La LH derivada del ser humano se puede purificar de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina) mediante cualquier método conocido en la técnica. Los métodos para expresar y purificar LH recombinante son conocidos en la técnica.

10 La composición farmacéutica puede ser para el tratamiento de infertilidad, por ejemplo para uso en, por ejemplo, tecnologías 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 composición farmacéutica se puede formular en composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parche), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraesternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, ungüentos o gotas), o como una pulverización bucal o nasal. Una composición típica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una disolución acuosa, excipientes no tóxicos, que incluyen sales y conservantes, amortiguadores, y similares, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences decimoquinta edición (Matt Publishing Company, 1975), en las páginas 1405 a 1412 y 1461 - 87, y national formulary XIV decimocuarta edición (American Pharmaceutical Association, 1975), entre otros.

20 Los ejemplos de vehículos, 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 las mismas, aceites vegetales (tal como el aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo.

25 Las composiciones también pueden contener aditivos tales como, pero no se limitan a, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, y agentes dispersantes. Se pueden incluir agentes antibacterianos y antifúngicos para prevenir el crecimiento de microbios, e incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Además, puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares.

30 En algunos casos, para efectuar una acción prolongada, es deseable ralentizar la absorción de hCG (y otros ingredientes activos, si están presentes) de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción de hCG depende entonces de su velocidad de disolución, que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de combinación de hCG administrada parenteralmente se logra disolviendo o suspendiendo la combinación de hCG en un vehículo oleoso.

35 Las formas de depósito inyectables pueden prepararse formando matrices de microcápsulas de la hCG (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de hCG a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación de hCG. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polivinilpirrolidona, poli(ortoésteres), poli(anhídridos), etc. Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando la hCG en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

40 Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Las formulaciones inyectables se pueden suministrar en cualquier recipiente adecuado, por ejemplo vial, jeringa precargada, cartuchos de inyección, y similares.

45 Las formulaciones inyectables se pueden suministrar como un producto que tiene composiciones farmacéuticas que contienen hCG (opcionalmente con FSH, LH, etc.). Si hay más de un ingrediente activo (es decir, hCG y, por ejemplo, FSH o LH), éstos pueden ser adecuados para la administración por separado o en conjunto. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto se puede suministrar en cualquier envase apropiado. Por ejemplo, un producto puede contener varias jeringas precargadas que contienen hCG, FSH, o una combinación de FSH y hCG, las jeringas envasadas en un envase de blíster u otro medio para mantener la esterilidad. Un producto puede contener opcionalmente instrucciones para usar las formulaciones de hCG y FSH.

55 El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con la práctica habitual en este campo. Véase GOODMAN y GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICES, 7ª ed. En una realización preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para administración parenteral. Los métodos generales para la preparación de las formulaciones parenterales se conocen en la técnica, y se describen en REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, más arriba, en las páginas 780-820. Las composiciones parenterales se pueden suministrar en formulación líquida o como un sólido que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de la administración.

En una realización especialmente preferida, las composiciones parenterales se suministran en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación.

Descripción detallada de la invención

5 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 plasmídico del vector de expresión de phCGalfa/beta;

la Figura 2 muestra el vector de expresión de  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4);

la Figura 3 muestra el vector de expresión de  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1);

10 la Figura 4 muestra la detección de isoformas de rhCG en preparaciones de hCG recombinantes derivadas de la línea celular humana según la invención (pistas 3, 4) por IEF teñido con azul de Coomassie, en comparación con las preparaciones de la técnica anterior (pistas 1, 2);

la Figura 5 muestra los índices de depuración metabólica (MCRs) de muestras de hCG derivadas de Per.C6 manipuladas mediante  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa; y

15 la Figura 6 muestra los MCRs a largo plazo de las muestras de rhCG derivadas de Per.C6 manipuladas mediante  $\alpha$ 2,3 sialiltransferasa.

Selección de secuencias

hCG humana

20 La región codificante del gen para el polipéptido de hCG alfa se utilizó de acuerdo con Fiddes y Goodman (1979). La secuencia está almacenada como AH007338, y en el momento de la construcción no había otras variantes de esta secuencia proteica. La secuencia se denomina aquí como SEQ ID 1.

La región codificante del gen para el polipéptido de hCG beta se usó de acuerdo con Fiddes y Goodman (1980). La secuencia está almacenada como NP\_000728, y es consistente con las secuencias proteicas de CGbeta3, CGbeta5 y CGbeta7. La secuencia se denomina aquí como SEQ ID 2.

Sialiltransferasa

25  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa - la región codificante del gen para beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 ( $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa, ST3GAL4) se utilizó de acuerdo con Kitagawa y Paulson (1994). La secuencia está almacenada como L23767, y se denomina aquí como SEQ ID 3.

30  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa - la región codificante del gen para la beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 ( $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa, ST6GAL1) se utilizó de acuerdo con Grundmann et al. (1990). La secuencia está almacenada como NM\_003032, y se denomina aquí como SEQ ID 4.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1 Construcción del vector de expresión de hCG**

35 La secuencia codificante del polipéptido de hCG alfa (AH007338, SEQ ID 1) y del polipéptido de hCG beta (NP\_000728, SEQ ID 2) se amplificaron 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'

40 El ADN de hCG beta amplificado resultante se digirió 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 porta un marcador de selección de neomicina. De manera similar, el ADN de hCG alfa se digirió con *BamHI* y *NheI*, y se insertó en los sitios *BamHI* y *NheI* en el vector de expresión que ya contenía el ADN del polipéptido de hCG beta.

45 El ADN vectorial se usó para transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Se seleccionaron las colonias para la amplificación y, del número que incluía el vector que contenía tanto hCG alfa como beta, se seleccionaron veinte para la

secuenciación. Todas las colonias seleccionadas para la secuenciación contenían las secuencias correctas de acuerdo con la SEQ ID 1 y la SEQ ID 2. Se seleccionó phCG A+B plasmídica para la transfección (Figura 1).

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

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

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'

2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

10 El ADN de ST3 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *A*fII, y se insertó en los sitios *Bam*HI y *A*fII en el vector de expresión de mamífero dirigido por CMV que portaba un marcador de resistencia a la higromicina. El vector se amplificó como se describió y secuenció previamente. El clon pST3#1 (Figura 2) contenía la secuencia correcta de acuerdo con la SEC ID 3, y se seleccionó para la transfección.

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

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

15 2,6STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3'

2,6STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3'

20 El ADN de ST6 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *A*fII, y se insertó en los sitios *Bam*HI y *A*fII en el vector de expresión de mamífero dirigido por CMV que portaba un marcador de resistencia a la higromicina. El vector se amplificó como se describió y secuenció previamente. El clon pST6#11 (Figura 3) contenía la secuencia correcta de acuerdo con la SEC ID 4 y se seleccionó para la transfección.

