



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월13일

(11) 등록번호 10-2489143

(24) 등록일자 2023년01월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/59 (2006.01) *A61K 38/24* (2019.01)
C07K 14/575 (2006.01) *C12N 15/00* (2017.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/59 (2013.01)
A61K 38/24 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7037028(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년10월04일
 심사청구일자 2021년12월09일
- (85) 번역문제출일자 2021년11월12일
- (65) 공개번호 10-2021-0141771
- (43) 공개일자 2021년11월23일
- (62) 원출원 특허 10-2021-7003233
 원출원일자(국제) 2010년10월04일
 심사청구일자 2021년03월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2010/001854
- (87) 국제공개번호 WO 2011/042688
 국제공개일자 2011년04월14일
- (30) 우선권주장
 09252360.4 2009년10월05일
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
 US20080226681 A1

- (73) 특허권자
 웨링 비.브이.
 네덜란드, 2132 제이엑스 후프도르프, 폴라리스아
 베뉴 144
- (72) 발명자
 코팅햄 이안
 스위스 씨에이치-1162 쉐 프레 슈맹 드 라 베르고
 노사 50 페링 인터내셔널 센터 에스에이
 플라신 다니엘
 스위스 씨에이치-1162 쉐 프레 슈맹 드 라 베르고
 노사 50 페링 인터내셔널 센터 에스에이
 화이트 리처드 보이드
 미국 92103 캘리포니아주 샌 디에고 슈터 스트리
 트 1348
- (74) 대리인
 유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 3 항

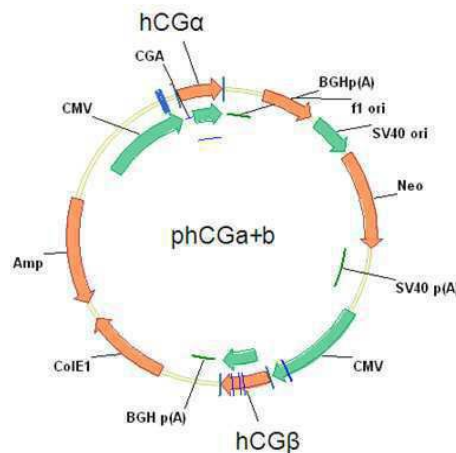
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 재조합 hCG를 포함하는 약학 조제물

(57) 요약

재조합 hCG(rhCG)를 포함하는 조제물.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/575 (2013.01)

C12N 15/00 (2013.01)

C12N 15/09 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 hCG (rhCG)를 포함하며, FSH를 더욱 포함하는, 불임 치료용 조성물로서,
상기 재조합 hCG가 모노 (1S), 디 (2S), 트리 (3S) 및 테트라 (4S) 시알화된 구조체를 포함하고;
상기 재조합 hCG 가 Per.C6 세포주에서 생산 또는 발현되는 것이며,
상기 Per.C6 세포주가 α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 사용하여 변형된 것인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 재조합 hCG 가 내인성 시알릴 트랜스퍼라제 활성화에 의해 제공되는 α 2,6-시알화를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 재조합 hCG 는, 단백질 몰 수에 대한 시알산의 몰 수 비율로 표현시, 15 mol/mol 이상의 시알산 함량을 가진, 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 불임의 치료에 이용하기 위한 고나도트로핀에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 인간 융모막 고나도트로핀(hCG)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고나도트로핀은 남성과 여성에서 생식선의 기능을 조절하는 이형이량체성 당단백질 호르몬 그룹에 속한다. 고나도트로핀으로는 여포 자극 호르몬(FSH), 황체 형성 호르몬(LH) 및 융모막성 고나도트로핀(CG)이 있다.

[0003] 인간 융모막성 고나도트로핀(hCG)은 본래 뇌하수체 전엽에서 분비되어, 여포의 발생과 배란을 뒷받침하는 작용을 한다. hCG는, 다른 당단백질 호르몬인 LH 및 FSH에서도 공통적인, 92개의 아미노산으로 구성된 알파 서브유닛과, 호르몬 특이성을 결정하는 hCG에 고유한 145개의 아미노산으로 구성된 베타 서브유닛을 포함한다. 각각의 서브유닛은 컴플렉스 탄수화물 잔기들이 부가됨으로써 번역 후에 변형된다. 상기 알파 서브유닛은 아미노산 52 및 78번에 2개의 N-결합된 당화 부위를 포함하고 있으며, 상기 베타 서브유닛은 아미노산 13 및 30번에 2개의 N-결합된 당화 부위와 아미노산 121, 127, 132 및 138번에 4개의 O-결합된 당화 부위를 포함하고 있다.

[0004] 불임 치료에 임신부의 뇨에서 추출한 hCG [Choragon (Ferring)]가 다년간 사용되어 왔다. 뇨에서 추출하는 hCG의 제조에는 다량의 뇨 채집과 처리 공정이 사용된다. hCG의 제조합 버전, 즉 Ovitrelle (Serono)이 통용되고 있다. 이것은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 발현된다. 공지된 제조합 hCG 제품은 인간 뇨로부터 제조된

hCG와는 상이한 약물 동력학적 프로파일을 보인다. 인간 뇨로부터 제조되는 제품의 약물 동력학적 프로파일에 훨씬 더 가깝게 복제하거나 모방하는 hCG 제품이 있다면 바람직할 것이다.

[0005] 존재하는 다양한 이소형(isoform)의 양적 차이와 관련하여, hCG 조제물들에 상당한 이질성이 존재한다. 개별 hCG 이소형들은 동일한 아미노산 서열을 나타내지만, 번역 후 변형되는 정도에 차이가 있으며; 특정 이소형은 탄수화물 분지 구조의 이소성과 시알릭산(말단 당)의 혼입량 차이로 특정화되는데, 이 2가지 모두 특정 이소형의 생활성에 영향을 미치는 것으로 보인다.

[0006] 천연 hCG의 당화는 매우 복잡하다. 천연적으로 생기는 뇌하수체 hCG의 글리칸은 바이-, 트리- 및 테트라-안테나형 글리칸의 조합들을 포함할 수 있는 광범위한 구조체들을 함유할 수 있다. 글리칸은 다른 변형을 함유할 수도 있다: 코어 푸코실화, 글루코사민의 양분화(biosecting), 아세틸 락토사민에 의한 체인 연장, 일부 또는 전체 시알화, α2,3 및 α2,6 결합의 시알화, 및 갈락토스를 치환하는 황산화된 갈락토사민. 아울러, 각 당화 부위에는 글리칸 구조체들의 분포 차이도 존재한다.

[0007] 재조합 hCG("rhCG")의 당화 산물은 숙주 세포주에 다양한 글리코실-트랜스퍼라제가 존재한다는 것을 나타낸다. 기존 rhCG 제품, Ovitrelle는 조작된 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포)로부터 유래된 것이다. CHO 유래 rhCG에서의 글리칸의 변형 범위는 뇨로부터 유래된 천연 산물에서 확인되는 것 보다 훨씬 더 한정적이다. CHO 유래의 rhCG에서 확인되는 글리칸의 이종성의 감소의 예로는, 분기성 글루코사민의 결여 및 코어 푸실화 및 아세틸 락토사민 연장의 양적 감소가 있다. 아울러, CHO 세포는 α2,3 결합으로 시알산만 첨가할 수 있다 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). 이것은 α2,3 및 α2,6-결합된 시알산이 혼합된 글리칸을 함유하고 있는 천연적으로 생성되는 hCG와는 다르다.

[0008] 재조합 FSH 조제물 (Organon)은, 뇌하수체, 혈청 또는 폐경 후 뇨 FSH (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995)와 비교하여, 등전점(pI)이 4 미만인 (산성 이소형으로 간주됨) FSH의 양적 측면에서 상이한 것으로 입증되었다. FSH 뇨 조제물내 산성 이소형의 양은 재조합 산물들인 Gonadotropin-releasing hormone (Serono) 및 Puregon (Organon) (Andersen *et al.*, 2004)에 비해 훨씬 더 많다. 이러한 사실은, FSH에서 설페이트에 의해 수식된 음으로 하전된 글리칸의 양이 적기 때문에, rFSH내 시알산의 물량이 더 낮음을 반영하는 것일 것이다. 천연 FSH 대비 시알산의 함량이 낮은 것은 상업적으로 구입가능한 FSH 제품들의 특징이므로, 제조 공정에서의 한계를 숙고하여야 한다 (Bassett and Drievergen, 2005). 다양한 소스로부터 유래된 물질에 대해 FSH의 순환성 수명이 확인되고 있다. 이러한 물질들 중 일부는, pI로 특정화되는 분자의 총 전하를 기준으로 세분되는데, 산성이 강할 수록 음전하가 높아진다. 분자의 총 전하에 대한 주된 기여인자는 각 FSH 분자의 총 시알산 함량이다. 예를 들어, rFSH (Organon)의 시알산 함량은 약 8 mol/mol인 반면 뇨 유래의 FSH는 시알산 함량이 더 높다 (de Leeuw *et al.*, 1996). 랫에서의 이들의 혈장 소거율은 0.34 및 0.14 ml/min (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2003)이다. 재조합 FSH 샘플을 고 pI 분획과 저 pI 분획으로 나눈 경우에, 고 pI(시알산 함량이 낮음) 분획의 생체내 효능은 감소되었고 혈장 반감기는 짧았다 (D'Antonio *et al.*, 1999). 본원의 출원인들은, 공지된 CHO로부터 유래된 FSH와 유사하게, 재조합 hCG 제품(예, Ovitrelle) 역시 뇨 유래의 hCG 보다 등전점 4 미만(산성 이소형으로 간주됨)인 hCG의 양이 더 적다는 것을 확인하였는데, 이 역시 공지의 rhCG 제품이 뇨 유래의 hCG 보다 시알산 함량이 더 적다는 것을 의미한다.

[0009] hCG 및 rhCG의 총 시알산 함량은, 시알산이 보통 2가지 방식으로 결합되어 있기 때문에, 직접 비교하기 어렵다. 뇌하수체/혈청/ 뇨 유래의 hCG에는 α2,3-결합된 시알산 및 α2,6-시알산 둘다가 함유되어 있으며, 전자가 더 많이 존재한다. 그러나, CHO 세포 유래의 재조합 산물에는 α2,3형만 함유되어 있다 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). 다시 말해, CHO 시스템을 이용하여 발현시킨 재조합 단백질은 이의 말단 시알산의 결합 타입이 천연 등가체와 상이할 것이다. 이는, 재조합 제품의 총 시알산 함량이 천연 산물 보다 낮다는 사실과 더불어, 천연 산물과 현행 재조합 제품 간의 또다른 차이점이며, 탄수화물 모이어티가 분자의 약리학적 특징에 기여할 수 있기 때문에 제약학적 용도의 생물학적 제조에 있어 중요한 고려 사항이다.

[0010] 따라서, 인간 뇨로부터 제조한 제품의 물리화학적 및 약물 동력학적 프로파일을 거의 유사하게 복제하거나 모방하는 rhCG 제품이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) 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.

(비특허문헌 0002) Bassett RM, and Driebergen R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. Reprod Biomed Online. 10(2), 169-177.

