



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년05월23일
(11) 등록번호 10-1622944
(24) 등록일자 2016년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/59 (2006.01) A61K 38/24 (2006.01)
A61P 5/06 (2006.01) C12N 15/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7025581
(22) 출원일자(국제) 2009년04월16일
심사청구일자 2014년04월07일
(85) 번역문제출일자 2010년11월15일
(65) 공개번호 10-2011-0005863
(43) 공개일자 2011년01월19일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2009/000978
(87) 국제공개번호 WO 2009/127826
국제공개일자 2009년10월22일
(30) 우선권주장
08251528.9 2008년04월25일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/045,424 2008년04월16일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2003035686 A2*
US20060234352 A1
Journal of Clinical Endocrinology and
Metabolism Vol.79(3):756-759 (1994)*
Human Reproduction Vol.15(9):1898-1902 (2000)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
페링 인터내셔널 센터 에스 에이
스위스 씨에이치-1162 쾅 프레 슈멩 드 라 베르고
노사 50
(72) 발명자
코팅햄 이안
스위스 씨에이치-1162 쾅 프레 슈멩 드 라 베르고
노사 50 페링 인터내셔널 센터 에스.에이.
플락신 다니엘
스위스 1162 쾅 프레 슈멩 드 라 베르고노사 50
페링 인터내셔널 센터 에스.에이.
화이트 리처드 보이드
미국 92103 캘리포니아주 샌 디에고 슈터 스트리트 1348
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 $\alpha 2,3$ - 및 $\alpha 2,6$ -시알화를 포함하는 재조합 FSH

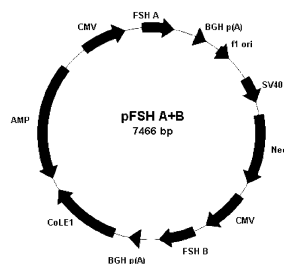
(57) 요약

본 발명은 재조합 FSH(rFSH)를 포함하는 조제물에 관한 것이다.

대표도 - 도1

도 1, 2 및 3: pFSH α 1/p β 1, pST3 및 pST6 발현 벡터의 플라스미드 맵. CMV = 사이토메갈로바이러스 프로모터, BGH p(A) = 소 성장 호르몬 폴라-아데닐화 서열, fl ori = fl 복제 오리진, SV40 = 유인원 바이러스 40 프로모터, Neo = 네오마이신 내성 마커, Hyg = 히그로마이신 내성 마커, SV40 p(A) = 유인원 바이러스 40 폴라-아데닐화 서열, FSH A = 여포 자극 호르몬 알파 폴리펩타이드, FSH B = 여포 자극 호르몬 베타 폴리펩타이드, ST3GAL4 = $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제, ST6GAL1 = $\alpha 2,6$ -시알릴트랜스퍼라제, CoIE1 = CoIE1 복제 오리진, Amp = 암피실린 내성 마커.

도 1. FSH 발현 벡터



명세서

청구범위

청구항 1

α 2,3-시알화(sialylation) 및 α 2,6-시알화를 포함하는 재조합 FSH(rFSH)로서,
총 시알화의 60% 이상이 α 2,3-시알화이고, 총 시알화의 5 - 20%가 α 2,6-시알화인 재조합 FSH.

청구항 2

제1항에 있어서, 시알산을 6 mol/mol 이상의 함량[단백질 몰 수에 대한 시알산의 몰 수 비율로 표시됨]으로 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 3

제1항에 있어서, 시알산을 6 mol/mol - 15 mol/mol의 함량으로 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 4

제1항에 있어서, 총 시알화의 80% 이상이 α 2,3-시알화이고, 총 시알화의 5 - 20%가 α 2,6-시알화인 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 5

제1항에 있어서, 총 시알화의 65 - 85% 함량으로 α 2,3-시알화를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 6

제1항에 있어서, 총 시알화의 70 - 80% 함량으로 α 2,3-시알화를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 7

제1항에 있어서, 총 시알화의 10 - 15% 함량으로 α 2,6-시알화를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 8

제1항에 있어서, 총 시알화의 10 - 20% 함량으로 α 2,6-시알화를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 9

제1항에 있어서, α 2,8-시알화를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 10

제1항에 있어서, 시알산의 함량이 6 중량% 이상인 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 11

제1항에 있어서, 인간 세포주에서 생산 또는 발현되는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 12

제1항에 있어서, Per.C6 세포주에서 생산 또는 발현되는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 세포주는 α 2,3-시알릴트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 14

제11항에 있어서, 내인성 시알릴 트랜스퍼라제 활성에 의해 제공되는 $\alpha 2,6$ -연결된 시알산($\alpha 2,6$ 시알화)을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 FSH.

청구항 15

$\alpha 2,3$ -시알화와 $\alpha 2,6$ -시알화를 함유하는 rFSH를 포함하되, 총 시알화의 60% 이상이 $\alpha 2,3$ -시알화이고, 총 시알화의 5 - 20%가 $\alpha 2,6$ -시알화인, 불임 치료용 약학 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 재조합 FSH를 포함하는, 불임 치료용 약학 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, hCG 및 LH 중 하나 이상을 더 포함하는 약학 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서, hCG 및 LH 중 하나 이상을 더 포함하는 약학 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 불임 치료에 사용하기 위한 고나도트로핀에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 여포 자극 호르몬(FSH)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고나도트로핀은 남성과 여성에서 생식선의 기능을 조절하는 이형이량체 당단백질 호르몬의 한 그룹이다. 이러한 것으로는 여포 자극 호르몬(FSH), 황체화 호르몬(LH) 및 융모막 고나도트로핀(CG)이 있다.