**Ejemplo 4 Expresión estable de phCG A+B en células PER.C6. Aislamiento de la transfección y cribado de clones.**

Los clones de Per.C6 que producen hCG se generaron expresando ambas cadenas de polipéptidos de hCG a partir de un solo plásmido (véase el Ejemplo 1).

25 Para obtener clones estables, se usó un agente de transfección basado en liposomas con el constructo de phCG A+B. Se seleccionaron clones estables en medio de selección de Per.C6 suplementado con 10% de FCS y que contiene G418. Tres semanas después de la transfección, crecieron los clones resistentes a G418. Se seleccionó un total de 389 clones para el aislamiento. Los clones aislados se cultivaron en medio de selección hasta 70-80% de confluencia. Los sobrenadantes se analizaron para determinar el contenido de proteína de hCG usando un ELISA selectivo de hCG, y la actividad farmacológica en el receptor de hCG en la línea celular clonada, usando un ensayo de acumulación de AMPc. Los clones (118) que expresan proteína funcional se hicieron progresar para la expansión del cultivo en placas de 24 pocillos, 6 pocillos y matraces T80.

35 Se iniciaron estudios para determinar la productividad y la calidad del material de 47 clones en matraces T80 para generar material suficiente. Las células se cultivaron en medios suplementados como se describió previamente, durante 7 días, y se recogió el sobrenadante. La productividad se determinó usando el ELISA selectivo de hCG. Se determinó el perfil isoeléctrico del material (usando el método descrito en el Ejemplo 6). La información del IEF se utilizó para seleccionar clones para el análisis del índice de depuración metabólica. Se seleccionaron clones con suficiente productividad y calidad para la ingeniería mediante sialiltransferasa.

40 **Ejemplo 5a El nivel de sialilación aumenta en las células que sobreexpresan  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa. Expresión estable de pST3 en células PER.C6 que expresan hCG; aislamiento de la transfección y cribado de clones.**

45 Los clones de Per.C6 que producen hCG altamente sialilada se generaron expresando  $\alpha$ 2,3 sialiltransferasa a partir de plásmidos separados (véase el Ejemplo 2) en células Per.C6 que ya expresan ambas cadenas polipeptídicas de hCG (véase el Ejemplo 4). Los clones producidos a partir de células PER.C6@ como se expone en el Ejemplo 4 se seleccionaron por sus características que incluyen productividad, buen perfil de crecimiento, producción de proteína funcional, y produjeron hCG que incluía algo de sialilación.

Se generaron clones estables como se describió previamente en el Ejemplo 4. Los clones del programa de  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa se aislaron, se expandieron y se analizaron. El número final de clones para el estudio de  $\alpha$ 2,3 fue cinco. Los clones de  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa se adaptaron a medios libres de suero y condiciones de suspensión.

50 Como antes, los clones se ensayaron usando un ELISA selectivo de hCG, respuesta funcional en una línea celular de receptor de hCG, IEF (Ejemplo 6). También se evaluaron para determinar el índice de depuración metabólica (Ejemplo

9) y el Bioensayo de hCG de USP (Ejemplo 10). Los resultados se compararon con una hCG recombinante disponible comercialmente (Ovitrelle, Serono) y la hCG parental de líneas celulares Per.C6. En los Ejemplos y Figuras se muestran muestras representativas.

5 En conclusión, la expresión de hCG junto con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa en células Per.C6 da como resultado niveles aumentados de hCG sialilada en comparación con las células que expresan hCG solamente.

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

10 El heterodímero alfa beta producido anteriormente (Ejemplo 4) tenía un bajo nivel de sialilación que daba como resultado un perfil de IEF muy básico. Como se indicó anteriormente (Ejemplo 5a), la expresión de hCG junto con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa en las células Per.C6 da como resultado niveles aumentados de hCG sialilada, en comparación con las células que expresan hCG solamente.

15 Se llevó a cabo una doble transfección de los genes de las subunidades alfa y beta de hCG junto con el gen de la enzima  $\alpha$ 2,3 sialiltransferasa en células Per.C6 en un formato de cultivo celular en suspensión. Las líneas celulares se generaron co-transfectando el vector hCG (alfa/beta dual, Ejemplo 1) y el vector que codifica la  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (Ejemplo 2), en condiciones libres de suero. Los clones producidos a partir de células PER.C6® se seleccionaron por sus características que incluyen productividad, buen perfil de crecimiento, producción de proteína funcional, y produjeron hCG que incluía algo de sialilación. Los clones se aislaron, se expandieron y se analizaron.

20 Como antes, los clones se analizaron usando un ELISA selectivo de hCG, respuesta funcional en una línea celular de receptor de hCG, IEF (Ejemplo 6). También se evaluaron para determinar el índice de depuración metabólica (Ejemplo 9) y el Bioensayo de hCG de USP (Ejemplo 10). Los resultados se compararon con una hCG recombinante disponible comercialmente (Ovitrelle, Serono) y la hCG parental de líneas celulares Per.C6. En los Ejemplos y Figuras (véanse los Ejemplos 6, 9, 10, las Figuras 4 y 5) se muestran muestras representativas. La hCG recombinante producida por los clones (es decir, la hCG recombinante producida por los métodos de acuerdo con la invención) ha mejorado significativamente la sialilación (es decir, en promedio, más isoformas de hCG con un alto número de ácidos siálicos), en comparación con la hCG expresada sin  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa y con Ovitrelle (véanse los Ejemplos 6 y 8, Fig. 4).

#### **25 Ejemplo 6 Análisis del punto isoeléctrico pI de isoformas de hCG producidas por Per.C6 mediante enfoque isoeléctrico.**

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

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

35 Los puntos isoeléctricos de las isoformas de hCG producidas por Per.C6 en sobrenadantes de cultivo celular se analizaron usando enfoque isoeléctrico. Los medios de cultivo celular de clones de hCG de Per.C6 se produjeron como se describe en el Ejemplo 4, 5a y 5b.

40 Las muestras de hCG de Per.C6 se separaron en geles Novex® IEF que contenían poliacrilamida al 5% en condiciones nativas en un gradiente de pH 3,0 – 7,0 en una disolución de anfolito pH 3,0 – 7,0. Las proteínas se visualizaron usando tinción con Azul de Coomassie, usando métodos bien conocidos en la técnica.

45 La Figura 4 muestra la detección de isoformas de rhCG por IEF teñidas con Azul de Coomassie en composiciones de acuerdo con la invención (Pista 3, 10  $\mu$ g, y Pista 4, 15  $\mu$ g) y la composición derivada de CHO de la técnica anterior, Ovitrelle (Pista 1, Ovitrelle, 10  $\mu$ g, y Pista 2, Ovitrelle, 15  $\mu$ g). Las bandas representan isoformas de hCG que contienen diferentes números de moléculas de ácido siálico. Usando este método, se identificaron clones que producen isoformas de hCG con un mayor número de moléculas de ácido siálico. La Figura 4 indica que las hCG recombinantes derivadas de la línea celular humana diseñadas con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (composiciones producidas por métodos de acuerdo con la invención) tienen un perfil más ácido que Ovitrelle.