(비특허문헌 0003) D'Antonio M., Borrelli F., Datola A., Bucci R., Mascia M., Polletta P., Piscitelli D., and Papoian R. (1999) Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. Human Reproduction 14, 1160-1167

(비특허문헌 0004) Fiddes, J. C. and Goodman, H. M. (1979) Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. Nature, 281, 351-356.

(비특허문헌 0005) Fiddes, J. C. and Goodman, H. M. (1980) The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. Nature, 286, 684-387.

(비특허문헌 0006) Kagawa Y, Takasaki S, Utsumi J, Hosoi K, Shimizu H, Kochibe N, and Kobata A. (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon-beta 1 and recombinant human interferon-beta 1 produced by three different mammalian cells. J Biol Chem. 263(33), 17508-17515.

(비특허문헌 0007) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193(1), 265-75.

(비특허문헌 0008) 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.

(비특허문헌 0009) Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA and Rudd PM (2006) Methods in Molecular Biology, ed I Brockhausen-Schutzbach (Humana Press), 347: Glycobiology protocols, 125-144.

(비특허문헌 0010) Steelman SL, and Pohley FM. (1953) Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. Endocrinology. 53(6), 604-616.

(비특허문헌 0011) Svensson EC, Soreghan B, and Paulson JC. (1990) Organization of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. J Biol Chem. 265(34):20863-20868.

(비특허문헌 0012) Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N, and Kobata A (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem. 263(8), 3657-3663.

(비특허문헌 0013) Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ, and Padmanabhan V. (1995). Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. Endocr Rev.16(6), 765-787.

(비특허문헌 0014) Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, and Nayudu P. (2003). Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. Biol Reprod. 69(2), 379-389

발명의 내용

[0012]

본 발명은, $\alpha 2,3$ 시알화 및 $\alpha 2,6$ 시알화를 포함하며, 선택적으로 $\alpha 2,8$ 시알화를 포함하는 재조합 hCG("rhCG" 또는 "rechCG")를 제공하는 것이다. 본 발명에 따른 rhCG (또는 rhCG 조제물)는, 시알산 함량이 [단백질의 물에 대한 시알산의 몰 비율로 표현하였을 때] 15 mol/mol 이상, 예컨대 15 mol/mol 내지 25 mol/mol, 예컨대 17 mol/mol 내지 24 mol/mol, 예컨대 17.7 mol/mol 내지 23 mol/mol, 예컨대 18 mol/mol 내지 22 mol/mol, 예컨대 19 mol/mol 내지 21 mol/mol, 예컨대 19 mol/mol 내지 20 mol/mol일 수 있다. 본 발명에 따른 rhCG (또는 rhCG 조제물)는, 총 시알화의 10% 이상이 $\alpha 2,3$ -시알화일 수 있다. 예를 들어, 총 시알화의 45% 내지 80%가 $\alpha 2,3$ -시알화일 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 50% 내지 70%가 $\alpha 2,3$ -시알화일 수 있으며, 예컨대 총 시알화의

55% 내지 65%가 $\alpha 2,3$ -시알화일 수 있다. 예컨대, 총 시알화의 65-85%가 $\alpha 2,3$ -시알화일 수 있다. 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는 총 시알화의 50% 이하가 $\alpha 2,6$ -시알화일 수 있다. 예를 들어, 총 시알화의 20-55%는 $\alpha 2,6$ -시알화일 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 30-50%는 $\alpha 2,6$ -시알화일 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 35-45%는 $\alpha 2,6$ -시알화일 수 있다. 예를 들어, 총 시알화의 15-35%는 $\alpha 2,6$ -시알화일 수 있다. 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는 총 시알화의 5% 이하가 $\alpha 2,8$ -시알화일 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 0 - 4%, 예컨대 0.1 - 4%가 $\alpha 2,8$ -시알화일 수 있다. 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는 $\alpha 2,8$ -시알화를 함유하지 않을 수도 있다.

[0013] 본원의 출원인은 CHO 유래의 제품, Ovitrelle에 비해 보다 산성 프로파일을 가지며 시알산 함량이 높은 인간 유래의 재조합 hCG를 개발하였다. 본 출원인은, 시알산의 결합 형태, $\alpha 2,3$ - 또는 $\alpha 2,6$ -가 hCG의 생체 소거에 극적인 영향을 미칠 수 있다는 것을 연구를 통해 확인하였다. CHO 세포주와 반대되는 인간 세포주에서 $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ 결합형 두가지 형태로 시알산이 부착된 재조합 hCG를 발현시킬 수 있다.

[0014] $\alpha 2,3$ -결합된 시알산 및 $\alpha 2,6$ -결합된 시알산이 혼합 함유된 재조합 hCG는, 인간 세포주를 rhCG와 $\alpha 2,3$ 시알릴 트랜스퍼라제 둘다를 발현하도록 조작함으로써, 제조하였다(실시예 4, 5a 및 5b). 발현되는 산물은 산성이 강하며, $\alpha 2,3$ - 및 $\alpha 2,6$ -결합된 시알산의 혼합을 함유하고 있으며, $\alpha 2,6$ -결합된 시알산은 내인성 시알릴 트랜스퍼라제 활성에 의해 제공된다. 이러한 방식은 기존의 CHO 세포에서 발현시킨 rhCG에 비해 2가지 이점을 가지는데, 첫째 2가지 시알릴트랜스퍼라제의 조합된 작용으로 인해 물질은 보다 고도로 시알화되며, 두번째로 물질은 천연 hCG에 훨씬 더 가까워진다. 이것은, $\alpha 2,3$ -결합된 시알산만 생산하며 시알산 함량이 낮은, CHO 세포 유래의 재조합 제품에 비해, 생물학적으로 더 적합할 것으로 보인다.

[0015] 본 출원인은, 본 발명의 rhCG가, 다른 재조합 제품 보다 천연 인간 뇨 산물의 물리화학적 및 약물 동력학적 프로파일을 훨씬 근접하게 복제하거나 모방할 수 있다는 것을, 놀랍게도 확인하였다. 즉, 본 발명의 rhCG는 "천연" hCG와 비슷할 수 있다. 이는 투약 등과 관련하여 유의한 이점이 있을 수 있다. 아울러, 보다 "천연적"이거나 또는 보다 "인간"적인 제품이, 의미상으로는 인공이지만, 가능한 "천연적인" 치료를 원할 수 있는 환자에게 더 바람직할 수 있다. 다른 재조합 산물 보다 천연(예, 인간 뇨) hCG에 가까운 탄수화물(예, 글리칸) 구조를 가지는 재조합 hCG 제품에는 다른 이점들(예, 약물 동력학적 이점들)이 있을 수 있다.

[0016] 따라서, 본 발명은 $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ 시알산의 혼합을 함유하며, 따라서 천연 hCG와 매우 유사한 hCG의 재조합 버전이다. IVF 기술에서의 조절된 난소 유도(controlled ovarian stimulation) 및 배란 유도를 목적으로 한 이들 화합물의 사용이, 기존 재조합 제품에 비해 보다 더 자연스럽게 난소 자극을 발생시킬 수 있을 것으로 예상된다.

[0017] 본 발명은, $\alpha 2,3$ 시알화 및 $\alpha 2,6$ 시알화를 포함하는, 재조합 hCG ("rhCG" 또는 "rechCG") (및/또는 재조합 hVG 조제물)를 제공한다. rhCH 또는 rhCG 조제물은 선택적으로 $\alpha 2,8$ 시알화를 더 포함할 수 있다.

[0018] 본원에서, 용어 "재조합 hCG 조제물"은 재조합 hCG를 포함하는 예컨대 약학적 용도의 조제물을 포함한다. 본 발명의 구현예들에서, rhCG는 단일 이소형 또는 이소형들의 혼합으로서 존재할 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 rhCG (또는 rhCG 조제물)는, 시알산 함량이 [단백질의 물에 대한 시알산의 물 비율로 표현하였을 때] 15 mol/mol 이상 (실시예 8), 예컨대 15 mol/mol 내지 25 mol/mol, 예컨대 17 mol/mol 내지 24 mol/mol, 예컨대 17.7 mol/mol 내지 23 mol/mol, 예컨대 18 mol/mol 내지 22 mol/mol, 예컨대 19 mol/mol 내지 21 mol/mol, 예컨대 19 mol/mol 내지 20 mol/mol일 수 있다. 본 발명의 rhCG는 인간 세포주에서 생산하거나 발현시킬 수 있다.

[0020] 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는, 총 시알화의 10% 이상이 $\alpha 2,3$ -시알화일 수 있다. 예컨대, 총 시알화의 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 또는 90% 이상이 $\alpha 2,3$ -시알화일 수 있다. rhCG (또는 rhCG 조제물)는 $\alpha 2,3$ -시알화를 총 시알화의 45% 내지 80%로, 예컨대 총 시알화의 50% 내지 70%로, 예컨대 총 시알화의 55% 내지 65%로 포함할 수 있다. rhCG (또는 rhCG 조제물)는 $\alpha 2,3$ -시알화를 총 시알화의 65 - 85%로, 예컨대 총 시알화의 70 - 80%로, 예컨대 총 시알화의 71 - 79%로 포함할 수 있다. 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는 총 시알화의 50% 이하로 $\alpha 2,6$ -시알화를 포함할 수 있다. 예컨대, 총 시알화의 45, 40, 30, 20, 10, 5% 또는 미만 이 $\alpha 2,6$ -시알화일 수 있다. rhCG (또는 rhCG 조제물)는 $\alpha 2,6$ -시알화를 총 시알화의 20-55%로, 예컨대 총 시알화의 30-50%로, 예컨대 총 시알화의 35-45%로 포함할 수 있다. rhCG (또는 rhCG 조제물)는 $\alpha 2,6$ -시알화를 총 시알화의 15 - 35%로, 예컨대 총 시알화의 20 - 30%로, 예컨대 총 시알화의 21 - 29%로 포함할 수 있다. 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는 총 시알화를 5% 이하로 $\alpha 2,8$ -시알화를 포함할 수 있다. 예를 들어, 총 시

알화의 2.5% 이하가 α 2,8-시알화될 수 있다. rhCG (또는 rhCG 조제물)는 α 2,8-시알화를 총 시알화의 0 - 4%로, 예컨대 총 시알화의 0.1 - 4%로, 예컨대 총 시알화의 0.5 - 3%로, 예컨대 총 시알화의 0.5 - 2.5%로 포함할 것이다. 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는 α 2,8-시알화를 포함하지 않을 수도 있다. 시알화는, hCG 탄수화물 구조체 상에 존재하는 시알 잔기의 양을 의미한다. α 2,3-시알화는 (당해 기술 분야에 잘 공지된 바와 같이) 2,3 위치에서의 시알화를 의미하며, α 2,6-시알화는 (당해 기술 분야에 잘 공지된 바와 같이) 2,6 위치에서의 시알화를 의미한다. 즉 "총 시알화의 %가 α 2,3 시알화될 수 있다"는 2,3 위치에서 시알화된 hCG에 존재하는 시알산 잔기의 총 수의 %를 지칭한다. 용어 "총 시알화의 %가 α 2,6-시알화인"은 2,6 위치에서 시알화된 hCG에 존재하는 시알산 잔기의 총 수의 %를 지칭한다.