[0003] FSH는 본래 뇌하수체 전엽에서 분비되며, 여포 발생 및 배란을 지원하는 기능을 한다. FSH는, 다른 당단백질 호르몬인 LH 및 CG에서도 공통적인, 92개의 아미노산으로 구성된 α 서브유닛과, 호르몬의 생물학적 특이성을

부여하는 FSH에 고유한, 111개의 아미노산으로 구성된 베타 서브유닛을 포함한다(Pierce and Parsons, 1981). 각 서브유닛은 복잡한 탄수화물 잔기의 부가에 의해 번역 후 변형된다. 이들 2가지 서브유닛은 N-연결된 글리칸을 부착하기 위한 2가지 부위를 가지고 있는데, 알파 서브유닛은 52번과 78번 아미노산이고, 베타 서브유닛은 7번과 24번 아미노산이다(Rathnam and Saxena, 1975, Saxena and Rathnam, 1976). 즉, FSH는 30 중량% 정도로 당화된다(Dias and Van Roey, 2001, Fox *et al.* 2001).

[0004] 폐경기를 거친 인간의 소변으로부터 정제된 FSH는 다년간 불임 치료제로 사용되고 있으며, 자연 생식에서 배란을 자극하며, 보조 생식술에서는 난모 세포를 제공하는데 사용된다. FSH의 2가지 재조합 버전인, Gonal-F (Serono) 및 Puregon (Organon)은 1990년대 중반에 시판되기 시작하였다. 이것은 모두 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 발현시킨다(Howles, 1996).

[0005] FSH 조제물은 존재하는 다양한 이소형들의 양적 차이와 관련하여 상당한 이질성을 가진다. 각각의 FSH 이소형들은 동일한 아미노산 서열을 가지지만, 번역 후 번역되는 수준에는 차이가 있으며, 개개 이소형들은 탄수화물 분지 구조의 이질성과 시알산(말단 당)의 혼입 양 차이로 특정화되는데, 이러한 특징들은 특정 이소형의 생물활성(bioactivity)에 영향을 미치는 것으로 보인다.

[0006] 천연 FSH의 당화는 매우 복잡하다. 천연 기원의 뇌하수체 FSH는, 글리칸이 바이-, 트리- 및 테트라-안테너리 글리칸 조합을 포함할 수 있는 매우 다양한 구조를 포함할 수 있다(Pierce and Parsons, 1981, Ryan *et al.*, 1987, Baenziger and Green, 1988). 글리칸은 다른 변형, 즉 코어 푸코스화(core fucosylation), 양분성 글루코사민(bisecting glucosamine), 아세틸 락토사민에 의해 연장된 체인, 부분 또는 완전한 시알화(sialylation), $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ 연결을 이용한 시알화, 및 갈락토스를 치환하는 황산화된 갈락토스아민을 포함할 수 있다(Dalpathado *et al.*, 2006). 또한, 각각의 당화 부위에 대한 글리칸 구조체의 분포에 차이가 있다. 개체의 혈청과 폐경기 여성의 뇨로부터 유래된 FSH에서는 비슷한 수준의 글리칸 복잡도가 확인되었다(Wide *et al.*, 2007).

[0007] 재조합 FSH 산물의 당화는 숙주 세포주에 존재하는 글리코실-트랜스퍼라제의 범위를 반영한다. 기존의 rFSH 산물들은 조작된 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포)로부터 유래된 것이다. CHO 유래 rFSH에서의 글리칸의 변형 범위는, 뇌하수체 추출물이나 뇨로부터 유래된 천연 산물에서 보여지는 범위 보다 더 제한적이다. CHO 유래의 rFSH에서 확인되는 글리칸에서 이질성이 감소된 예는, 양분성 글루코사민의 결핍과, 코어 푸코스화 수준 및 아세틸 락토사민 수준의 양적 감소이다(Hard *et al.*, 1990). 또한, CHO 세포는 오직 $\alpha 2,3$ 연결로만 시알산을 부가할 수 있다(Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). 이러한 점은, $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ -연결된 시알산이 혼성으로 존재하는 글리칸을 포함하는 천연 FSH 산물과의, 차이점이다.

[0008] 재조합 FSH 조제물은, 뇌하수체, 혈청 또는 폐경기 뇨 유래의 FSH와 비교하여, 등전점(pI)이 4 미만인 FSH의 함량에 차이가 있는 것으로 확인되었다(Ulloa-Aguirre *et al.* 1995). 뇨 유래 조제물내 산성 이소형의 함량은 재조합 산물인 Gonal-f (Serono)과 Puregon (Organon)에 비해 훨씬 많다(Andersen *et al.* 2004). FSH에서 음으로 하전된 황산화된 글리칸의 함량이 낮기 때문에, rFSH내 시알산의 낮은 몰량을 반영하여야 한다. 천연 FSH에 비해 낮은 시알산 함량은 시판되는 2가지 FSH 제품들의 특징이므로, 제조 과정에서 한계를 반영하여야 한다(Bassett and Dribergen, 2005).

[0009] 개체와 배란 주기 코스에 따른 변화들에서, FSH의 당화 변동성을 분석하고 설명하고자 하는 방대한 과학적 연구들이 있다. 주요 논의 내용들 중 한가지는, FSH 농도와 시알산 함량 모두 배란 주기에서 배란 전 단계에서 감소된다는 관찰 결과에 관한 것이다. 시알산의 함량 감소로 인해 염기성 수준이 높은 FSH가 생산되는데, 이것은 보다 신속하게 소거되며, 적어도 시험관내에서는 타겟 수용체에 더욱 효과적이다(Zambrano *et al.* 1996). 이러한 변화의 생물학적 관련성과 우세한 여포를 선택하는 방법에 대한 의문은 미해결된 상태이다(Ulloa-Aguirre, 2003).

[0010] FSH의 순환되는 일생은 다양한 소스의 자료들에서 언급되어 있다. 이러한 자료들 중 일부는, pI로 특정화되는 바와 같이, 분자의 총 전하를 토대로 분류하고 있는데, 강산일수록 음전하가 커진다. 기존에 언급된 바와 같이, 분자의 총 전하에 대한 주된 기여 인자는 각 FSH 분자의 시알산의 총 함량이다. 예컨대, rFSH (Organon)의 시알산 함량은 약 8 mol/mol이지만, 뇨-유래의 FSH는 시알산 함량이 더 높다(de Leeuw *et al.* 1996). 래트에서의 이들의 혈장내 소거율은 0.34 및 0.14 ml/min이다(Ulloa-Aguirre *et al.* 2003). 재조합 FSH 샘플을 높은 pI 분획과 낮은 pI 분획으로 나눈 다른 예에서, 높은 pI 분획(시알산 함량이 낮음)의 생체내 효능은 낮았으며, 혈장내 반감기는 더 짧았다(D'Antonio *et al.* 1999). 또한, 배란 주기의 후기 단계에서의, 염기성이 보다 강한 FSH의 순환은 에스트라디올 수준 증가에 의해 야기되는 뇌하수체 전엽에서의 $\alpha 2,3$ 시알릴-트랜스퍼라

제의 하향-조절로 인한 것이다(Damian-Matsumura *et al.* 1999, Ulloa-Aguirre *et al.* 2001). $\alpha 2,6$ 시알릴-트랜스퍼라제에 대한 결과는 보고되지 않았다.