#### **Ejemplo 7 Análisis de los enlaces de ácido siálico de hCG de Per.C6**

50 Los glicoconjugados se analizaron usando un método de diferenciación de glicanos basado en lectina. Con este método se pueden caracterizar las glicoproteínas y los glicoconjugados unidos a la nitrocelulosa. Las lectinas reconocen selectivamente un resto particular, por ejemplo ácido siálico enlazado mediante  $\alpha$ 2,3. Las lectinas aplicadas se conjugan con el hapteno esteroideo digoxigenina, que permite la detección inmunológica de las lectinas unidas.

La hCG de Per.C6 purificada procedente de un clon parental (sin sialiltransferasa adicional) y un clon modificado con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa se separaron usando técnicas de SDS-PAGE estándar. Se usó como patrón una hCG recombinante disponible comercialmente (Ovitrelle, Serono).

5 El ácido siálico se analizó usando el kit de diferenciación de glicanos DIG (nº de cat. 11 210 238 001, Roche) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones positivas con aglutinina de Sambucus nigra (SNA) indicaron ácido siálico enlazado terminalmente (2-6). Las reacciones positivas con aglutinina II de Maackia amurensis (MAA) indicaron ácido siálico enlazado terminalmente ( $\alpha$ 2-3).

10 En resumen, el clon parental contenía niveles bajos de ácido siálico tanto  $\alpha$ 2,3 como  $\alpha$ 2,6. Los clones diseñados con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa contenían altos niveles de enlaces de ácido  $\alpha$ 2,3-siálico y bajos niveles de enlaces de ácido  $\alpha$ 2,6-siálico. El control estándar Ovitrelle solo contiene enlaces de ácido  $\alpha$ 2,3-siálico. Esto es consistente con lo que se sabe sobre las proteínas recombinantes producidas en las células de ovario de hámster chino (CHO) (Kagawa et al, 1988, Takeuchi et al, 1988, Svensson et al., 1990).

En conclusión, la manipulación de células Per.C6 hCG con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa aumentó con éxito el número de moléculas de ácido siálico conjugadas con la hCG recombinante en la muestra.

15 **Ejemplos 8A y 8B Cuantificación del ácido siálico total**

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

20 **Ejemplo 8A**

El contenido de ácido siálico total de hCG recombinante de Per.C6 modificada con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (por ejemplo, Ejemplo 5a, Ejemplo 5b) se midió y se encontró que era mayor que 15 mol/mol, [expresado en términos de una relación de moles de ácido siálico a moles de proteína], por ejemplo mayor que 18 mol/mol, por ejemplo 19,1 mol/mol. Esto se puede comparar con Ovitrelle, que tiene un contenido de ácido siálico total de 17,6 mol/mol.

25 **Ejemplo 8B**

30 El contenido de ácido siálico total de hCG recombinante de Per.C6 modificada con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa 080019-19 (preparada mediante los métodos del Ejemplo 5b anterior) se midió y se encontró que era 20 mol/mol, [expresada en términos de una relación de moles de ácido siálico a moles de proteína]. Nuevamente, esto se puede comparar favorablemente con Ovitrelle, que tiene un contenido de ácido siálico total de 17,6 mol/mol. Este Ejemplo (080019-19) se ensayó para cuantificar las cantidades relativas de ácido siálico  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 (Ejemplo 8C).

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

Las cantidades porcentuales relativas de ácido siálico  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 en rhCG purificada [Ejemplo (080019-19), y otros dos Ejemplos preparados por los métodos del Ejemplo 5] se midieron usando técnicas conocidas - HPLC con fase normal (NP).

35 Para cuantificar el ácido siálico alfa 2,3 y 2,6 en los glicanos enlazados mediante O, se llevó a cabo el siguiente análisis. Los glicanos enlazados mediante O se escindieron de la muestra de hCG usando un kit de liberación de glicano Orela, y se separaron en NP-HPLC. Las muestras de los glicanos extraídos, reunidos (extraídos como anteriormente), se digirieron con diferentes sialidasas para determinar los enlaces. Esta degradación enzimática de los glicanos se realizó usando alfa 2-3,6,8 sialidasa y alfa 2-3, sialidasa. Los glicanos digeridos enzimáticamente se  
40 volvieron a separar entonces en la columna de NP, y los O-glicanos se identificaron en la NP-HPLC usando patrones preparados. Se calcularon los porcentajes relativos, y se muestran en la siguiente tabla (SA = ácido siálico).

| Estructura      | % SA      |            |              |
|-----------------|-----------|------------|--------------|
|                 | 080019-19 | 09PD-84-04 | 09PD84-006-3 |
| $\alpha$ 2,3 SA | 59        | 63         | 63           |
| $\alpha$ 2,6 SA | 41        | 37         | 37           |

Se encontró que los porcentajes relativos estaban en los intervalos 55% - 65% (por ejemplo, 59%) para la sialilación  $\alpha$ 2,3; y 35 a 45% (por ejemplo, 41%) para la sialilación  $\alpha$ 2,6.

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

Las cantidades porcentuales relativas de estructuras mono-, di-, tri- y tetra-sialiladas en glicanos extraídos de rhCG purificada (las tres muestras usadas en el Ejemplo 8C) se midieron usando técnicas conocidas.

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

10 La HPLC de intercambio aniónico débil (WAX) para separar los N-glicanos mediante carga (Ejemplo 8C) se llevó a cabo como se establece en Royle et al, con un patrón de N-glicano de fetuina como referencia. Los glicanos se eluyeron de acuerdo con el número de ácidos siálicos que contenían. Todas las muestras incluyeron estructuras mono(1S), di(2S), tri(3S) y tetra (4S) sialiladas.

Un ejemplo preferido, 080019-19, incluyó estructuras mono(1S), di(2S), tri(3S) y tetra(4S) sialiladas.

**Ejemplo 9 Determinación de los índices de depuración metabólica de rhCG**

15 Para determinar el índice de depuración metabólica (MCR) de muestras de hCG de Per.C6 modificadas usando  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (por ejemplo, Ejemplo 5a, 5b), se inyectaron a ratas hembra conscientes (3 animales por clon) en la vena de la cola en el momento cero con un bolo de rhCG (1 - 10  $\mu$ g/rata, basado en la cuantificación ELISA de muestras, DRG EIA 1288). Se tomaron muestras de sangre (400  $\mu$ 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 ensayo. El suero se recogió por centrifugación y se analizó el contenido de hCG por ELISA (DRG EIA 1288). El MCR de las muestras de hCG de Per.C6 modificadas usando  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa mostró que la vida media era similar al patrón (Figura 5). La Figura 6 muestra que otras muestras de hCG modificadas usando  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa pueden haber mejorado la vida media en comparación con el patrón (Figura 6).