[0021] 본 발명에 따른 rhCG (또는 rhCG 조제물)는 시알산 함량 (hCG 분자 당 시알당의 양)이 6 중량% 이상 (예컨대, 6% - 15%, 예로 7% - 13%, 예로 8% - 12%, 예로 11% - 15%, 예로 12% - 14%)일 수 있다.

[0022] 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 발현되는 재조합 hCG는 오직 α 2,3 시알화만 포함한다.

[0023] 본 발명의 rhCG는 인간 세포주에서 생산 또는 발현시킬 수 있다. 이는, 시알화를 보존하기 위한, 예컨대 세포 배양 배지의 조작 및 조절이, 공지된 프로세스에 비해 덜 중요할 수 있기 때문에, 생산 방법을 단순화(하고, 보다 효율적이게) 할 수 있다. 또한, 이러한 방법은, 공지된 rhCG 제품의 생산시에 비해, 생산되는 rhCG는 염기성이 약하기 때문에 더 효율적일 수 있으며; 산성이 강한 rhCG가 생산될수록 염기성 hCG를 분리/제거하기 쉬워진다. rhCG는 Per.C6 세포주, Per.C6 유래 세포주 또는 변형된 Per.C6 세포주에서도 생산 또는 발현시킬 수 있다. 세포주는 α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형시킬 수 있다. rhCG는 [세포주]의 내인성 시알릴 트랜스퍼라제 활성에 의해 제공되는 α 2,6-결합된 시알산 (α 2,6 시알화)를 포함할 수 있다. 다른 예로, 또는 부가적으로, 세포주는 α 2,6-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형시킬 수 있다.

[0024] rhCG는 α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 제조할 수 있다. rhCG는 내인성 시알릴 트랜스퍼라제 활성에 의해 제공되는 α 2,6-결합된 시알산 (α 2,6 시알화)를 포함할 수 있다. rhCG는 α 2,3- 및/또는 α 2,6-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 제조할 수 있다.

[0025] 본 발명은, 다른 측면으로, 인간 세포주, 예컨대 Per.C6 세포주, Per.C6 유래 세포주 또는 변형된 Per.C6 세포주에서, 예컨대, α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형되어진 세포주에서, rhCG를 생산 또는 발현시키는 단계를 포함하는, 본원에 기술된 (본 발명의 측면에 따른) rhCG 및/또는 rhCG 조제물의 제조 방법을 제공한다.

[0026] rhCG 구조는 글리칸 모이어티를 포함한다. 분지 형성(branching)은 당해 기술 분야에 잘 공지된 바와 같이, 글리칸이 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 말단 당 잔기 또는 "안테나"를 가질 수 있다는 결과를 발생시킬 수 있다. 본 발명의 rhCG는 모노-안테나형, 및/또는 디-안테나형, 및/또는 트리-안테나형, 및/또는 테트라-안테나형의 구조 상에 시알화가 존재하는 글리칸을 포함할 수 있다. rhCG는 모노-시알화된, 디-시알화된, 트리-시알화된 및 테트라-시알화된 글리칸 구조를 포함할 수 있으며, 예컨대 상대적인 함량은 다음과 같다: 0.1-4%는 모노-시알화됨; 35 - 45%는 디-시알화됨; 0.5 - 8%는 트리-시알화됨, 및 0 - 1%는 테트라-시알화됨 (예, 실시예 8에 기술된 바와 같이 하전된 글리칸의 WAX 분석을 통해 입증됨). 바람직하게는, 본 발명의 재조합 hCG는 모노(1S), 디(2S), 트리(3S) 및 테트라(4S) 시알화된 구조를 포함한다. 바람직하게는 시알화된 구조체의 상대적인 함량은 다음과 같은 비율을 갖는다 (1S:2S:4S:4S): 0.2-1%: 35-40%: 2.5-7%: 0.5-1 % (예, 실시예 8D에 기술된 바와 같이 하전된 글리칸의 WAX 분석을 통해 입증됨).

[0027] 본 발명은, 다른 측면에서, 인간 세포주에서 생산되는(예, 발현되는) rhCG를 제공한다. rhCG는 α 2,3- 및 α 2,6-시알화를 포함할 수 있다. rhCG는 Per.C6 세포주, Per.C6 유래 세포주 또는 변형된 Per.C6 세포주에서 생산 또는 발현시킬 수 있다. 세포주는 α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형시킬 수 있다. rhCG는 [세포주]의 내인성 시알릴 트랜스퍼라제 활성에 의해 제공되는 α 2,6-결합된 시알산 (α 2,6 시알화)을 포함할 수 있다. 다른 예로 또는 부가적으로, 세포주는 α 2,6-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형시킬 수 있다. 본 발명에 따른 rhCG (또는 rhCG 조제물)는, 시알산 함량이, [단백질 몰수에 대한 시알산의 몰수의 비로 표시됨], 15 mol/mol 이상, 예컨대 15 mol/mol 내지 25 mol/mol, 예컨대 17 mol/mol 내지 24 mol/mol, 예컨대 17.7 mol/mol 내지 23 mol/mol, 예컨대 18 mol/mol 내지 22 mol/mol, 예컨대 19 mol/mol 내지 21 mol/mol, 예컨대 19 mol/mol 내지 20 mol/mol일 수 있다. rhCG (또는 rhCG 조제물)는 총 시알화의 10% 이상이 α 2,3-시알화될 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 45% 내지 80%가 α 2,3-시알화될 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 50% 내지 70%는 α 2,3-시알화될 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 55 - 65%는 α 2,3-시알화될 수 있다. 예를 들어, 총 시알화의 65-85%는 α 2,3-시알화될 수 있다. 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는, 총 시알화의 50% 이하가 α 2,6-시알화될 수 있다. 예를 들어, 총 시알화의 20-55%가 α 2,6-시알화될 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 30-50%가 α

2,6-시알화일 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 35-45%가 α 2,6-시알화일 수 있다. 예를 들어, 총 시알화의 15-35%가 α 2,6-시알화일 수 있다. 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는, 총 시알화의 5% 이하가 α 2,8-시알화일 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 0 - 4%, 예로 0.5-4%가 α 2,8-시알화일 수 있다. 본 발명의 rhCG (또는 rhCG 조제물)는 α 2,8-시알화를 포함하지 않을 수 있다.

- [0028] 본 발명은, 다른 측면에서, (예, 전술한 바와 같이) α 2,3-시알화 및 α 2,6-시알화를 포함하는 rhCG를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 약학 조성물은 FSH 및/또는 LH를 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] FSH는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방식으로 수득할 수 있다. 본원에서 FSH는 인간 유래의 FSH 및 재조합 FSH를 포함한다. 인간 유래의 FSH는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 임의의 적합한 소스(예, 뇨)로부터 정제할 수 있다. FSH는 재조합 FSH, 예컨대 인간 세포주에서 발현되는 FSH일 수 있다. 재조합 FSH를 발현 및 정제하는 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.
- [0030] LH는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방식으로 수득할 수 있다. LH는 본원에서 인간 유래의 LH 및 재조합 LH를 포함한다. 인간 유래의 LH는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 임의의 적합한 소스(예, 뇨)로부터 정제할 수 있다. LH를 발현 및 정제하는 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.
- [0031] 약학 조성물은 예를 들어 보조 생식 기술(ART), 배란 유도 또는 자궁내 수정(IUI)에 사용하기 위한 불임 치료용일 수 있다. 약학 조성물은, 예컨대, 공지된 hCG 조제물을 사용하는 의학적 증상들에 사용할 수 있다. 또한, 본 발명은, 불임을 치료하기 위한, 또는 불임 치료용 약제를 제조함에 있어서의, 본원에 기술된 (본원의 측면에 따른) rhCG 및/또는 rhCG 조제물의 용도를 제공한다. 본 발명의 약학 조성물은 임의의 약물 투여 방식에 맞는, 예컨대 경구, 직장, 비경구, 경피(예, 패치 기법), 정맥내, 근육내, 피하, 낭내(intrasusternal), 질내, 복막내, 국소(분말, 연고, 점적제) 또는 볼 또는 코 분무를 위한 공지된 조성물로 제형화할 수 있다. 대표적인 조성물은, 특히 Remington's Pharmaceutical Sciences fifteenth edition (Matt Publishing Company, 1975), 1405 - 1412 및 1461 - 87 페이지, 및 the national formulary XIV fourteenth edition (American Pharmaceutical Association, 1975)에 기술된 바와 같이, 수용액, 염 및 보존제 등의 무독성 부형제, 완충제 등과 같은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.
- [0032] 적합한 수성 및 비수성 약학 담체, 희석제, 용매 또는 비히클의 예로는, 물, 에탄올, 폴리올(예, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 카르복시메틸셀룰로스 및 이들의 적정 혼합물, 식물성 오일(예, 올리브 오일) 및 에틸 올레이트와 같은 주사용 유기 에스테르를 포함한다.
- [0033] 또한, 본 발명의 조성물은 비제한적인 예로서 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제 등의 첨가제를 포함할 수 있다. 미생물의 증식을 방지하기 위해 항균제 및 항진균제를 첨가할 수 있으며, 그 예로는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등이 있다. 아울러, 당, 소듐 클로라이드 등의 등장제를 포함시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0034] 일부 경우들에서, 장기간 작용할 수 있도록, 피하 또는 근육내 주입으로부터의 hCG (및 필요에 따라 다른 활성 성분)의 흡수를 늦추는 것이 바람직하다. 이는, 수 난용성의 결정 또는 비정질 물질의 액체 현탁물을 사용함으로써, 달성할 수 있다. 그러면, hCG의 흡수 속도는 이것의 분해 속도에 따라 결정되며, 이는 다시 결정의 크기와 결정 형태에 따라 결정될 수 있다. 다른 예로, 비경구 투여된 hCG 조합 형태의 지연성 흡수는 오일 비히클에 hCG 조합을 용해하거나 현탁함으로써 달성된다.
- [0035] 주입가능한 데포트 형태는 폴리락티드-폴리글리콜라이드 등의 생분해성 폴리머내 hCG (및 존재하는 경우, 다른 제제)의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성함으로써, 제조할 수 있다. hCG 대 폴리머의 비율과 사용되는 특정 폴리머의 특성에 따라, hCG의 방출 속도를 제어할 수 있다. 그의 생분해성 폴리머의 예로는, 폴리비닐피롤리돈, 폴리(오르소에스테르), 폴리(안하이드라이드) 등이 포함된다. 데포트 주입가능한 제형은, 또한, 신체 조직에 친화적인 리포솜 또는 마이크로에멀전내에 hCG를 포집함으로써 제조한다.
- [0036] 주입가능한 제형은, 예컨대, 세균 체류 필터를 통한 여과에 의해 또는 사용하기 직전에 멸균수나 다른 멸균 주사용 매질에 용해 또는 분산시킬 수 있는 무균 고형 조성물의 형태에 살균제를 혼입함으로써, 멸균처리할 수 있다. 주입가능한 제형은 임의의 적정 용기, 예컨대 바이알, 사전-충전된 시린지, 주사 카트리지 등의 내부에 제공될 수 있다.
- [0037] 주입가능한 제형은 hCG (선택적으로 FSH, LH 등과 함께)를 포함하는 약학 조성물을 포함하는 제품으로서 제공될 수 있다. 2 이상의 활성 성분(즉, hCG 및 예컨대 FSH 또는 LH)이 존재한다면, 이는 개별 또는 함께 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 개별 투여하는 경우, 투여는 순차적으로 이루어질 수 있다. 제품은 임의의 적정 팩키

지로 제공될 수 있다. 예컨대, 제품은 hCG, FSH 또는 이들 FSH와 hCG의 조합이 들어있는 사전-충전된 시린지를 다수개로 포함할 수 있으며, 상기 시린지는 블리스터 팩키지 되거나 멸균성을 유지하기 위한 다른 수단으로 패키징된다. 제품에는 선택적으로 hCG 및 FSH 제형을 사용 설명서가 첨부될 수 있다.