[0011] FSH 및 rFSH에서 시알산의 총 양은, 시알산이 대개 2가지 방식으로 연결되어 있기 때문에 직접 비교할 수는 없다. 뇌하수체/혈청/노내 FSH는 $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ -연결된 시알산 둘다를 함유하고 있으며, 전자가 훨씬 많다. 그러나, CHO 세포 유래의 재조합 산물은 $\alpha 2,3$ 만 함유하고 있다(Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). 이런 점은, $\alpha 2,6$ -연결된 시알산이 전반적으로 함량이 낮다는 것 외에도, 천연 산물과 현행 재조합 산물 간의 또다른 차이이다.

[0012] CHO 세포는 일반적으로 약제학 용도의 인간 재조합 단백질을 생산하는데 사용되고 있다. 구조 분석을 통해, 시알산은 $\alpha 2,3$ -연결에 의해서만 부착되어 있는 것으로 확인되었다(Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). 다수의 인간 당단백질들은 $\alpha 2,3$ - 및 $\alpha 2,6$ -연결을 혼합하여 포함하고 있다. 따라서, CHO 시스템을 이용하여 발현되는 재조합 단백질은 말단의 시알산 연결 타입이 천연 단백질과 다를 것이다. 이런 점은, 탄수화물 모이어티가 분자의 약리학적 속성에 기여할 수 있기 때문에, 약제학적 용도의 생물학적 약제를 생산하는데 고려해야할 중요한 사항이다.

[0013] 인간 뇨로부터 제조된 산물의 생리화학적 프로파일과 약동학적 프로파일을 매우 유사하게 복제하거나 모방하는 rFSH 산물이 바람직하다. 기존의 재조합 산물과 비교하여 개선된 약동학적 특성과 특성들을 가진 rFSH 산물이 바람직하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0014] (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) Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, and Lopez FJ. (1997) Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol*. 11(5), 517-526.

(비특허문헌 0003) Baenziger JU and Green ED. (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*. 947(2), 287-306.

(비특허문헌 0004) Bassett RM, and Drievergen R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reprod Biomed Online*. 10(2), 169-177.

(비특허문헌 0005) Damian-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sanchez-Hernandez C, Timossi C, and Ulloa-Aguirre A. (1999). Oestrogens regulate pituitary $\alpha 2,3$ -sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol*. 23(2), 153-165.

(비특허문헌 0006) 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 0007) Dalpathado DS, Irungu J, Go EP, Butnev VY, Norton K, Bousfield GR, and Desaire H. (2006). Comparative glycomics of the glycoprotein follicle stimulating hormone: glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry*. 45(28), 8665-8673. No copy

(비특허문헌 0008) Dias JA, Van Roey P. (2001). Structural biology of human follitropin and its receptor. *Arch Med Res*. 32(6), 510-519

(비특허문헌 0009) 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 0010) Flack, M.R., Bennet, A.P., Froehlich, J. Anasti, JN and Nisula, B. (1994). Increased biological activity due to basic isoforms in recombinant human follicle-stimulating hormone

produced in a human cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79, 756-760

(비특허문헌 0011) Fox KM, Dias JA, and Van Roey P. (2001). Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol.* 15(3), 378-89

(비특허문헌 0012) Grabenhorst E, Hoffmann A, Nimtz M, Zettlmeissl G, and Conradt HS. (1995). Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(beta 1-4)GlcNAc-R alpha 2,6-sialyltransferase alpha 2,6-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(beta 1-4)GlcNAc(beta 1-2)Man(alpha 1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant beta-trace protein. *Eur J Biochem.* 232(3), 718-25.

(비특허문헌 0013) Green ED and Baenziger JU. (1988). Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem.* 263(1), 36-44.

(비특허문헌 0014) Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T. and Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. *G Nucleic Acids Res.* 18 (3), 667

(비특허문헌 0015) Howles, C.M. (1996). Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Hum Reprod. Update*, 2, 172-191.

(비특허문헌 0016) 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 0017) Keene, J.L., Matzuk, M.M., Otani, T., Fauser, B.C.J.M., Galway, A.B., Hsueh, A.J.W. and Boime, I. (1989). Expression of Biologically active Human Follitropin in Chinese Hamster Ovary Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(9), 4769-4775.

(비특허문헌 0018) Kitagawa, H. and Paulson, J.C (1994) Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem.* 269(2), 1394-1401.

(비특허문헌 0019) Lee EU, Roth J, and Paulson JC (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem.* 264(23), 13848-13855.

(비특허문헌 0020) de Leeuw, R., Mulders, J., Voortman, G. Rombout, F. Damm, J. and Kloosterboer, L. (1996) Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 361-369.

(비특허문헌 0021) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1), 265-75.

(비특허문헌 0022) 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 0023) Pierce JG, and Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function *Annu Rev Biochem.* 50, 465-495.

(비특허문헌 0024) Pricer WE Jr, and Ashwell G. (1971). The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem.* 246(15), 4825-33.

(비특허문헌 0025) Rathnam P, and Saxena BB. (1975). Primary amino acid sequence of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit. *J Biol Chem.*;250(17):6735-6746.

(비특허문헌 0026) Regoeczi E, Debanne MT, Hatton MC, and Koj A. (1978) Elimination of asialofetuin and asialoorosomucoid by the intact rat. Quantitative aspects of the hepatic clearance mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 541(3), 372-84.