**Ejemplo 10 - Bioensayo de hCG según USP**

25 Se llevó a cabo un bioensayo de hCG para analizar la actividad específica de hCG. La actividad se midió de acuerdo con USP (USP Monographs: Chorionic Gonadotropin, USPC Official 8/1/09-11/30/09), usando Ovitrelle como patrón. Ovitrelle tiene una actividad biológica de 26.000 UI/mg (Curr Med Res Opin. 2005 Dec; 21(12): 1969 - 76). El límite de aceptación fue  $>21.000$  UI de hCG/mg. La actividad biológica para una muestra de hCG recombinante de hCG derivada de la línea celular humana modificada con  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (que tiene un contenido de ácido siálico de 19,1 mol/mol - véase el Ejemplo 8) fue 27.477 UI de hCG/mg.

**Ejemplo 11 Resumen de producción y purificación**

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

La hCG recombinante de un clon  $\alpha$ 2,3 se preparó usando una modificación del método descrito por Lowry et al. (1976).

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

40 Para la producción de hCG, las células se transfirieron a un medio de producción libre de suero, es decir, VPRO (JRH Biosciences), que apoya el crecimiento de células PER.C6 hasta densidades celulares muy altas (generalmente  $>10^7$  células/ml en un cultivo por lotes). Las células se cultivaron primero hasta  $>1 \times 10^6$  células/ml en Excell 525, después se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm, y posteriormente se suspendieron en medio VPRO + 6 mM de L-glutamina hasta una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células se cultivaron entonces en un matraz agitador durante 7-10 días a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100 rpm. Durante este período, las células crecieron hasta una densidad de  $>10^7$  células/ml. El medio de cultivo se cosechó después de que la viabilidad celular comenzó a disminuir. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm, y el sobrenadante se usó para la cuantificación y purificación de hCG. La concentración de hCG se determinó usando ELISA (DRG EIA 1288).

50 Posteriormente, la purificación de hCG se llevó a cabo usando una modificación del método descrito por Lowry et al. (1976). Esto se logró mediante cromatografía en celulosa DEAE, filtración en gel en Sephadex G100, cromatografía de adsorción en hidroxipatita, y electroforesis preparativa en poliacrilamida.

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

Referencias

- 5 Andersen CY, Westergaard LG, y van Wely M. (2004). FSH isoform composition of commercial gonadotrophin preparations: a neglected aspect? *Reprod Biomed Online*. 9(2), 231-236.
- Bassett RM, y Driebergen R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reprod Biomed Online*. 10(2), 169-177.
- 10 D'Antonio M., Borrelli F., Datola A., Bucci R., Mascia M., Polletta P., Piscitelli D., y Papoian R. (1999) Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. *Human Reproduction* 14, 1160-1167
- Fiddes, J. C. y Goodman, H. M. (1979) Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 281, 351-356.
- Fiddes, J. C. y Goodman, H. M. (1980) The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. *Nature*, 286, 684-387.
- 15 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.
- 20 Lowry, PJ, McLean, C, Jones RL y Satgunasingam N. (1976) Purification of anterior pituitary and hypothalamic hormones *Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)*. 7, 16-21.
- Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA y Rudd PM (2006) *Methods in Molecular Biology*, ed I Brockhausen-Schutzbach (Humana Press), 347: Glycobiology protocols, 125-144.
- 25 Steelman SL, y Pohley FM. (1953) Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 53(6), 604-616.
- Svensson EC, Soreghan B, y Paulson JC. (1990) Organization of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. *J Biol Chem*. 265(34):20863-20868.
- 30 Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N, y Kobata A (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 263(8), 3657-3663.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ, y Padmanabhan V. (1995). Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*.16(6), 765-787.
- 35 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.

**SEQ ID 1**

Polipéptido de gonadotropina coriónica humana alfa

Número de acceso AH007338

Secuencia nucleotídica de hCG alfa

## ES 2 798 258 T3

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

### Secuencia proteica de hCG alfa

```
1 MKTLQFFFLF CCWKAICCNLS CELTNITIAI EKEECRFLCIS INTWCAGYC
YTRDLVYKDP
61 ARPKIQKTCT FKELVYETVR VPGCAHHADS LYTPVATQC HCGKCDSDST
DCTVRGLGPS
121 YCSFGEMKE
```

### SEQ ID 2

#### 5 Polipéptido de gonadotropina coriónica humana beta

Número de acceso NP\_000728

### Secuencia nucleotídica de hCG beta

#### Secuencia nucleotídica

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

10

### Secuencia proteica de hCG beta

# ES 2 798 258 T3

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

## SEQ ID 3

Beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4

Número de acceso L23767

## 5 Secuencia nucleotídica de ST3GAL4

1 ATGTGTCCTG CAGGCTGGAA GTCCTGGCC ATGTTGGCTC TGGTCCTGGT  
CGTCATGGTG  
61 TGGTATTCCA TCTCCCGGGA AGACAGGTAC ATCGAGCTTT TTTATTTTCC  
CATCCCAGAG  
121 AAGAAGGAGC CGTGCCCTCA GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG CCTCTAAGCT  
CTTTGGCAAC  
181 TACTCCCGGG ATCAGCCCAT CTCCTGCGG CTGAGGATT ATTTCTGGGT  
CAAGACGCCA  
241 TCTGCTTACG AGCTGCCCTA TGGGACCAAG GGGAGTGAGG ATCTGCTCCT  
CCGGGTGCTA  
301 GCCATCACCA GTCCTCCAT CCCCAAGAAC ATCCAGAGCC TCAGGTGCCG  
CCGCTGTGTG  
361 GTCGTGGGGA ACGGGCACCG GCTGCGGAAC AGCTCACTGG GAGATGCCAT  
CAACAAGTAC  
421 GATGTGGTCA TCAGATTGAA CAATGCCCA GTGGCTGGCT ATGAGGGTGA  
CGTGGGCTCC  
481 AAGACCACCA TCGTCTCTT CTACCCTGAA TCTGCCCACT TCGACCCCAA  
AGTAGAAAAC  
541 AACCCAGACA CACTCCTCGT CCTGGTAGCT TTCAAGGCAA TGGACTTCCA  
CTGGATTGAG  
601 ACCATCCTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCGA AAGGGTTTCT GGAAACAGCC  
TCCCCTCATC  
661 TGGGATGTCA ATCCTAAACA GATTGGGATT CTCAACCCCT TCTTCATGGA  
GATTGCAGCT  
721 GACAAACTGC TGAGCCTGCC AATGCAACAG CCACGGAAGA TTAAGCAGAA  
GCCCAACCAG  
781 GGCCTGTTGG CCATCACGCT GGCCCTCCAC CTCTGTGACT TGGTGCACAT  
TGCCGGCTTT  
841 GGCTACCCAG ACGCCTACAA CAAGAAGCAG ACCATTCACT ACTATGAGCA  
GATCACGCTC  
901 AAGTCCATGG CGGGGTCAGG CCATAATGTC TCCCAAGAGG CCCTGGCCAT  
TAAGCGGATG  
961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCAG TCCTTCTGA