[0038] 약학 조성물의 다양한 구성 성분들의 pH와 실제 농도는, 본 기술 분야에서 일반적인 실무에 따라 조절한다. 예로, GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7th ed을 참조한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 조성물은 비경구 투여용 조성물로서 제공된다. 비경구 제형을 제조하는 일반적인 방법들은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, supra, at pages 780-820에 기술되어 있다. 비경구 조성물은 투여 진적에 멸균 주사 매질과 혼합시키는 고체로서 또는 액체 제형으로 제공될 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 비경구 조성물은 투여 용이성과 투여량 균일성을 위해 투약 단위 형태로 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 본 발명은 아래 실시예와 첨부된 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명된다:

도 1은 pHCGalpha/beta 발현 벡터의 플라스미드 맵이다.

도 2는 α2,3-시알릴트랜스퍼라제(ST3GAL4) 발현 벡터를 나타낸 것이다.

도 3은 α2,6-시알릴트랜스퍼라제(ST6GAL1) 발현 벡터를 나타낸 것이다.

도 4는 종래 기술에 따른 조제물(트랙 1, 2) 대비, 코마시 블루로 염색한 IEF에 의한, 본 발명에 따른 인간 세포주 유래의 재조합 hCG 조제물내 rhCG 이소형들의 검출 결과를 나타낸다.

도 5는 α2,3-시알릴트랜스퍼라제 조작된 Per.C6 hCG 샘플의 대사성 소거율(MCR)을 나타낸다.

도 6은 α2,3-시알릴트랜스퍼라제 조작된 Per.C6 rhCG 샘플의 장기적인 MCR을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 서열 선택

[0041] 인간 hCG

[0042] hCG 알파 폴리펩타이드 유전자의 코딩부는 Fiddes and Goodman (1979)에 따라 사용하였다. 서열은 AH007338로 등재되어 있으며, 구축시 이 단백질 서열에 대한 다른 변형체는 사용하지 않았다. 서열은 본원에서 서열번호 1로 표시된다.

[0043] hCG 베타 폴리펩타이드 유전자의 코딩부는 Fiddes and Goodman (1980)에 따라 사용하였다. 서열은 NP_000728로 등재되어 있으며, CGbeta3, CGbeta5 및 CGbeta7의 단백질 서열과 일치한다. 이 서열은 본원에서 서열번호 2로 표시된다.

[0044] 시알릴트랜스퍼라제

[0045] α2,3-시알릴트랜스퍼라제 - 베타-갈락토시드 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제 4(알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, ST3GAL4) 유전자의 코딩부는 Kitagawa and Paulson (1994)에 따라 사용하였다. 이 서열은 L23767로 등재되어 있으며, 본원에서는 서열번호 3으로 표시된다.

[0046] α2,6-시알릴트랜스퍼라제 - 베타-갈락토스아민 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제 1(알파2,6-시알릴트랜스퍼라제, ST6GAL1) 유전자의 코딩부는 Grundmann *et al.* (1990)에 따라 사용하였다. 이 서열은 NM_003032로 등재되어 있으며, 본원에서는 서열번호 4로 표시된다.

[0047] 실시예

[0048] 실시예 1 hCG 발현 벡터의 구축

[0049] hCG 알파 폴리펩타이드의 코딩 서열 (AH007338, 서열번호 1)과 hCG 베타 폴리펩타이드의 코딩 서열 (NP_000728, 서열번호 2)을, 프라이머 조합 CGa-fw / CGa-rev 및 CGb-fw / CGb-rec를 각각 사용하여 PCR로 증폭하였다.

[0050] CGa-fw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGGATTACTACAGAAAAATATGC-3'

- [0051] CGa-rev 5'-GGATGGCTAGCTTAAGATTTGTGATAATAAC-3'
- [0052] CGb-fw 5'-CCAGGCGCGCCACCATGGAGATGTTCCAGGGGCTGC -3'
- [0053] CGb-rev 5'- CCGGGTAACTTATTGTGGGAGGATCGGGG-3'
- [0054] 수득되는 증폭된 hCG 베타 DNA를 제한효소 *AscI* 및 *HpaI*로 절단하여, 네오마이신 선별 마커가 함유된 CMV 유래 포유류 발현 벡터의 *AscI* 및 *HpaI* 사이트에 삽입하였다. 마찬가지로, hCG 알파 DNA를 *BamHI* 및 *NheI*으로 절단하고, 이를 이미 hCG 베타 폴리펩타이드 DNA가 함유된 발현 벡터의 *BamHI* 및 *NheI* 사이트에 삽입하였다.
- [0055] 벡터 DNA를 사용하여 *E.coli* DH5 α 균주에 형질전환하였다. 증폭시키기 위해 콜로니를 취하고, hCG 알파 및 베타 둘다를 함유하고 있는 벡터가 포함된 20개를 서열분석을 위해 선별하였다. 서열분석을 위해 선별한 콜로니들 모두에는 서열번호 1 및 2의 올바른 서열들이 함유되어 있었다. 플라스미드 pHCG A+B를 형질전환용으로 선별하였다 (도 1).
- [0056] **실시예 2 ST3 발현 벡터의 구축**
- [0057] 베타-갈락토시드 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제 4의 코딩 서열 (ST3, L23767, 서열번호 3)을 프라이머 조합 2,3STfw / 2,3STrev을 사용한 PCR로 증폭시켰다.
- [0058] 2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'
- [0059] 2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'
- [0060] 수득되는 증폭된 ST3 DNA를 제한효소 *BamHI* 및 *AflIII*로 절단하여, 히그로마이신 내성 마커가 함유된 CMV 유래 포유류 발현 벡터의 *BamHI* 및 *AflIII* 사이트에 삽입하였다. 이 벡터를 전술한 바와 같이 증폭시키고, 서열 분석하였다. 클론 pST3#1 (도 2)에는 서열번호 3의 올바른 서열이 함유되어 있었으며, 이를 형질전환용으로 선별하였다.
- [0061] **실시예 3 ST6 발현 벡터의 구축**
- [0062] 베타-갈락토시드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제 1의 코딩 서열 (ST6, NM_003032, 서열번호 4)을 프라이머 조합 2,6STfw / 2,6STrev을 사용한 PCR로 증폭시켰다.
- [0063] 2,6STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3'
- [0064] 2,6STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3'
- [0065] 수득되는 증폭된 ST6 DNA를 제한효소 *BamHI* 및 *AflIII*로 절단하여, 히그로마이신 내성 마커가 함유된 CMV 유래 포유류 발현 벡터의 *BamHI* 및 *AflIII* 사이트에 삽입하였다. 이 벡터를 전술한 바와 같이 증폭시키고, 서열 분석하였다. 클론 pST6#1 (도 3)에는 서열번호 4의 올바른 서열이 함유되어 있었으며, 이를 형질전환용으로 선별하였다.
- [0066] **실시예 4 PER.C6 세포에서의 안정적인 pHCG A+B 발현. 클론의 형질전환, 분리 및 스크리닝.**
- [0067] 하나의 플라스미드에서 hCG의 양 폴리펩타이드 체인들을 발현시킴으로써, hCG를 생산하는 Per.C6 클론들을 제조하였다 (실시예 1 참조).
- [0068] 안정적인 클론을 수득하기 위해, 리포솜계 형질전환제를 pHCG A+B 구조체와 함께 사용하였다. 안정적인 클론을, 10% FCS가 보충되고 G418이 함유된 Per.C6 선별 배지에서 선별하였다. 형질전환 후 3주 후에 G418 내성 클론을 배양하였다. 총 389개의 클론을 분리할 목적으로 선별하였다. 분리한 클론을 70 - 80% 컨플루언스 되 될까 까지 선별 배지에서 배양하였다. hCG 선택적인 ELISA를 이용한 hCG 단백질 함량과 cAMP 축적 분석을 이용한 클로닝된 세포주의 hCG 수용체에서의 약리학적 활성에 대해, 상층액을 분석하였다. 기능성 단백질을 발현하는 클론들(118)을 24웰, 6웰 및 T80 플라스크에서 배양 확장을 진행하였다.
- [0069] 47개의 클론 유래의 물질의 생산성과 품질을 측정하기 위한 연구는 T80 플라스크에서 개시하여, 충분한 물질을 수득하였다. 세포는 전술한 바와 같이 7일간 보충된 배지에서 배양하고, 상층액을 회수하였다. 생산성은 hCG 선택적인 ELISA를 이용하여 결정하였다. 물질의 등전성 프로파일을 (실시예 6에 기술된 방법을 이용하여) 결정하였다. IEF로부터 유래된 정보를 사용하여, 대사성 소거율 분석을 위한 클론을 선별하였다. 충분한 생산성 및 품질을 나타내는 클론들을 시알릴트랜스퍼라제 조작용으로 선별하였다.
- [0070] **실시예 5a α2,3-시알릴트랜스퍼라제를 과다 발현하는 세포에서 시알화 수준은 증가한다. hCG 발현성 PER.C6 세**