- (비특허문헌 0027) 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 0028) Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO and Vutyavanich T. (1987). Structure-function relationships of gonadotropins. *Recent Prog Horm Res.*;43,:383-429.
- (비특허문헌 0029) Saxena BB and Rathnam P. (1976) Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. *J Biol Chem.* 251(4), 993-1005
- (비특허문헌 0030) 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 0031) Steer CJ, and Ashwell G. (1980) Studies on a mammalian hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. Evidence for receptor recycling in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 255(7), 3008-13.
- (비특허문헌 0032) 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 0033) 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 0034) Timossi CM, Barrios de Tomasi J, Zambrano E, Gonzalez R, Ulloa-Aguirre A. (1998). A naturally occurring basically charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity in vitro. *Neuroendocrinology.* 67(3), 153-163.
- (비특허문헌 0035) Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, Gonzalez-Suarez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM, and Ulloa-Aguirre A. (2000). Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol.* 165(2), 193-205.
- (비특허문헌 0036) Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damian-Matsumura, P. and Chappel, S.C. (1988) Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum. Reprod.* 3, 491-501.
- (비특허문헌 0037) Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damian-Matsumura, P. Jimenez, M, Zambrano, E and Diaz-Sanchez, V. (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.* 7, 23-30.
- (비특허문헌 0038) 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 0039) Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damian-Matsumura P, and Timossi C (2001). Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res.* 32(6), 520-532.
- (비특허문헌 0040) 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.
- (비특허문헌 0041) Van Lenten L, and Ashwell G. (1972) The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. Development of a quantitative inhibition assay. *J Biol Chem.* 247(14), 4633-40.
- (비특허문헌 0042) Wide, L. and Albertsson-Wikland, K. (1990) Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J.*

Clin. Endocrinol. Metab. 70, 271-276.

(비특허문헌 0043) Wide, L. and Bakos, O. (1993). More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. J. Clin. Endocrinol. Metab., 76, 885-889.

(비특허문헌 0044) Wide L, Naessen T, Sundstrom-Poromaa I, Eriksson K. (2007) Sulfonation and sialylation of gonadotropins in women during the menstrual cycle, after menopause, and with polycystic ovarian syndrome and in men. J Clin Endocrinol Metab.;92(11), 4410-4417.

(비특허문헌 0045) Zambrano E, Zarinan T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, and Ulloa-Aguirre A. (1999). Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. Endocrine. 10(2), 113-121.

(비특허문헌 0046) Zhang X, Lok SH, and Kon OL (1998) Stable expression of human alpha-2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. Biochim Biophys Acta. 1425(3), 441-452.

발명의 내용

[0015] 본 발명에서는 $\alpha 2,3$ 시알산 및 $\alpha 2,6$ 시알산, 및 선택적으로 $\alpha 2,8$ 시알산을 포함하는 재조합 FSH("rFSH" 또는 "recFSH")를 제공하는 것이다. 본 발명에 따른 rFSH(또는 RFSH 조제물)는 $\alpha 2,3$ -시알화가 전체 시알화의 10% 이상일 수 있으며, 예컨대 전체 시알화의 65-85%는 $\alpha 2,3$ -시알화될 수 있다. 본 발명의 rFSH(또는 rFSH 조제물)는 $\alpha 2,6$ -시알화가 전체 시알화의 50% 미만일 수 있으며, 예컨대 전체 시알화의 15 - 35%는 $\alpha 2,6$ -시알화될 수 있다. 본 발명의 rFSH (또는 rFSH 조제물)는 전체 시알화의 5% 이하가 $\alpha 2,8$ -시알화될 수 있으며, 예컨대 전체 시알화의 0.1-4%는 $\alpha 2,8$ -시알화될 수 있다. 본 발명에 따른 rFSH (또는 rFSH 조제물)에서 시알산 함량은 6 mol/mol 이상, 예컨대 6 mol/mol 내지 15 mol/mol일 수 있다[단백질 몰 수에 대한 시알산 몰 수 비율로 나타냄].

[0016] 본 출원인은, 시알산의 연결 타입, $\alpha 2,3$ - 또는 $\alpha 2,6$ - 타입이 FSH의 생물학적 소거에 놀라운 영향을 미칠 수 있다는 것을 발견하였다. CHO 세포주와는 반대로, 인간 세포주는 2가지의 $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ 연결에 의해 부착된 시알산을 가진 재조합 FSH를 발현할 수 있다. 실시예 4에서, 2가지 $\alpha 2,3$ - 및 $\alpha 2,6$ -연결된 시알산의 수준이 낮은 FSH 함유성 글리칸을 발현하는 재조합 FSH 세포주를 제조하였다(도 6). 시알산 함량(도 4)이 제한적인 이러한 염기성 물질은, 예상되는 바와 같이, 래트에서 순환계에서 매우 신속하게 소거되었다(도 7). 이 세포주를 $\alpha 2,6$ -시알릴-트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자를 추가하는 2차 조작 단계에 투입하였다(실시예 5). 그 결과 제조되는 rFSH는 시알산 함량이 낮았던 오리지날 물질에 비해 래트의 순환계에서 매우 신속하게 소거되었다(도 8). 천연의 생물 활성의 FSH에서, 시알산 부분은 $\alpha 2,6$ 연결되어 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 이러한 결과는 예상되지 못한 결과였다. $\alpha 2,6$ -시알화된 rFSH의 소거는 간에서 발견되는 탈시알로당단백질(ASGP) 수용체에 의해 매개되는 것으로 확인되었다(실시예 9). 이는 상기 수용체에 대한 다른 다량의 기질을 이용하여 ASGP 수용체를 일시적으로 차단시킴으로써 입증되었다. 탈시알로페투인에 의해 차단된 수용체를 이용하여, 고도로 시알화된 물질에 대해 예상된 소거를 복원시켰다(도 9). 이러한 현상은, 차단이 해결되고 $\alpha 2,6$ 연결된 고도로 시알화된 rFSH의 신속한 소거가 재개될 때까지, 수 시간동안 유지되었다.