Secuencia proteica de ST3GAL4

## ES 2 798 258 T3

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

### SEQ ID 4

Beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1

Número de acceso NM\_003032

### 5 Secuencia nucleotídica de ST6GAL1

```
1  ATGATTCACA  CCAACCTGAA  GAAAAGTTC  AGCTGCTGCG  TCCTGGTCTT  TCTTCTGTTT
61  GCAGTCATCT  GTGTGTGGAA  GGAAAAGAAG  AAAGGGAGTT  ACTATGATTC  CTTTAAATTG
121 CAAACCAAGG  AATTCAGGT  GTTAAAGAGT  CTGGGAAAT  TGGCCATGGG  GTCTGATPCC
181 CAGTCTGTAT  CCTCAAGCAG  CACCCAGGAC  CCCACAGGG  GCCGCCAGAC  CCTCGGCAGT
241 CTCAGAGGCC  TAGCCAAGGC  CAAACCAGAG  GCCTCCTTCC  AGGTGTGGAA  CAAGGACAGC
301 TCTTCCAAA  ACCTTATCCC  TAGGCTGCAA  AAGATCTGGA  AGAATTACCT  AAGCATGAAC
361 AAGTACAAAG  TGTCTACAA  GGGGCCAGGA  CCAGGCATCA  AGTTCAGTGC  AGAGGCCCTG
421 CGCTGCCACC  TCCGGGACCA  TGTGAATGTA  TCCATGGTAG  AGGTCACAGA  TTTTCCCTTC
481 AATACCTCTG  AATGGGAGGG  TTATCTGCCC  AAGGAGAGCA  TTAGACCAA  GGCTGGGCTT
541 TGGGGCAGGT  GTGCTGTTGT  GTCGTCAGCG  GGATCTCTGA  AGTCCTCCCA  ACTAGGCAGA
601 GAAATCGATG  ATCATGACGC  AGTCCTGAGG  TTTAATGGGG  CACCCACAGC  CAACTTCCAA
661 CAAGATGTGG  GCACAAAAC  TACCATTGCG  CTGATGAACT  CTCAGTTGGT  TACCACAGAG
721 AAGCGCTTCC  TCAAAGACAG  TTTGTACAAT  GAAGGAATCC  TAATTGTATG  GGACCCATCT
781 GTATACCACT  CAGATATCCC  AAAGTGGTAC  CAGAATCCGG  ATTATAATTT  CTTTAACAAC
841 TACAAGACTT  ATCGTAAGCT  GCACCCCAAT  CAGCCCTTTT  ACATCCTCAA  GCCCCAGATG
901 CCTTGGGAGC  TATGGGACAT  TCTCAAGAA  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  TTCCTGCTA  A
```

Op-

Secuencia proteica de ST6GAL1

# ES 2 798 258 T3

```

1  MIHTNLKKKF  SCCVLVFLLF  AVICVWKEKK  KGSYYDSFKL  QTKEFQVLKS
LGKIAMGSDS
61  QSVSSSTQD  PHRGRQTLGS  LRGLAKAKPE  ASFQVWNKDS  SSKNLI PRLQ
KIWKNYLSMN
121  KYKVSYKGGP  PGIKFSAEAL  RCHLRDHVNV  SMVEVTDFPF  NTSEWEGYLP
KESIRTKAGP
181  WGRCAVVSSA  GSLKSSQLGR  EIDDHDAVLR  FNGAPTANFQ  QDVGTKTTIR
LMNSQLVTTE
241  KRFLKDSLYN  EGILIVWDPS  VYHSDIPKWK  QNPDYNFFNN  YKTYRKLHPN
QPFYILKPQM
301  PWELWDILQE  ISPEEIQPNP  PSSGMLGIII  MMTLCDQVDI  YEFLPSKRKT
DVCYYYQKFF
361  DSACTMGAYH  PLYEKNLVK  HLNQGTDEDI  YLLGKATLPG  FRTIHC

```

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ferring international center SA
- <120> Preparación farmacéutica
- 5 <130> P/60201.WO01
- <150> EP 09252360.4
- <151> 2009-10-05
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.5
- 10 <210> 1
- <211> 351
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> SEQ ID 1 Secuencia nucleotídica de hCG alfa
- <400> 1

|   |     |
|---|-----|
| atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggcca cattgtcggg gtttctgcat | 60  |
| gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca | 120 |
| ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattg gctgctgctt ctctagagca | 180 |
| tatcccactc cactaaggtc caagaagacg atgttgggcc aaaagaacgt cacctcagag | 240 |
| tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagtg | 300 |
| gagaaccaca cggcgtgcca ctgcagtact tgttattatc acaaacttta a          | 351 |

- <210> 2
- <211> 498
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 798 258 T3

<223> SEQ ID 2 Secuencia nucleotídica de hCG beta

<400> 2

```

atggagatgt tccaggggct gctgctgttg ctgctgctga gcatgggcg gacatgggca      60
tccaaggagc cgcttcggcc acgggtgccg cccatcaatg ccaccctggc tgtggagaag      120
gagggtgcc ccgtgtgcat caccgtcaac accaccatct gtgccggcta ctgccccacc      180
atgacccgcg tgetgcaggg ggtcctgccg gccctgctc aggtggtgtg caactaccgc      240
gatgtgcgct tcgagtccat ccggctccct ggctgcccgc gcggcgtgaa ccccggtgtc      300
tcctacgccg tggctctcag ctgtcaatgt gcactctgcc gccgcagcac cactgactgc      360
gggggtcca aggaccacc cttgacctgt gatgaccccc gcttcaggga ctccctctcc      420
tcaaaggccc ctccccccag ccttccaagt ccatcccgac tcccggggcc ctccggacacc      480
ccgatcctcc cacaataa
    
```

<210> 3

5 <211> 999

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID 3 Secuencia nucleotídica de ST3GAL4

10 <400> 3

```

atgtgtcctg caggctggaa gctcctggcc atgttggtc tggcctggt cgtcatggtg      60
tggattcca tctcccggga agacaggtae atcgagcttt tttattttcc catcccagag      120
aagaaggagc cgtgcctcca gggtgaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggaac      180
tactcccggg atcagcccat cttcctgcgg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca      240
tctgcttacg agctgcccta tgggaccaag gggagtgagg atctgctcct ccgggtgcta      300
gccatcacca gctcctccat cccaagaac atccagagcc tcagggtgcc cgctgtgtg      360
gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgccat caacaagtac      420
gatgtggtca tcagattgaa caatgcccc gtaggtggt atgagggtga cgtgggctcc      480
aagaccacca tgcgtctctt ctaccctgaa tctgcccact tcgaccccaa agtagaaaac      540
aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag      600
accatcctga gtgataagaa gcgggtgcga aagggtttct ggaaacagcc tcccctcctc      660
tgggatgtca atcctaaaca gattcggatt ctcaaccct tcttcatgga gattgcagct      720
gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gccaccacg      780
ggcctgttgg ccatacagct ggccctccac ctctgtgact tgggtgcacat tgccggcttt      840
ggctaccag acgctataca caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc      900
aagtccatgg cggggtcagg ccataatgtc tccaagagg ccctggccat taagcggatg      960
ctggagatgg gagctatcaa gaacctcacg tccttctga
    
```