포에서의 pST3의 안정적인 발현; 클론의 형질전환, 분리 및 스크리닝

- [0071] hCG의 양자 폴리펩타이드 체인을 이미 발현하고 있는 Per.C6 세포에서, 별개의 플라스미드로부터 $\alpha 2,3$ 시알릴트랜스퍼라제를 발현시킴으로써(실시예 2 참조), 고도로 시알화된 hCG를 생산하는 Per.C6 클론을 제조하였다(실시예 4 참조). 실시예 4에 기술된 바와 같이 Per.C6 세포로부터 제조된 클론들을 생산성, 양호한 증식 프로파일, 기능성 단백질의 생산 및 일부 시알화가 포함된 hCG 생산 등의 특징 분석용으로 선별하였다.
- [0072] 안정적인 클론들을 실시예 4에서 이미 기술한 바와 같이 제조하였다. $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제 프로그램으로부터 파생된 클론들을 분리하여, 증폭시키고, 분석하였다. $\alpha 2,3$ - 연구를 위한 최종 클론의 수는 5개였다. $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제 클론들을 무혈청 배지 및 현탁 조건에 적응시켰다.
- [0073] 전술한 바와 같이, hCG 선택적인 ELISA, hCG 수용체 세포주에서의 기능적 반응, IEF(실시예 6)를 이용하여 클론을 분석하였다. 또한, 대사성 소거율(실시예 9) 및 USP hCG 생분식(실시예 10)으로 분석하였다. 결과들을 시판되는 제조합 hCG (Ovitrelle, Serono) 및 모체 hCG Per.C6 세포주와 비교하였다. 대표 샘플들을 실시예와 도에 나타낸다.
- [0074] 결론적으로, Per.C6 세포에서 hCG와 $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제의 발현은 hCG만 발현하는 세포에 비해 시알화된 hCG의 수준을 증가시킨다.
- [0075] **실시예 5b hCG를 발현하는 PER.C6 세포에서의 pST3의 안정적인 발현 - 다른 방법**
- [0076] 상기에서 제조한 알파 베타 이형이량체(실시예 4)는 시알화 수준이 낮아, 강염기성 IEF 프로파일을 나타내었다. 전술한 바(실시예 5a)와 같이, Per.C6 세포에서의 hCG와 $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제의 공동 발현은 hCG만 발현하는 세포에 비해 시알화된 hCG의 수준을 증가시킨다.
- [0077] hCG 알파 및 베타 서브유닛 유전자를, $\alpha 2,3$ 시알릴트랜스퍼라제 효소 유전자와 함께, Per.C6 세포에, 현탁 세포 배양 포맷으로 더블 형질전환하는 과정을 수행하였다. hCG 벡터(더블 알파/베타, 실시예 1) 및 $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제를 코딩하는 벡터(실시예 2)를 무혈청 조건 하에 공동-형질전환시킴으로써, 세포주를 제조하였다. Per.C6 세포로부터 제조된 클론을 생산성, 양호한 증식 프로파일, 기능성 단백질의 생산 및 일부 시알화가 포함된 hCG 생산 등의 특징 분석용으로 선별하였다. 클론을 분리, 증식 및 분석하였다.
- [0078] 앞에서 언급한 바와 같이, hCG 선택적인 ELISA, hCG 수용체 세포주에서의 기능적 반응, IEF(실시예 6)를 이용하여 클론을 분석하였다. 또한, 대사성 소거율(실시예 9) 및 USP hCG 생분식(실시예 10)으로 분석하였다. 결과들을 시판되는 제조합 hCG (Ovitrelle, Serono) 및 모체 hCG Per.C6 세포주와 비교하였다. 대표 샘플들을 실시예와 도에 나타낸다(실시예 6, 9, 10, 도 4 및 5 참조). 클론에 의해 생산된 제조합 hCG(즉, 본 발명에 따른 제조합 hCG)는, $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제 없이 발현시킨 hCG 및 Ovitrelle과 비교하여, 현저히 개선된 시알화(즉, 평균적으로 시알산의 수가 많은 hCG 이소형이 많음)를 나타낸다(실시예 6 및 8, 도 4).
- [0079] **실시예 6 등전성 포커싱에 의한 Per.C6에서 생산되는 hCG 이소형의 등전점 pI의 분석**
- [0080] 전기영동은 전기장에 의해 하전된 분자들을 용매를 통해 전달하는 것으로 정의된다. 전기장을 통한 생물 분자의 이동성은 전기장의 세기, 분자의 총 전하, 분자의 크기와 형태, 분자가 통해 이동하는 매질의 이온 세기 및 특성에 따라 결정될 것이다.
- [0081] 등전성 포커싱(IEF)은 단백질의 pI를 기초로 단백질을 분리시키는 전기영동 기법이다. pI는 단백질이 총 전하를 띄지 않아 전기장에서 이동하지 않는 pH이다. hCG 이소형의 시알산 함량은 각각의 이소형의 pI 포인트를 약간 변형시키므로, 이 기법을 이용하여 활용함으로써 각 클론 유래의 Per.C6 hCG 이소형을 가시화할 수 있다.
- [0082] 세포 배양 상층액내 Per.C6에서 생산된 hCG 이소형의 등전점을 등전성 포커싱을 이용하여 분석하였다. Per.C6 hCG 클론 유래의 세포 배양 배지를 실시예 4, 5a 및 5b에 기술된 바와 같이 제조하였다.
- [0083] Per.C6 hCG 샘플을 5% 폴리아크릴아미드가 함유된 Novex[®] IEF 겔에서 pH 3.0 -7.0 농도 구배의 비변성 조건(native condition) 하에 양성체 용액 pH 3.0 - 7.0 중에서 분리시켰다. 코마시 블루 염색을 이용하고, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법을 이용하여, 단백질을 가시화하였다.
- [0084] 도 4는 본 발명에 따른 조성물(3번 트랙, 10 μ g, 및 4번 트랙, 15 μ g) 및 종래 기술에 따른 CHO 유래 조성물, Ovitrelle(1번 트랙, Ovitrelle, 10 μ g, 및 2번 트랙, Ovitrelle, 15 μ g)에서의, 코마시 블루로 염색한 IEF에 의한 rhCG 이소형의 검출 결과를 보여준다. 밴드들을 시알산 분자를 다른 수로 함유하고 있는 hCG 이소형들을 나타낸다. 이러한 방법을 이용하여, 더 많은 수의 시알산 분자를 가진 hCG 이소형을 생산하는 클론들을 동정하

였다. 도 4는, $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제를 함유하도록 조작된 인간 세포 유래의 재조합 hCG(본 발명에 따른 조성물)는 Ovitrelle에 비해 보다 산성인 프로파일을 가짐을 보여준다.

[0085] **실시예 7 Per.C6 hCG의 시알산 결합 분석**

[0086] 당접합체를 렉틴 기반의 글리칸 차별화 방법(lectin based glycan differentiation method)을 이용하여 분석하였다. 이러한 방법으로, 니트로셀룰로스에 결합된 당단백질과 당접합체를 특정화할 수 있다. 렉틴은 특정 모이어티, 예컨대 $\alpha 2,3$ -결합된 시알산을 선택적으로 인지한다. 적용된 렉틴은 결합된 렉틴을 면역학적으로 검출할 수 있는 스테로이드 헵텐 디곡시제닌(digoxigenin)과 접합된다.

[0087] 모 클론(시알릴트랜스퍼라제 부가되지 않음) 및 $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제 조작된 클론으로부터 정제한 Per.C6 hCG를 표준적인 SDS-PAGE 기법을 이용하여 분리하였다. 상업적으로 구입가능한 재조합 hCG (Ovitrelle, Serono)를 표준 물질로 사용하였다.

[0088] 시알산은 DIG 글리칸 변별 키트(Cat. No. 11 210 238 001, Roche)를 제조사의 설명서에 따라 사용하여 분석하였다. SNA(Sambucus nigra agglutinin)에 대한 양성 반응은 말단에 (2-6) 시알산이 연결되어 있음을 의미한다. MAA (Maackia amurensis agglutinin II)에 대한 양성 반응은 말단에 ($\alpha 2,3$) 시알산이 연결되어 있음을 의미한다.

[0089] 요약하면, 모 클론에는 $\alpha 2,3$ - 및 $\alpha 2,6$ -시알산 모두 낮은 수준으로 함유되어 있었다. $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제가 부가된 조작된 클론에는 $\alpha 2,3$ -시알산 결합은 높은 수준으로 존재하고, $\alpha 2,6$ -시알산 결합은 낮은 수준으로 존재하였다. 표준 대조군인 Ovitrelle에는 $\alpha 2,3$ -시알산 결합만 존재하였다. 이는, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 생산되는 재조합 단백질에 대해 공지된 사실과 일치한다 (Kagawa *et al*, 1988, Takeuchi *et al*, 1988, Svensson *et al*, 1990).

[0090] 결론적으로, Per.C6 hCG 세포에 $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제를 부가하는 조작은 샘플내 재조합 hCG에 접합된 시알산 분자의 수를 성공적으로 증가시켰다.

[0091] **실시예 8A 및 8B 총 시알산의 정량화**

[0092] 시알산은 단당류로 간주되는 단백질이 결합된 탄수화물로서, 갈락토스, 만노스, 글루코사민, 갈락토사민 및 푸코스와 같은 다른 단당류와 조합하여 형성된다. 본 발명에 따른 정제된 rhCG 상의 총 시알산을 Stanton *et al*. (J. Biochem. Biophys. Methods. 30 (1995), 37 - 48)에 기반한 방법을 이용하여 측정하였다.

[0093] **실시예 8A**

[0094] $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제 (예, 실시예 5a, 실시예 5b)로 변형된 Per.C6 재조합 hCG의 총 시알산 함량을 측정하였는 바, [단백질 몰 수에 대한 시알산의 몰 수 비율로 표현시] 15 mol/mol 이상, 예컨대 18 mol/mol 이상, 예컨대 19.1 mol/mol 이상인 것으로 확인되었다. 이는 총 시알산 함량이 17.6 mol/mol인 Ovitrelle과 비교될 수 있다.

[0095] **실시예 8B**

[0096] $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제 080019-19로 변형된 Per.C6 재조합 hCG(상기 실시예 5b의 방법에 의해 재조합)의 총 시알산 함량을 측정하였는 바, [단백질 몰 수에 대한 시알산의 몰 수 비율로 표현시] 20 mol/mol 이상인 것으로 확인되었다. 이 역시 총 시알산 함량이 17.6 mol/mol인 Ovitrelle과 비교시 유리하다. 본 실시예 (080019-19)를 테스트하여, $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ 시알산 (실시예 8C)의 상대적인 양을 정량하였다.

[0097] **실시예 8C - $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ 시알산의 상대적인 양 정량**

[0098] 정제한 rhCG [실시예 (080019-19), 및 실시예 5의 방법으로 제조한 2종의 다른 실시예] 상에서의 $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ 시알산의 상대적인 퍼센트를 공지 기법 - 정상-상 (NP)에서의 HPLC -으로 측정하였다.

[0099] 0-연결된 글리칸에서 알파 2,3 및 2,6 시알산을 정량하기 위해, 다음과 같은 분석을 수행하였다. 0-연결된 글리칸을 Orela 글리칸 분리 키트를 이용하여 hCG 샘플에서 절단하여, NP-HPLC에서 분리하였다. 추출하여 수집한 글리칸 샘플(상기와 같이 추출함)을 여러가지 시알리다제로 절단하여 결합을 확인하였다. 이러한 글리칸의 효소적 분해는 알파 2-3,6,8 시알리다제 및 알파 2,3-시알리다제를 이용하여 수행하였다. 그런 후, 효소적으로 절단한 글리칸을 NP 컬럼에서 다시 분리한 다음 0-글리칸을 준비된 표준 물질을 이용한 NP-HPLC에서 동정하였다. 상대적인 퍼센트를 계산하여, 아래 표에 나타낸다 (SA = 시알산).

표 1

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

α 2,3 시알화의 경우 상대적인 퍼센트는 55% - 65% (예, 59%)이고, α 2,6 시알화의 경우 35 - 45% (예, 41%)인 것으로 확인되었다.

실시에 8D 모노, 디, 트리 및 테트라 안테너형 시알화된 구조의 정량

정제된 rhCG(실시에 8C에서 사용된 샘플 3종)로부터 추출한 글리칸에서의 모노, 디, 트리 및 테트라 시알화된 구조물의 상대적인 퍼센트를 공지 기법으로 측정하였다.

각 rhCG 샘플을 고정하고(겔 블록), 행구고, 환원 및 알킬화한 다음 PNGase F로 밤새 절단하였다. 그런 후, N-글리칸을 추출하여 처리하였다. NP-HPLC 및 WAX-HPLC 분석을 위해 N-글리칸을 Royle et al에 기술된 바와 같이 플루오로포어 2AB로 표지하였다.