[0017] $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ -연결된 시알산이 혼성된 재조합 FSH은, rFSH 및 $\alpha 2,3$ 시알릴트랜스퍼라제 둘다를 발현하도록 인간 세포주를 조작함으로써 제조하였다(실시예 4 및 5). 발현된 산물은 강산성이며, 2가지의 $\alpha 2,3$ - 및 $\alpha 2,6$ -연결된 시알산 혼성을 가지고 있다(도 6). 이것은 기존의 CHO 세포에서 발현된 rFSH를 능가하는 2가지 장점을 가지고 있는데, 한가지는 이 물질이 2가지의 시알릴트랜스퍼라제의 조합 활성으로 인해 보다 고도로 시알화되고, 두번째는 이 물질이 천연 FSH와 매우 유사하다는 것이다. $\alpha 2,3$ 연결된 시알산만 생산하고(Kagawa *et al*, 1988, Takeuchi *et al*, 1988, Svensson *et al*., 1990) 시알산 함량이 낮은(Ulloa-Aguirre *et al*. 1995., Andersen *et al*. 2004), CHO 세포 유래의 재조합 산물과 비교하여, 이것이 생물학적으로 보다 적합한 것으로 보인다.

[0018] 본 출원인은, 본 발명의 rFSH가, 다른 재조합 산물에 비해, 천연 인간 뇨 유래 산물의 생리화학적 및 약동학적

프로파일을 매우 유사하게 복제 또는 모방할 수 있다는 것을, 놀랍게도 확인하였다. 즉, 본 발명의 rFSH는 "천연" FSH와 매우 유사할 수 있다. 이는 용량 등에 유의한 이점을 가질 수 있다. 게다가, 인공적이지만 가능한 "천연"인 치료를 원할 수 있는 환자에게는 보다 "천연" 또는 보다 "인간"과 가까운 산물이 적합할 수 있다. 다른 재조합 산물에 비해 천연(예, 인간 뇨) FSH에 가까운 탄수화물(예, 글리칸) 구조를 가진 재조합 산물은 다른 이점(예, 약동학적 효과)이 있을 수 있다.

- [0019] 따라서, 본 발명은 $\alpha 2,3$ 및 $\alpha 2,6$ 시알산이 혼성되어 있어 천연 FSH에 매우 근접한 FSH 재조합 버전에 관한 것이다. IVF 기법에서 조절된 형태로 난소를 자극하고 배란을 유도하기 위해, 이 화합물을 사용하게 되면, 기존의 재조합 산물과 비교하여 난소를 더욱 천연적으로 자극하게 될 것이다.
- [0020] 본 발명은 $\alpha 2,3$ 시알산 및 $\alpha 2,6$ 시알산을 포함하는 재조합 FSH("rFSH" 또는 "recFSH")(및/또는 재조합 FSH 조제물)를 제공한다. rFSH 또는 rFSH 조제물은 선택적으로 $\alpha 2,8$ 시알화를 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 본원에서, 용어 "재조합 FSH 조제물"은 재조합 FSH를 포함하는, 예컨대 약제학적 용도의 조제물을 포함한다. 본 발명의 구현예에서, rFSH는 단일 이소형 또는 이소형 혼합물로서 존재할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 따른 rFSH (또는 rFSH 조제물)는 시알산을 6 mol/mol 이상, 예컨대 6 mol/mol - 15 mol/mol, 예컨대 8 mol/mol - 14 mol/mol, 예컨대 10 mol/mol - 14 mol/mol, 예컨대 11 mol/mol - 14 mol/mol, 예컨대 12 mol/mol and 14 mol/mol, 예컨대 12 mol/mol - 13 mol/mol [단백질 몰 수에 대한 시알산 몰 수 비율로 표시됨]로 포함할 수 있다(실시예 8). 본 발명의 rFSH는 인간 세포주에서 생산 및 발현시킬 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 rFSH (또는 rFSH 조제물)은 $\alpha 2,3$ -시알화를 총 시알화에 10% 이상으로 포함할 수 있다. 예컨대 총 시알화의 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 이상이 $\alpha 2,3$ -시알화일 수 있다. rFSH (또는 rFSH 조제물)는, 총 시알화의 65-85%, 예컨대 총 시알화의 71 - 79%의 비율로 $\alpha 2,3$ -시알화를 포함할 수 있다. 본 발명의 rFSH (또는 rFSH 조제물)는 총 시알화의 50% 이하가 $\alpha 2,6$ -시알화일 수 있다. 예컨대, 총 시알화의 40, 30, 20, 10, 5% 또는 그 미만은 $\alpha 2,6$ -시알화일 수 있다. rFSH (또는 rFSH 조제물)는 총 시알화의 15 - 35%, 예컨대 총 시알화의 20 - 30%, 예컨대 총 시알화의 21 - 29%의 비율로 $\alpha 2,6$ -시알화를 포함할 수 있다. 본 발명의 rFSH (또는 rFSH 조제물)는 총 시알화의 5% 이하가 $\alpha 2,8$ -시알화일 수 있다. 예컨대, 총 시알화의 2.5% 이하는 $\alpha 2,8$ -시알화일 수 있다. rFSH (또는 rFSH 조제물)는 총 시알화의 0.1 - 4%, 예컨대 총 시알화의 0.5 - 3%, 예컨대 총 시알화의 0.5 - 2.5%가 $\alpha 2,8$ -시알화일 수 있다. 시알화는, FSH 탄화수소 구조 상에 존재하는 시알산 잔기의 양을 의미한다. $\alpha 2,3$ -시알화는 2,3 위치(당해 기술 분야에 공지된 위치)의 시알화를 의미하며, $\alpha 2,6$ 시알화는 2,6 위치(당해 기술 분야에 공지된 위치)의 시알화를 의미한다. 따라서, "총 시알화의 %는 $\alpha 2,3$ 시알화일 수 있다"는 것은 FSH에 존재하는 시알산 잔기의 총 수의 %가 2,3 위치에서 시알화되었음을 의미한다. 용어 "총 시알화에서 $\alpha 2,6$ 시알화의 %"는 FSH에 존재하는 시알산 잔기의 총 수의 2,6 위치에서 시알화된 %이다.
- [0024] 본 발명에 따른 rFSH (또는 rFSH 조제물)는, 시알산 함량이 (단백질 + 탄수화물의 중량이 아닌 단백질의 중량 기준으로) 6 중량% 이상(예, 6% - 15%, 예컨대 7% - 13%, 예컨대 8% - 12%, 예컨대 11% - 15%, 예컨대 12% - 14%)일 수 있다.
- [0025] 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 발현되는 재조합 FSH는 $\alpha 2,3$ 시알화만 포함하고 있다(Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990).
- [0026] 본 발명의 rFSH는 인간 세포주에서 생산 또는 발현시킬 수 있다. 예컨대 시알화를 보유하기 위한 예컨대 세포 배양 배지의 조작 및 조절은 공지된 과정 보다 덜 중요할 수 있기 때문에, 생산 방법을 간결하게 (및 보다 효과적이게) 할 수 있다. 또한, 공지된 rFSH 산물을 제조하는 경우 보다 본 발명으로 생산된 rFSH는 염기성이 거의 없고, 산성이 보다 강한 rFSH가 생산되고, 염기성 FSH를 분리/제거하는데 문제기 거의 없기 때문에, 본 방법이 더 효과적일 수 있다. rFSH는 Per.C6 세포주, Per.C6 유래 세포주 또는 변형된 Per.C6 세포주에서 생산되거나 발현시킬 수 있다. 세포주는 $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형시킬 수 있다. 세포주는 $\alpha 2,6$ -시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형시킬 수 있다. 다른 예로 또는 부가적으로, rFSH는 내인성 시알릴 트랜스퍼라제 활성화에 의해 제공되는 $\alpha 2,6$ -연결된 시알산($\alpha 2,6$ 시알화)을 포함할 수 있다.
- [0027] rFSH는 $\alpha 2,3$ - 및/또는 $\alpha 2,6$ -시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 생산할 수 있다. rFSH는 $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 생산할 수 있다. rFSH는 내인성 시알릴 트랜스퍼라제 활성화에 의해 제공되는 $\alpha 2,6$ -연결된 시알산($\alpha 2,6$ 시알화)을 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명은, 추가적인 측면에서, 인간 세포주, 예컨대 Per.C6 세포주, Per.C6 유래 세포주 또는 변형된 Per.C6