<210> 4

<211> 1221

<212> ADN

ES 2 798 258 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID 4 Secuencia nucleotídica de ST6GAL1

<400> 4

5 atgattcaca ccaacctgaa gaaaaagttc agctgctgcg tcctggctct tcttctgttt 60  
 gcagtcatct gtgtgtggaa ggaaaagaag aaagggagtt actatgattc ctttaaattg 120  
 caaaccaagg aattccaggt gttaaagagt ctggggaaat tggccatggg gtctgattcc 180  
 cagtctgtat cctcaagcag caccaggac cccacaggg gccgccagac cctcggcagt 240  
 ctcagaggcc tagccaaggc caaaccagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc 300  
 tcttcaaaa accttatccc taggctgcaa aagatctgga agaattacct aagcatgaac 360  
 aagtacaaag tgcctacaa ggggccagga ccaggcatca agttcagtgc agaggcctg 420  
 cgctgccacc tccgggacca tgtgaatgta tccatggtag aggtcacaga tttcccttc 480  
 aatacctctg aatgggaggg ttatctgccc aaggagagca ttaggaccaa ggctgggect 540  
 tggggcaggt gtgctgttgt gtcgtcagcg ggaictctga agtcctcca actaggcaga 600  
 gaaatcgtg atcatgacgc agtcctgagg tttaatgggg caccacagc caactccaa 660  
 caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctcagttggt taccacagag 720  
 aagcgcttcc tcaaagacag tttgtacaat gaaggaatcc taattgtatg ggacctatct 780  
 gtataccact cagatatccc aaagtggtag cagaatccgg attataattt ctttaacaac 840  
 tacaagactt atcgtaagct gcacccaat cagccctttt acatcctcaa gccccagatg 900  
 ccttgggagc tatgggacat tcttcaagaa atctcccag aagagattca gccaaacccc 960  
 ccatcctctg ggatgcttgg tatcatcatc atgatgacgc tgtgtgacca ggtgatatt 1020  
 tatgagttcc tcccatccaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc 1080  
 gatagtgcct gcacgatggg tgcctaccac ccgctgctct atgagaagaa tttggtgaag 1140  
 catctcaacc agggcacaga tgaggacatc tacctgcttg gaaaagccac actgcctggc 1200  
 ttccggacca ttcactgcta a 1221

<210> 5

<211> 129

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de hCG alfa

<400> 5

ES 2 798 258 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu

<210> 6

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de hCG beta

<400> 6

ES 2 798 258 T3

Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile  
 20 25 30  
 Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr  
 35 40 45  
 Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val  
 50 55 60  
 Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val  
 85 90 95  
 Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu  
 100 105 110  
 Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu  
 115 120 125  
 Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro  
 130 135 140  
 Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr  
 145 150 155 160  
 Pro Ile Leu Pro Gln  
 165

<210> 7

<211> 332

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de ST3GAL4

<400> 7



ES 2 798 258 T3

275 280 285

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

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

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

<210> 8

<211> 406

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de ST6GAL1

<400> 8

Met Ile His Thr Asn Leu Lys Lys Lys Phe Ser Cys Cys Val Leu Val  
1 5 10 15

Phe Leu Leu Phe Ala Val Ile Cys Val Trp Lys Glu Lys Lys Lys Gly  
20 25 30

Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Lys Leu Gln Thr Lys Glu Phe Gln Val Leu  
35 40 45

Lys Ser Leu Gly Lys Leu Ala Met Gly Ser Asp Ser Gln Ser Val Ser  
50 55 60

Ser Ser Ser Thr Gln Asp Pro His Arg Gly Arg Gln Thr Leu Gly Ser  
65 70 75 80

Leu Arg Gly Leu Ala Lys Ala Lys Pro Glu Ala Ser Phe Gln Val Trp  
85 90 95

Asn Lys Asp Ser Ser Ser Lys Asn Leu Ile Pro Arg Leu Gln Lys Ile  
100 105 110

Trp Lys Asn Tyr Leu Ser Met Asn Lys Tyr Lys Val Ser Tyr Lys Gly  
115 120 125

Pro Gly Pro Gly Ile Lys Phe Ser Ala Glu Ala Leu Arg Cys His Leu  
130 135 140

Arg Asp His Val Asn Val Ser Met Val Glu Val Thr Asp Phe Pro Phe  
145 150 155 160

Asn Thr Ser Glu Trp Glu Gly Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Ile Arg Thr  
165 170 175

ES 2 798 258 T3

Lys Ala Gly Pro Trp Gly Arg Cys Ala Val Val Ser Ser Ala Gly Ser  
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Gln Leu Gly Arg Glu Ile Asp Asp His Asp Ala Val  
 195 200 205

Leu Arg Phe Asn Gly Ala Pro Thr Ala Asn Phe Gln Gln Asp Val Gly  
 210 215 220

Thr Lys Thr Thr Ile Arg Leu Met Asn Ser Gln Leu Val Thr Thr Glu  
 225 230 235 240

Lys Arg Phe Leu Lys Asp Ser Leu Tyr Asn Glu Gly Ile Leu Ile Val  
 245 250 255

Trp Asp Pro Ser Val Tyr His Ser Asp Ile Pro Lys Trp Tyr Gln Asn  
 260 265 270

Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr Arg Lys Leu His  
 275 280 285

Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu Lys Pro Gln Met Pro Trp Glu Leu  
 290 295 300

Trp Asp Ile Leu Gln Glu Ile Ser Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asn Pro  
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Gly Met Leu Gly Ile Ile Ile Met Met Thr Leu Cys Asp  
 325 330 335

Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe Leu Pro Ser Lys Arg Lys Thr Asp Val  
 340 345 350

Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys Phe Phe Asp Ser Ala Cys Thr Met Gly Ala  
 355 360 365

Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Asn Leu Val Lys His Leu Asn Gln  
 370 375 380

Gly Thr Asp Glu Asp Ile Tyr Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Pro Gly  
 385 390 395 400

Phe Arg Thr Ile His Cys  
 405

<210> 9

<211> 39

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador CGa-fw de PCR

<400> 9

ccaggatcgc ccacatgga ttactacaga aaaatatgc 39

<210> 10  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador CGa-rev de PCR  
 <400> 10  
 ggatggctag ctaaagatt gtgataataa c 31  
 <210> 11  
 10 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador CGb-fw de PCR  
 15 <400> 11  
 ccaggcgcgc caccatggag atgtccagg ggctgc 36  
 <210> 12  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador CGb-rev de PCR  
 <400> 12  
 ccgggtaac ttattgtggg aggatcgggg 30  
 25 <210> 13  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Cebador 2,3STfw de PCR  
 <400> 13  
 ccaggatccg ccaccatgtg tctgcaggc tggaagc 37  
 <210> 14  
 <211> 35  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 798 258 T3