전하에 의해 N-글리칸을 분리하기(실시에 8C) 위한 약한 음이온 교환 (WAX) HPLC을, 기준으로서 Fetuin N-글리칸 표준물질을 이용하여 Royle et al에 기술된 바와 같이 수행하였다. 글리칸을 이에 함유된 시알산의 수에 따라 용출시켰다. 모든 샘플들에는 모노(1S), 디(2S), 트리(3S) 및 테트라(4S) 시알화된 구조체들이 포함되어 있었다. 시알화된 구조체의 상대적인 양은 다음과 같은 비율인 것으로 확인되었다: (1S:2S:4S:4S): 0.1-4%: 35-45%: 0.5-8%: 0-1 %.

바람직한 실시예인 080019-19에는 모노(1S), 디(2S), 트리(3S) 및 테트라(4S) 시알화된 구조체들이 포함되어 있었다. 시알화된 구조체의 상대적인 양은 다음과 같은 비율인 것으로 확인되었다 (1S:2S:4S:4S): 0.1-4%: 35-45%: 0.5-8%: 0-1 %.

실시에 9 rhCG의 대사 소거율 측정

α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 조작한 Per.C6 hCG 샘플 (예, 실시에 5a, 5b)의 대사 소거율(MCR)을 측정하기 위해, 의식있는 암컷 랫(클론 당 동물 3마리)의 꼬리 정맥에 0시간대에 rhCG (1 - 10 μ g/랫, 샘플의 ELISA 정량화를 기초로 함, DRG EIA 1288) 볼루스를 주입하였다. 테스트 샘플을 주입한 후, 1, 2, 4, 8, 12, 24 및 32시간 후, 꼬리 끝에서 채혈(400 μ l)하였다. 원심분리에 의해 혈청을 수집하여, ELISA (DRG EIA 1288)에 의해 hCG 함량을 분석하였다. α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 조작시킨 Per.C6 hCG 샘플의 MCR은 표준과 비슷하였다 (도 5). 도 6은, α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 조작시킨 그외 hCG 샘플들은 표준 물질에 비해 개선된 반감기를 가질 수 있음을 보여준다 (도 6).

실시에 10 - USP에 따른 hCG 생분석

hCG 특이 활성을 분석하기 위해, hCG 생분석을 수행하였다. 활성은 표준물질로서 Ovitrelle을 이용하여 USP (USP Monographs: Chorionic Gonadotropin, USPC Official 8/1/09-11/30/09)에 따라 측정하였다. Ovitrelle의 생물 활성은 26,000 IU/mg (Curr Med Res Opin. 2005 Dec; 21(12): 1969 - 76)이다. 허용 한계는 > 21,000 IU hCG/mg이었다. α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 조작된 인간 세포주 유래의 hCG 재조합 hCG(시알산 함량 19.1 mol/mol - 실시에 8 참조) 샘플에 대한 생물 활성은 27,477 IU hCG/mg이었다.

실시에 11 생산 및 정제의 개요

무혈청 배지에서 현탁 배양한 Per.C6 세포에서 재조합 hCG를 생산하기 위한 공정을 개발하였다. 이 공정은 아래에 기술하며, 몇가지 hCG를 생산하는 Per.C6 세포주에 적용하였다.

Lowry et al. (1976)에 기술된 방법을 변형시켜 α 2,3- 클론 유래의 재조합 hCG를 제조하였다.

PER.C6-hCG를 제조하기 위해, 세포주를 무혈청 배지, 즉 Excell 525 (JRH -iosciences)에 적용하였다. 먼저, 세포를 T80 배양 플라스크에서 70-90% 컨플루언트 단일층을 형성하도록 배양하였다. 계대 배양시, 세포를 무혈청 배지 Excell 525 + 4 mM L-글루타민에 세포 밀도 0.3×10^6 세포/ml로 재현탁하였다. 세포 현탁물 25 ml을

250 ml 교반 플라스크에 넣고, 100 rpm, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 교반하였다. 세포 밀도가 > 1x10⁶ 세포/ml에 도달한 후, 세포를 세포 밀도 0.2 또는 0.3x10⁶ 세포/ml로 서브-배양한 다음, 100 rpm, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 교반 플라스크에서 배양하였다.

[0115] hCG를 제조하기 위해, 세포를 무혈청 생산 배지, 즉 Per.C6 세포의 증식을 뒷받침하는 VPRO (JRH Biosciences)에 고밀도로 넣었다 (통상 배지 배양에서 > 10⁷ 세포/ml). 먼저, 세포를 Excell 525에서 > 1x10⁶ 세포/ml로 배양한 다음, 1000 rpm에서 5분간 스핀 다운하고, 이를 1x10⁶ 세포/ml 밀도로 VPRO 배지 + 6 mM L-글루타민에 현탁하였다. 그런 후, 세포를 100 rpm, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 7-10일간 교반 플라스크에서 배양하였다. 이 기간 동안, 세포는 > 10⁷ 세포/ml의 밀도로 증식하였다. 세포 생존성이 감소되기 시작한 후 배양 배지를 회수하였다. 세포를 1000 rpm에서 5분간 스핀 다운시키고, 상층액을 hCG 정량 및 정제에 사용하였다. hCG의 농도는 ELISA (DRG EIA 1288)로 측정하였다.

[0116] 그 후, Lowry *et al.* (1976)에 기술된 방법을 변형시켜, hCG를 정제하였다. 이는 DEAE 셀룰로스, 세파텍스 G100에서의 겔 여과, 하이드록시아파티트에서의 흡착 크로마토그래피 및 분취용 폴리아크릴아미드 전기영동에 의해 달성되었다.

[0117] 모든 크로마토그래피 공정 중에, 면역반응성의 재조합 hCG의 존재를 RIA (DRG EIA 1288) 및 IEF (실시예 6)로 검증하였다.

[0118] **서열번호 1**

[0119] Human chorionic gonadotropin alpha polypeptide

[0120] Accession number AH007338

[0121] Nucleotide sequence of hCG alpha

[0122] 1 atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggtea cattgtcggg gtttctgcat

[0123] 61 gttctccatt ccgtctctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgtaca ggaaaaccca

[0124] 121 tttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattgg gctgctgctt ctctagagca

[0125] 181 tateccactc cactaaggtc caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag

[0126] 241 tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatggggggg tttaaagtg

[0127] 301 gagaaccaca cggcgtgcc a ctgcagtact tgttattatc acaaactta a

[0128] Protein sequence of hCG alpha

[0129] 1 MKTLQFFFLF CCWKAICNS CELTNITIAI EKEECRFCIS INTTWCAGYC YTRDLVYKDP

[0130] 61 ARPKIQTCT FKELVYETVR VPGCAHHADS LYTPVATQC HCGKCDSDST DCTVRGLGPS

[0131] 121 YCSFGEMKE

[0133] **서열번호 2**

[0134] Human Chorionic Gonadotrophin beta polypeptide

[0135] Accession number NP_000728

[0136] Nucleotide sequence of hCG beta

[0137] Nucleotide sequence

[0138] 1 atggagatgt tccaggggct gctgctgttg ctgctgctga gcatgggcgg gacatgggca

[0139] 61 tccaaggagc cgcttcggcc acggtgccgc cccatcaatg ccacctggc tgtggagaag

[0140] 121 gagggctgcc ccgtgtgcat caccgtcaac accacatct gtgccggcta ctgccccacc

[0141] 181 atgacccgcg tgctgcaggg ggtcctgccg gccctgcctc aggtgggtgtg caactaccgc

[0142] 241 gatgtgcgct tcgagtccat ccggtccctt ggctgcccgc gcggcgtgaa ccccggtggtc

[0143] 301 tcctacgccg tggtctctcag ctgtcaatgt gcactctgcc gccgcagcac cactgactgc

[0144] 361 ggggggtccca aggaccaccc cttgacctgt gatgaccccc gcttccagga ctctcttcc

[0145] 421 tcaaaggccc ctccccccag cttccaagt ccatcccgac tcccggggcc ctcgacacc

[0146] 481 ccgatcctcc cacaataa

[0147] Protein sequence of hCG beta

[0148] 1 MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT

[0149] 61 MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC

[0150] 121 GGPKEHPLTC DDPRFQDSS SKAPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ

[0152] **서열번호 3**

[0153] Beta-galactoside alpha-2,3-시알릴트랜스퍼라제 4

[0154] Accession Number L23767

[0155] Nucleotide sequence of ST3GAL4

[0156] 1 ATGTGTCTCG CAGGCTGGAA GCTCCTGGCC ATGTTGGCTC TGGTCCTGGT CGTCATGGTG

[0157] 61 TGGTATTCCA TCTCCCGGA AGACAGGTAC ATCGAGCTTT TTTATTTTCC CATCCCAGAG

[0158] 121 AAGAAGGAGC CGTGCCTCCA GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG CCTCTAAGCT CTTTGGCAAC

[0159] 181 TACTCCCGGG ATCAGCCCAT CTTCTGCGG CTTGAGGATT ATTTCTGGGT CAAGACGCCA

[0160] 241 TCTGCTTACG AGTGCCCTA TGGGACCAAG GGGAGTGAGG ATCTGCTCCT CCGGGTGCTA

[0161] 301 GCCATACCA GCTCTCCAT CCCCAGAAG ATCCAGAGCC TCAGGTGCCG CCGCTGTGTG

[0162] 361 GTCGTGGGA ACGGGCACCG GCTGCGAAC AGCTCACTGG GAGATGCCAT CAACAAGTAC

[0163] 421 GATGTGGTCA TCAGATTGAA CAATGCCCCA GTGGCTGGCT ATGAGGGTGA CGTGGGCTCC

[0164] 481 AAGACCACCA TCGTCTCTT CTACCCTGAA TCTGCCACT TCGACCCAA AGTAGAAAAC

[0165] 541 AACCCAGACA CACTCCTCGT CCTGGTAGCT TTCAAGCAA TGGACTTCCA CTGGATTGAG

[0166] 601 ACCATCCTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCGA AAGGGTTTCT GGAAACAGCC TCCCCTCATC

[0167] 661 TGGGATGTCA ATCCTAAACA GATTCGGATT CTCAACCCCT TCTTCATGGA GATTGCAGCT

[0168] 721 GACAAACTGC TGAGCCTGCC AATGCAACAG CCACGGAAGA TTAAGCAGAA GCCCACCACG

[0169] 781 GGCCTGTTGG CCATCACGCT GGCCCTCCAC CTCTGTGACT TGGTGCACAT TGCCGGCTTT

[0170] 841 GGCTACCCAG ACGCTACAA CAAGAAGCAG ACCATTCAT ACTATGAGCA GATCACGCTC

[0171] 901 AAGTCCATGG CGGGGTCAGG CCATAATGTC TCCAAGAGG CCCTGGCCAT TAAGCGGATG

[0172] 961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCACG TCCTTCTGA

[0173] Protein Sequence of ST3GAL4

[0174] 1 MCPAGWLLA MLALVLVVMV WYSISREDRY IELFYFPIPE KKEPCLQGEA ESKASKLFGN

[0175] 61 YSRDQPIFLR LEDYFVWKTP SAYELPYGTK GSEDLRLVL AITSSSIPKN IQSLRCRRCV

[0176] 121 VVGNGHRLRN SSLGDAINKY DVVIRLNNAP VAGYEGDVGS KTTMRLFYPE SAHFDPKVEN

[0177] 181 NPDTLVLVA FKAMDFHWIE TILSDKKRVR KGFWKQPPLI WDVNPKQIRI LNPFFMEIAA

[0178] 241 DKLLSLPMQQ PRKIKQKPTT GLLAITLALH LCDLVHIAGF GYPDAYNKKQ TIHYEQITL

[0179] 301 KSMAGSGHNV SQEALAIKRM LEMGAIKNLT SF

[0181] **서열번호 4**

[0182] Beta-galactosamide alpha-2,6-시알릴트랜스퍼라제 1

[0183] Accession number NM_003032

[0184] Nucleotide sequence of ST6GAL1

[0185] 1 atgattcaca ccaacctgaa gaaaaagttc agctgctgcg tcctggctctt tcttctgttt

[0186] 61 gcagtcattc gtgtgtggaa ggaaaagaag aaaggagatt actatgattc ctttaaattg

[0187] 121 caaaccaagg aattccaggt gttaaagagt ctggggaaat tggccatggg gtctgattcc

[0188] 181 cagtctgtat cctcaagcag caccaggac cccacaggg gccgccagac cctcggcagt

[0189] 241 ctgaggagcc tagccaaggc caaacagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc

[0190] 301 tcttccaaaa accttatccc taggctgcaa aagatctgga agaattacct aagcatgaac

[0191] 361 aagtacaaag tgcctacaa ggggccagga ccaggcatca agttcagtc agaggccctg

[0192] 421 cgctgccacc tccgggacca tgtgaatgta tccatgtag aggtcacaga ttttcccttc

[0193] 481 aatacctctg aatgggaggg ttatctgccc aaggagagca ttaggaccaa ggctgggcct

[0194] 541 tggggcaggt gtgctgttgt gtcgtcagcg ggatctctga agtcctcca actaggcaga

[0195] 601 gaaatcgatg atcatgacgc agtcctgagg tttaatgggg caccacagc caacttcaa

[0196] 661 caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctcagttggt taccacagag

[0197] 721 aagcgcttcc tcaaagacag ttgtlacaat gaaggaatcc taattgtatg ggacctatct

[0198] 781 gtataccact cagatatccc aaagtgggtac cagaatccgg attataattt ctttaacaac

[0199] 841 tacaagactt atcgtaagct gcacccaat cagccctttt acatcctcaa gcccagatg

[0200] 901 ccttgggagc tatgggacat tcttcaagaa atctccccag aagagattca gccaaacccc

[0201] 961 ccactcctctg ggatgcttgg tatcatcacc atgatgacgc tgtgtgacca ggtggatatt

[0202] 1021 tatgagttcc tcccatccaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc

[0203] 1081 gatagtgcct gcacgatggg tgcctaccac ccgctgctct atgagaagaa tttggtgaag

[0204] 1141 catctcaacc agggcacaga tgaggacatc tacctgcttg gaaaagccac actgcctggc

[0205] 1201 ttccggacca ttcactgcta a

[0206] Op-Protein Sequence of ST6GAL1

[0207] 1 mihtnlkkkf scvvlvllf avicvwkek kgsyysfkl qtkefvqlks lgklamgsds

[0208] 61 qsvsssstqd phrgrqtls lrglakakpe asfvwnkds ssknliprlq kiwknylsmn

[0209] 121 kykvsykpgp pgikfsaeal rchlrhvnv smvevtdfpf ntsewegylp kesirtkagp

[0210] 181 wgrcavvssa gslkssqlgr eiddhdavlr fngaptanf qdvgtkttir lmnsqlytte

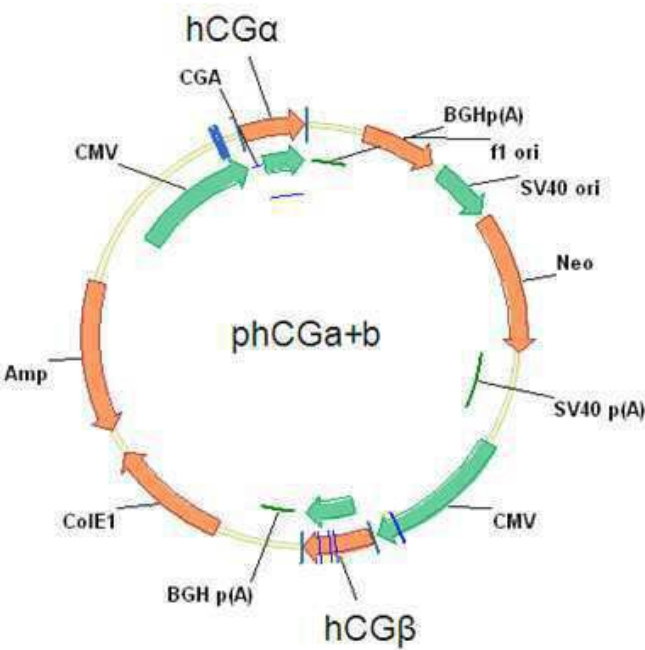
[0211] 241 krflkdslyn egilivdps vyhsdipkwy qnpdynffnn yktyrklhpn qpfyilkpqn

[0212] 301 pwelwdilqe ispeeiqnp pssgmlgiii mmtlcdqvdi yeflpskrkt dvcyyyqkff

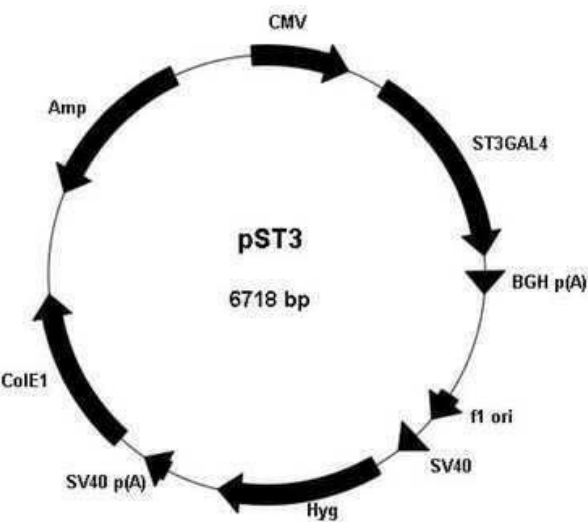
[0213] 361 dsactmgayh pllyeknlvk hlnqgtdedi yllgkatlpg frtihc