세포주, 예컨대 $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형시킨 세포주에서 rFSH를 생산 또는 발현시키는 단계를 포함하는, (본 발명에 따른) 본원에 기술된 rFSH 및/또는 rFSH 조제물 생산 방법을 제공한다.

[0029] rFSH 구조를 글리칸 모이어터를 포함하고 있다. 분지화(Branching)가 발생할 수 있으며, 그 결과 당해 기술 분야에서 잘 알려진 바와 같이, 글리칸은 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 말단 당 잔기 또는 "안테나"를 가질 수 있다. 본 발명의 rFSH는 모노-안테나 및/또는 다이-안테나 및/또는 트리-안테나 및/또는 테트라-안테나 구조로 존재하는 시알화가 있는 글리칸을 포함할 수 있다. rFSH는 바람직하게는, 9-15% 모노-시알화; 27 - 30% 디-시알화; 30 - 36% 트리-시알화 및 25 - 29 % 테트라-시알화 (예, 실시예 8c에 설정된 바와 같이 하전된 글리칸의 WAX 분석으로 확인됨)와 같은 상대적인 함량으로, 모노-시알화된, 디-시알화된, 트리-시알화된 및 테트라-시알화된 글리칸 구조를 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명은, 다른 측면으로, 인간 세포주에서 생산된(예, 발현된) rFSH를 제공한다. rFSH는 $\alpha 2,3$ -시알화 및 $\alpha 2,6$ -시알화를 포함할 수 있다. rFSH는 Per.C6 세포주, Per.C6 유래 세포주 또는 변형된 Per.C6 세포주에서 생산 또는 발현시킬 수 있다. 세포주는, $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형시킬 수 있다. 세포주는 $\alpha 2,6$ -시알릴트랜스퍼라제를 이용하여 변형시킬 수 있다. 다른 예로 또는 부가적으로, rFSH는 [세포주의] 내인성 시알릴 트랜스퍼라제 활성에 의해 제공되는 $\alpha 2,6$ -연결된 시알산($\alpha 2,6$ 시알화)을 포함할 수 있다. rFSH (또는 rFSH 조제물)는 총 시알화의 10% 이상이 $\alpha 2,3$ -시알화될 수 있으며, 예컨대, 총 시알화의 65-85%가 $\alpha 2,3$ -시알화될 수 있다. 본 발명의 rFSH (또는 rFSH 조제물)는 총 시알화의 50% 이하는 $\alpha 2,6$ -시알화될 수 있으며, 예컨대 총 시알화의 15-35%는 $\alpha 2,6$ -시알화될 수 있다. 본 발명의 rFSH (또는 rFSH 조제물)는 총 시알화의 5% 이하가 $\alpha 2,8$ -시알화될 수 있으며, 예컨대, 총 시알화의 0.5-4%는 $\alpha 2,8$ -시알화될 수 있다. rFSH는 시알산 함량이 6 mol/mol 이상, 예컨대 6mol/mol - 15 mol/mol일 수 있다[단백질 몰 수에 대한 시알산의 몰 수 비율로 표시됨].

[0031] 본 발명은 다른 측면으로 $\alpha 2,3$ -시알화 및 $\alpha 2,6$ -시알화(예, 상기 기재된 바와 같이)를 포함하는 rFSH를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 hCG 및/또는 LH를 추가로 포함할 수 있다.