<220>  
<223> Cebador 2,3STrev de PCR  
<400> 14  
tttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg 35  
5 <210> 15  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
10 <223> Cebador 2,6STfw de PCR  
<400> 15  
ccaggatccg ccaccatgat tcacaccaac ctgaag 36  
<210> 16  
<211> 32  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador 2,6STrev de PCR  
<400> 16  
20 ttttttctt aagttagcag tgaatgtcc gg 32

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de hCG recombinante (rhCG) que incluye sialilación  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6, que comprende una etapa de producción o expresión de la rhCG en una línea celular Per.C6, en el que la línea celular Per.C6 se ha modificado para sobreexpresar  $\alpha$ 2,3sialiltransferasa.
- 5 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la línea celular Per.C6 incluye actividad de sialiltransferasa endógena.

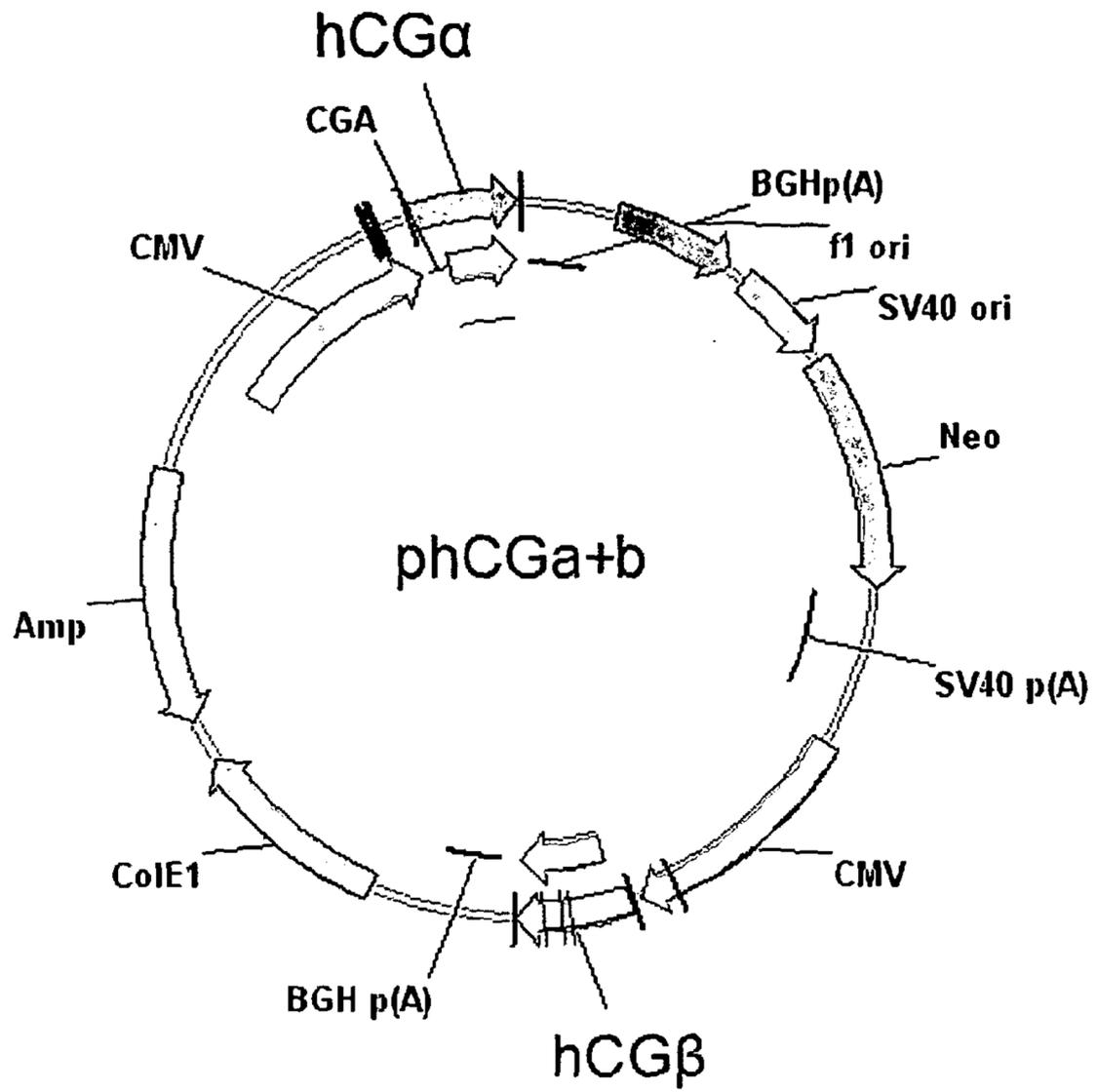


Fig 1

Fig 2

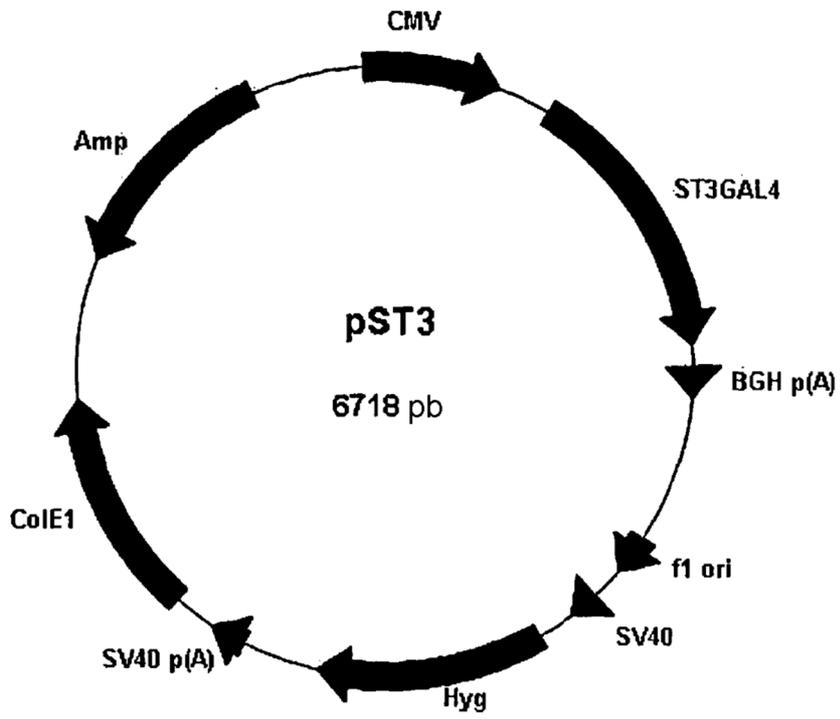


Fig 3

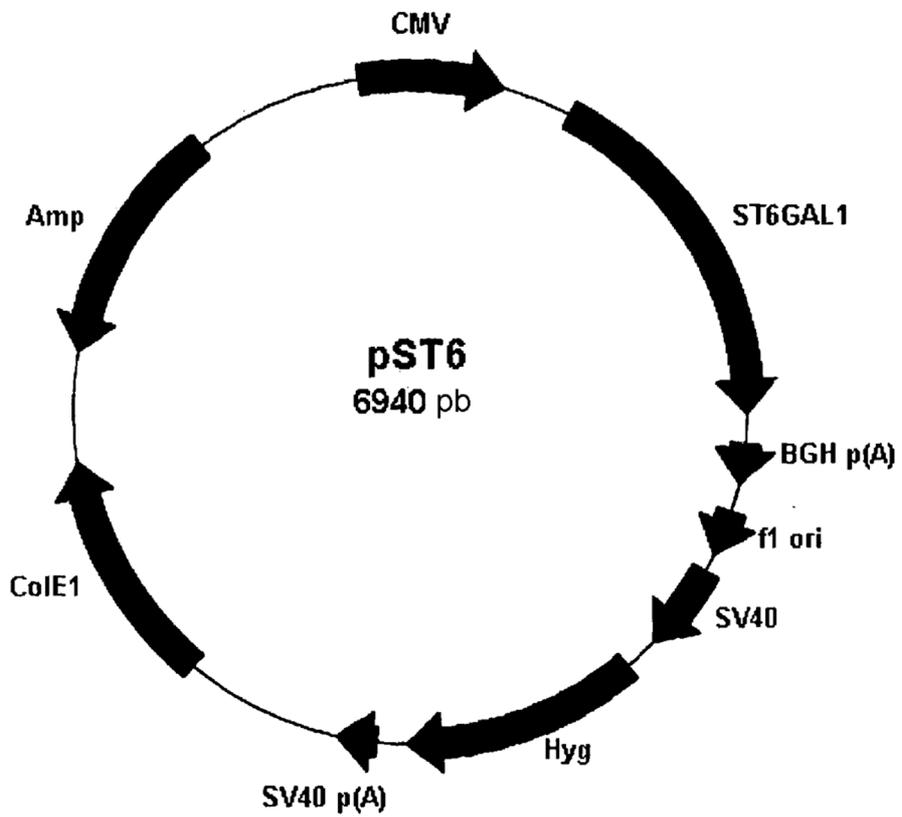


Fig 4

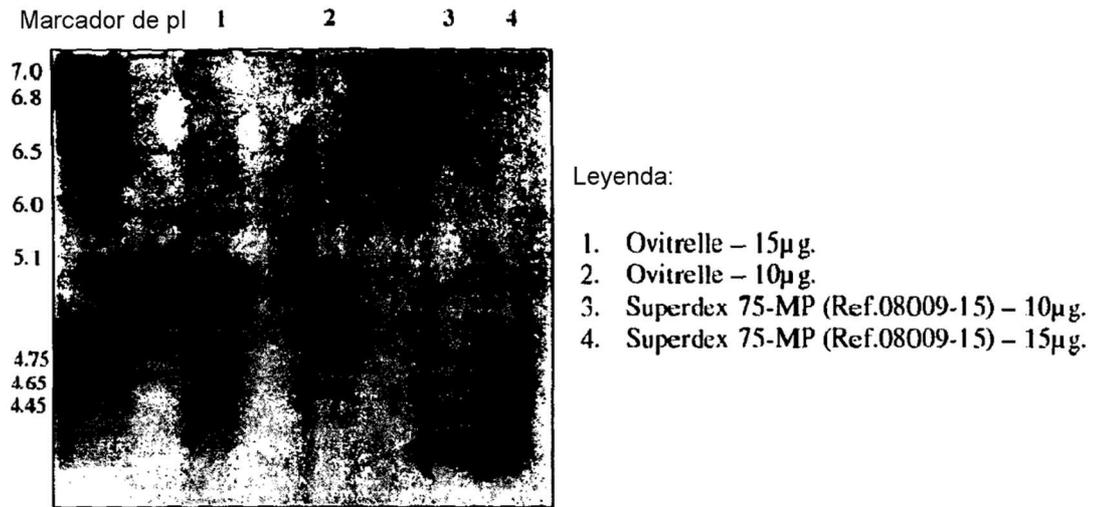


Fig 5

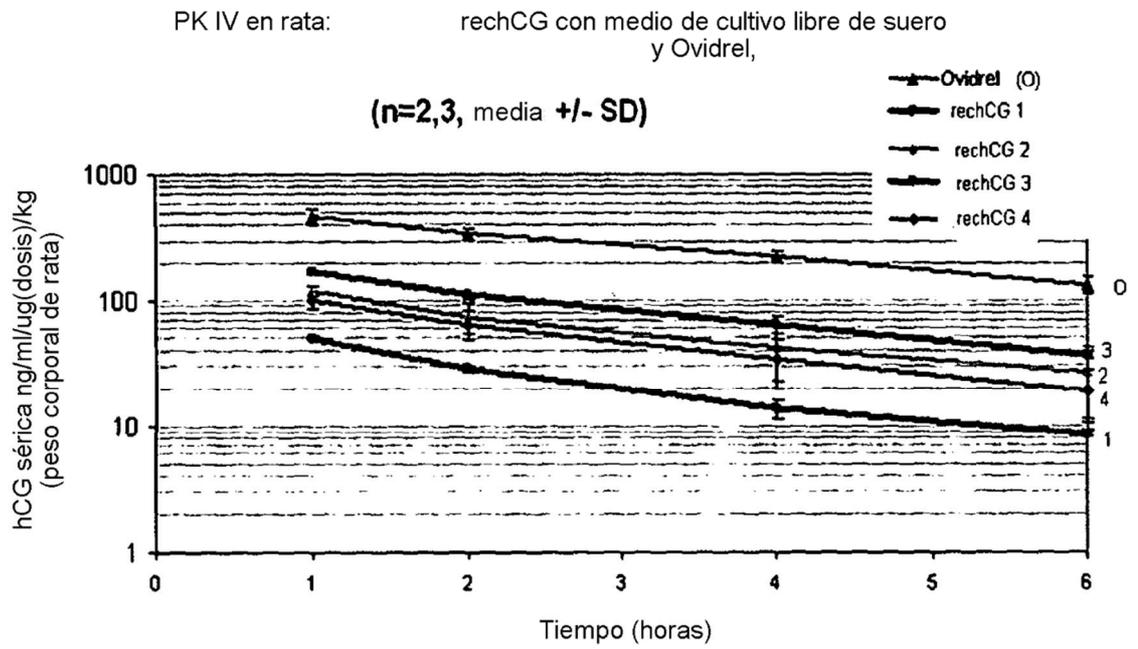


Figura 6