도면

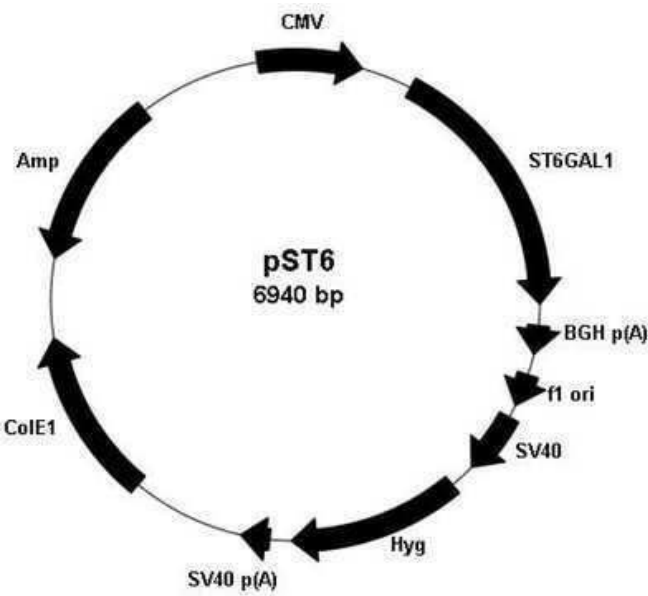
도면1



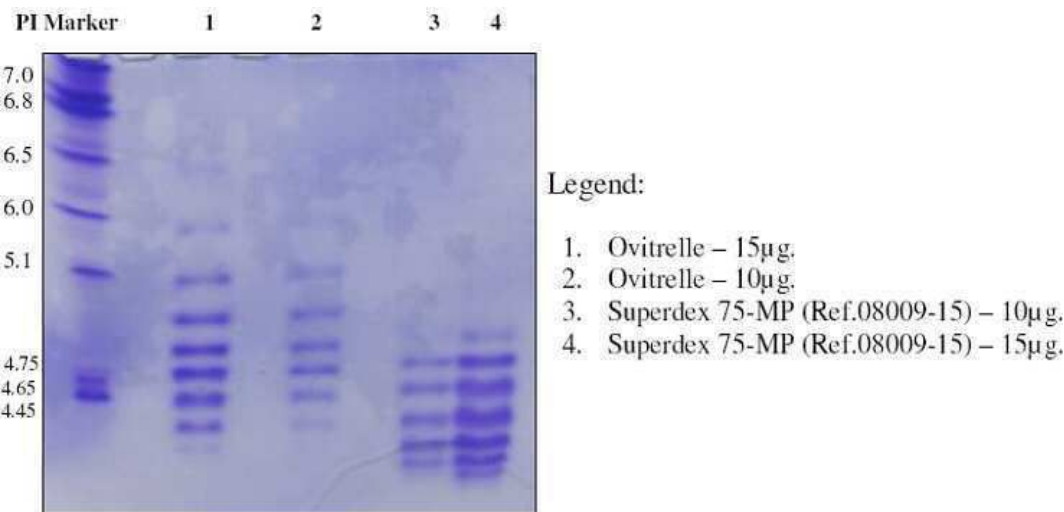
도면2



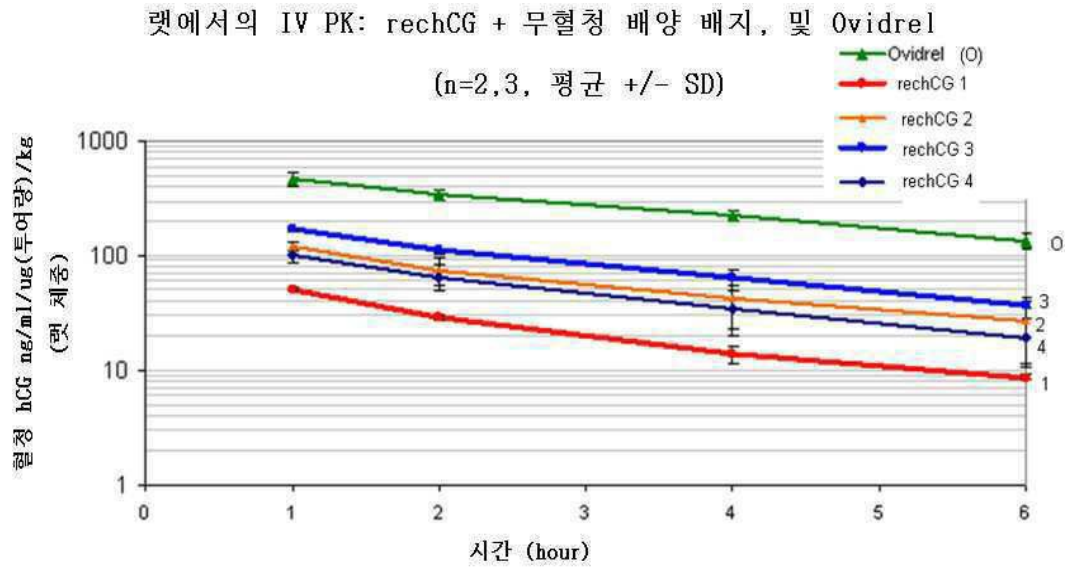
도면3



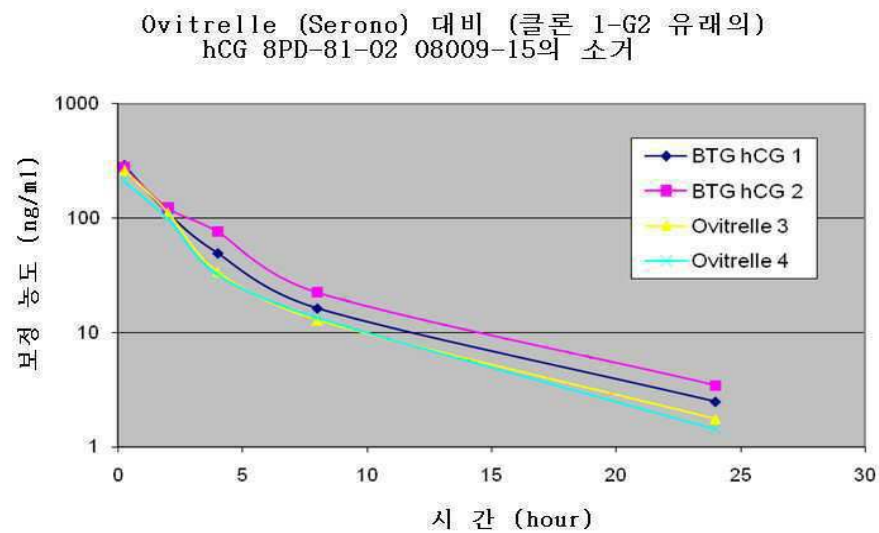
도면4



도면5



도면6



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Ferring International Center SA

<120> Pharmaceutical Preparation

<130> P/60201.W001

<150> EP 09252360.4

<151> 2009-10-05

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID 1 Nucleotide Sequence of hCG alpha

<400> 1

atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggtca cattgtcggg gtttctgcat	60
gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca	120
ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattg gctgctgctt ctctagagca	180
tatcccactc cactaaggtc caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag	240
tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagt	300
gagaaccaca cgcggtgcca ctgcagtact tgttattatc acaaatctta a	351

<210> 2

<211> 498

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID 2 Nucleotide Sequence of hCG beta

<400> 2

atggagatgt tccaggggct gctgctgttg ctgctgctga gcatgggcgg gacatgggca	60
tccaaggagc cgcttcggcc acgggtgccg cccatcaatg ccaccctggc tgtggagaag	120
gagggctgcc ccgtgtgcat caccgtcaac accaccatct gtgccggcta ctgccccacc	180
atgaccgcgg tgctgcaggg ggtcctgccg gccctgcctc aggtggtgtg caactaccgc	240
gatgtgcgct tcgagtccat ccggtccctt ggctgcccgc gcggcgtgaa ccccggtgct	300
tcctacgcgg tggtctcag ctgtcaatgt gcactctgcc gccgcagcac cactgactgc	360
gggggtccca aggaccacc cttgacctgt gatgaccccc gcttccagga ctctcttcc	420
tcaaaggccc ctccccccag ctttccaagt ccatcccgac tcccggggcc ctcggaacc	480
ccgatcctcc cacaataa	498

<210> 3

<211> 999

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID 3 Nucleotide Sequence ST3GAL4

<400> 3

atgtgtcctg caggctggaa gctcctggcc atgttggctc tggtcctggt cgtcatggtg 60
 tggattacca tctccccgga agacaggtac atcgagcttt tttattttcc catcccagag 120
 aagaaggagc cgtgcctcca gggtaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggcaac 180
 tactccccgg atcagcccat ctctctgcgg cttagaggatt atttctgggt caagacgcca 240
 tctgcttacg agctgcccta tgggaccaag gggagtgagg atctgctcct ccgggtgcta 300

gccatcacca gctcctccat cccaagaac atccagagcc tcaggtagcg ccgctgtgtg 360
 gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgcat caacaagtac 420
 gatgtgtgca tcagattgaa caatcccca gtggctggct atgagggtga cgtgggctcc 480
 aagaccacca tgcgtctctt ctacctgaa tctgccact tcgacccaa agtagaaaac 540
 aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag 600
 accatcctga gtgataagaa gcgggtgcga aagggtttct ggaaacagcc tccctcatc 660
 tgggatgtca atcctaaca gattcggatt ctcaaccct tcttcattga gattgcagct 720

gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gccaccacg 780
 ggctgttgg ccatcacgct ggccctccac ctctgtgact tggtagcat tgccggttt 840
 ggctaccag acgcctaca caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc 900
 aagtccatgg cggggtcagg ccataatgtc tccaagagg ccctggccat taagcggatg 960
 ctggagatgg gagctatcaa gaacctcacg tctttctga 999

<210> 4

<211> 1221

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID 4 Nucleotide Sequence of ST6GAL1

<400> 4

atgattcaca ccaacctgaa gaaaaagttc agctgctgcg tcttggcttt tcttctgttt 60
 gcagtcattt gtgtgtggaa ggaaaagaag aaaggagtt actatgattc ctttaaattg 120
 caaccaagg aattccaggt gttaaagat ctggggaaat tggccatggg gcttgattcc 180
 cagtctgtat cctcaagcag caccaggac cccacaggg gccgccagac cctcggcagt 240
 ctgagaggcc tagccaaggc caaaccagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc 300
 tcttcaaaa accttatccc taggctgcaa aagatctgga agaattacct aagcatgaac 360
 aagtacaaag tgcctacaa ggggccagga ccaggcatca agttcagtgc agaggccctg 420
 cgctgccacc tccgggacca tgtgaatgta tccatggtag aggtcacaga ttttccttc 480

aatacctctg aatgggaggg ttatctgccc aaggagagca ttaggaccaa ggctgggcct 540
 tggggcaggt gtgctgttgt gtcgtcagcg ggatctctga agtcctccca actaggcaga 600
 gaaatcgatg atcatgacgc agtcctgagg tttaatgggg caccacagc caacttccaa 660
 caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctcagttagt taccacagag 720
 aagcgcttcc tcaaagacag tttgtacaat gaaggaatcc taattgtatg ggacccatct 780
 gtataccact cagatatccc aaagtggtag cagaatccgg attataattt cttaacaac 840

tacaagactt atcgtaagct gcacccaat cagccctttt acatcctcaa gcccagatg 900
 ccttgggagc tatgggacat tcttcaagaa atctccccag aagagattca gccaaacccc 960
 ccatcctctg ggatgcttgg tatcatcatc atgatgacgc tgtgtgacca ggtggatatt 1020
 tatgagttcc tcccatccaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc 1080
 gatagtgcct gcacgatggg tgcctaccac ccgtgctct atgagaagaa ttgtgtgaag 1140
 catctcaacc agggcacaga tgaggacatc tacctgcttg gaaaagccac actgcctggc 1200
 ttccggacca ttcactgcta a 1221

<210> 5

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Sequence of hCG alpha

<400> 5

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

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Sequence of hCG beta

<400> 6

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

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Sequence of ST3GAL4

<400> 7

Met Cys Pro Ala Gly Trp Lys Leu Leu Ala Met Leu Ala Leu Val Leu

1 5 10 15

Val Val Met Val Trp Tyr Ser Ile Ser Arg Glu Asp Arg Tyr Ile Glu

20 25 30

Leu Phe Tyr Phe Pro Ile Pro Glu Lys Lys Glu Pro Cys Leu Gln Gly

35 40 45

Glu Ala Glu Ser Lys Ala Ser Lys Leu Phe Gly Asn Tyr Ser Arg Asp

50 55 60

Gln Pro Ile Phe Leu Arg Leu Glu Asp Tyr Phe Trp Val Lys Thr Pro

65 70 75 80

Ser Ala Tyr Glu Leu Pro Tyr Gly Thr Lys Gly Ser Glu Asp Leu Leu

85 90 95

Leu Arg Val Leu Ala Ile Thr Ser Ser Ser Ile Pro Lys Asn Ile Gln

100 105 110

Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys Val Val Val Gly Asn Gly His Arg Leu

115 120 125

Arg Asn Ser Ser Leu Gly Asp Ala Ile Asn Lys Tyr Asp Val Val Ile

130 135 140

Arg Leu Asn Asn Ala Pro Val Ala Gly Tyr Glu Gly Asp Val Gly Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Val Glu Asn Asn Pro Asp Thr Leu Leu Val Leu Val Ala Phe Lys

180 185 190

Ala Met Asp Phe His Trp Ile Glu Thr Ile Leu Ser Asp Lys Lys Arg
 195 200 205
 Val Arg Lys Gly Phe Trp Lys Gln Pro Pro Leu Ile Trp Asp Val Asn
 210 215 220
 Pro Lys Gln Ile Arg Ile Leu Asn Pro Phe Phe Met Glu Ile Ala Ala
 225 230 235 240

Asp Lys Leu Leu Ser Leu Pro Met Gln Gln Pro Arg Lys Ile Lys Gln
 245 250 255
 Lys Pro Thr Thr Gly Leu Leu Ala Ile Thr Leu Ala Leu His Leu Cys
 260 265 270
 Asp Leu Val His Ile Ala Gly Phe Gly Tyr Pro Asp Ala Tyr Asn Lys
 275 280 285
 Lys Gln Thr Ile His Tyr Tyr Glu Gln Ile Thr Leu Lys Ser Met Ala
 290 295 300

Gly Ser Gly His Asn Val Ser Gln Glu Ala Leu Ala Ile Lys Arg Met
 305 310 315 320
 Leu Glu Met Gly Ala Ile Lys Asn Leu Thr Ser Phe
 325 330

<210> 8

<211> 406

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Sequence of 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			
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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer CGa-fw

<400> 9

ccaggatccg ccaccatgga ttactacaga aaaatatgc 39

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer CGa-rev

<400> 10

ggatggctag cttaagattt gtgataataa c 31

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer CGb-fw

<400> 11

ccaggcgcg caccatggag atgttccagg ggctgc	36
<210> 12	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer CGb-rev	
<400> 12	
ccgggttaac ttattgtggg aggatcgggg	30
<210> 13	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer 2,3STfw	
<400> 13	
ccaggatccg ccaccatgtg tcctgcaggc tggaagc	37
<210> 14	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer 2,3STrev	
<400> 14	
tttttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg	35
<210> 15	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer 2,6STfw	
<400> 15	
ccaggatccg ccaccatgat tcacaccaac ctgaag	36
<210> 16	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> PCR Primer 2,6STrev

<400> 16

tttttttctt aagtttagcag tgaatggtcc gg

32