[0032] hCG는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 수득할 수 있다. 본 발명에 따른 hCG는 인간 유래 hCG 및 재조합 hCG를 포함한다. 인간 유래의 hCG는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 임의의 적합한 소스(예, 뇨 및 태반)로부터 정제할 수 있다. 재조합 hCG를 발현 및 정제하는 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0033] LH는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 수득할 수 있다. 본원에서, LH는 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. 재조합 LH를 발현 및 정제하는 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0034] 약학 조성물은, 불임 치료하기 위한, 예컨대 보조 생식 기법(ART), 배란 유도 또는 자궁내 수정(IUI)에 사용하기 위한 것일 수 있다. 약학 조성물은 예컨대 공지된 FSH 조제물이 사용되는 의학 증상들에 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은, 불임 약제 제조 또는 불임 치료에 있어서의 본원에 언급된(본 발명의 측면에 따른) rFSH 및/또는 rFSH 조제물의 용도를 제공한다. 본 발명의 약학 조성물은, 모든 약물 투여 경로, 예컨대 경구, 직장, 비경구, 경피(예, 패치 기술), 정맥내, 근육내, 피하, 흉골내(intrasusternal), 질내, 복막내, 국소(산제, 연고제 또는 점적제) 또는 볼 또는 코 스프레이용으로 잘 알려진 조성물로 제형화할 수 있다. 국소 조성물은, 특히 Pharmaceutical Sciences fifteenth edition (Matt Publishing Company, 1975) 1405-1412 및 1461-87페이지와 the national formulary XIV fourteenth edition (American Pharmaceutical Association, 1975)에 기술된 바와 같이, 수용액 등의 약학적으로 허용가능한 담체, 염 및 보존제 등의 무독성 부형제, 완충액 등을 포함한다.

[0035] 적합한 수계 및 비수계 약학 담체, 희석제, 용매 또는 비히클의 예로는, 물, 에탄올, 폴리올(예, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 카르복시메틸셀룰로스 및 이의 적절한 혼합물, 식물성 오일(예, 올리브유) 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트를 포함한다.

[0036] 또한, 본 발명의 조성물은 첨가제를 포함할 수 있으며, 첨가제로는, 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제가 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 항균제 및 항진균제를 포함시켜, 미생물의 증식을 예방할 수 있으며, 그 예로는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등이 있다. 또한, 당, 소듐 클로라이드 등의 등장성 제제를 포함하는 것이 바람직할 수 있다.

[0037] 일부 경우에서, 지속적으로 작용하게 하기 위해, 피하 또는 근육내 주입으로부터 FSH (및 존재하는 경우에는, 다른 활성 성분)의 흡수를 느리게하는 것이 바람직할 수 있다. 이는, 수용성이 낮은 결정 또는 비결정질 물질

의 액체 현탁액을 이용하여 달성할 수 있다. FSH의 흡수율은 결정의 크기와 결정 형태에 따라 결정될 수 있다. 다른 예로, 비경구 투여된 FSH 조합 형태의 지연성 흡수는 FSH 조합물을 오일 비히클 중에 용해 또는 현탁함으로써, 달성된다.

[0038] 주사용 데포 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 폴리머 중에 FSH (및 존재하는 경우에는 다른 제제)의 미세캡슐 매트릭스를 형성시킴으로써, 만들 수 있다. 폴리머에 대한 FSH 비율과 사용한 특정 폴리머의 특성에 따라, FSH 방출율을 조절할 수 있다. 다른 생분해성 폴리머의 예로는, 폴리비닐피롤리돈, 폴리(오르토에스테르), 폴리(무수화물) 등이 있다. 데포 주사용 제형은 또한, 신체 조직에 사용가능한 리포솜 또는 미세에멀전 안에 FSH를 포획함으로써 제조한다.

[0039] 주사용 제형은, 예컨대, 박테리아-체류 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용하기 직전에 멸균수 또는 다른 무균 주사용 매질에 용해 또는 분산시킬 수 있는, 무균 고체 조성물의 형태로 멸균제를 혼입함으로써, 무균화할 수 있다. 주사용 제형은 임의의 적합한 용기, 예컨대 바이알, 사전-충진된 주사기, 주사 카트리지 등의 안에 제공할 수 있다.

[0040] 주사용 제형은 FSH (선택적으로 hCG, LH 등과 함께) 함유성 약학 조성물이 든 제품으로서 제공될 수 있다. 활성 성분이 2종 이상인 경우(예, FSH 및 예컨대 hCG 또는 LH), 각각 또는 함께 투여하기에 적합할 수 있다. 각각 투여하는 경우, 투여는 순차적일 수 있다. 제품은 임의의 적합한 포장으로 제공될 수 있다. 예컨대, 제품에는 FSH, hCG, 또는 FSH + hCG 조합 중 어느 하나가 들어있는, 다수개의 사전-충진된 시린지가 포함될 수 있으며, 이 시린지는 무균성을 유지하기 위해 블리스터 포장 또는 다른 수단으로 포장될 수 있다. 제품에는 선택적으로 FSH 및 hCG 제형을 이용하는 설명서가 첨부될 수 있다.

[0041] 약학 조성물의 다양한 성분들의 pH와 실제 농도는 본 기술 분야의 일상적인 실무에 따라 조절한다. GOODMAN and GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7th ed을 참조한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 조성물은 비경구 투여용 조성물로서 제공된다. 비경구 제형의 일반적인 제조 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 전술한 REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY 780-820페이지에 기재되어 있다. 비경구 조성물은 액체 제형으로, 또는 투약하기 직전에 무균 주사용 매질과 혼합시킬 고체로서 제공할 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 비경구 조성물은 투여 용이성 및 투약 균일성을 위해 투약 단위 형태로 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0042] 본 발명은 하기 실시예와 첨부된 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명될 것이다:

도 1은 pFSH α /beta 발현 벡터의 플라스미드 맵이다.

도 2는 α 2,3-시알릴트랜스퍼라제 (ST3GAL4) 발현 벡터를 나타낸다.

도 3은 α 2,6-시알릴트랜스퍼라제 (ST6GAL1) 발현 벡터를 나타낸다.

도 4는 FSH를 안정적으로 발현하는 Per.C6 세포에 의해 생산된 재조합 FSH의 등전 포커싱을 나타낸다.

도 5는 α 2,3- 또는 α 2,6-시알릴트랜스퍼라제로 조작한 후, 안정적으로 발현하는 Per.C6 세포에 의해 생산된 재조합 FSH의 등전 포커싱을 나타낸다.

도 6은 Per.C6 FSH의 시알산 연결을 분석한 것이다.

도 7은 Per.C6 FSH 샘플의 대사 소거율(MCR)을 나타낸다.

도 8은 α 2,6-시알릴트랜스퍼라제 조작된 Per.C6 FSH 샘플의 MCR이다.

도 9는 α 2,6-시알릴트랜스퍼라제 조작된 Per.C6 FSH 샘플의 MCR이다.

도 10은 α 2,3-시알릴트랜스퍼라제 조작된 Per.C6 FSH 샘플의 MCR이다.

도 11은 Steelman and Pohley (1953)의 방법에 따른, 근원 Per.C6 rFSH의 Per.C6 rFSH 클론에 의한 난소 중량 증대를 나타낸 것이다.

도 12는 조작된 (α 2,6-시알릴트랜스퍼라제) Per.C6 rFSH의 Per.C6 rFSH 클론에 의한 난소 중량 증대를 나타낸 것이다.

도 13은 조작된 (α 2,3-시알릴트랜스퍼라제) Per.C6 rFSH의 Per.C6 rFSH 클론에 의한 난소 중량 증대를 나타낸

것이다.

서열

인간 FSH

FSH 알파 폴리펩타이드 유전자의 코딩 영역을 Fiddes and Goodman. (1981)에 따라 사용하였다. 서열은 AH007338로 유전자은행에 등록하였고, 구축시에 이 단백질 서열의 다른 변이체는 없었다. 이 서열을 본원에서는 서열번호 1로 지칭한다.

FSH 베타 폴리펩타이드 유전자의 코딩 서열을 Keene *et al* (1989)에 따라 사용하였다. 서열은 NM_000510으로 유전자은행에 등록하였고, 구축시에 이 단백질 서열의 다른 변이체는 없었다. 이 서열을 본원에서는 서열번호 2로 지칭한다.

시알릴트랜스퍼라제

α 2,3-시알릴트랜스퍼라제 - 베타-갈락토시드 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제 4 (α 2,3-시알릴트랜스퍼라제, ST3GAL4)를 Kitagawa and Paulson (1994)에 따라 사용하였다 이 서열은 L23767로 유전자은행에 등록하였고, 서열번호 3으로 지칭한다.

α 2,6-시알릴트랜스퍼라제 - 베타-갈락토시드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제 1 (α 2,6-시알릴트랜스퍼라제, ST6GAL1)를 Grundmann *et al.* (1990)에 따라 사용하였다 이 서열은 NM_003032로 유전자은행에 등록하였고, 서열번호 4로 지칭한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

실시예 1: FSH 발현 벡터의 구축

FSH 알파 폴리펩타이드 (AH007338, 서열번호 1) 및 FSH 베타 폴리펩타이드 (NM_003032, 서열번호 2)의 코딩 서열을, 각각 프라이머 조합, FSHa-fw 및 FSHa-rev와 FSHb-fw 및 FSHb-rec를 이용하여 PCR로 증폭시켰다.

FSHa-fw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGGATTACTACAGAAAAATATGC-3'

FSHa-rev 5'-GGATGGCTAGCTTAAGATTGTGATAATAAC-3'

FSHb-fw 5'-CCAGGCGCGCCACCATGAAGACACTCCAGTTTTTC-3'

FSHb-rev 5'-CCGGGTAACTTATTATTCTTTTCATTTCACCAAAGG-3'

제조되는 증폭시킨 FSH 베타 DNA를 제한 효소 *AscI* 및 *HpaI*로 자르고, 네오마이신 선별 마커를 가지고 있는 CMV 유래 포유류 발현 벡터의 *AscI* 및 *HpaI* 부위에 삽입하였다. 마찬가지로, FSH 알파 DNA를 제한 효소 *BamHI* 및 *NheI*로 자르고, FSH 베타 폴리펩타이드 DNA를 이미 가지고 있는 발현 벡터의 *BamHI* 및 *NheI* 부위에 삽입하였다.

벡터 DNA를 이용하여 *E.coli* DH5 α 균주에 형질전환하였다. 증폭용으로 60개의 콜로니를 선택하였고, 57개에는 FSH 알파 및 베타 둘다 포함하고 있는 벡터가 함유되어 있었다. 이들 콜로니 중 20개를 선택하여 서열분석한 결과, 모두 서열번호 1 및 서열번호 2의 정확한 서열을 포함하고 있었다. 플라스미드 pFSH A+B#17을 형질감염 용으로 선택하였다(도 1).

실시예 2: ST3 발현 벡터의 구축

베타-갈락토시드 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제 4 (ST3, L23767, 서열번호 3)의 코딩 서열은, 프라이머 조합 2,3STfw 및 2,3STrev를 이용하여 PCR로 증폭시켰다.

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'

2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

제조되는 증폭시킨 ST3 DNA를 제한 효소 *BamHI* 및 *AflIII*로 자르고, 히그로마이신 내성 마커를 가지고 있는 CMV 유래 포유류 발현 벡터의 *BamHI* 및 *AflIII* 부위에 삽입하였다. 이 벡터를 상기와 같이 증폭시키고, 서열 분석하

였다. 클론 pST3#1 (도 2)에는 서열번호 3에 따른 정확한 서열이 포함되어 있었으며, 이를 형질감염 용도로 선택하였다.

[0057] 실시예 3: ST6 발현 벡터의 구축

[0058] 베타-갈락토스아미드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제 1의 코딩 서열 (ST6, NM_003032, 서열번호 4)을 프라이머 조합 2,6STfw 및 2,6STrev를 이용하여 PCR로 증폭시켰다.

[0059] 2,6STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACCAACCTGAAG-3'

[0060] 2,6STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3'

[0061] 제조되는 증폭시킨 ST6 DNA를 제한 효소 *Bam*HI 및 *Afl*III로 자르고, 히그로마이신 내성 마커를 가지고 있는 CMV 유래 포유류 발현 벡터의 *Bam*HI 및 *Afl*III 부위에 삽입하였다. 이 벡터를 상기와 같이 증폭시키고, 서열 분석하였다. 클론 pST6#1 (도 3)에는 서열번호 4에 따른 정확한 서열이 포함되어 있었으며, 이를 형질감염 용도로 선택하였다.

[0062] 실시예 4: Per.C6 세포에서의 안정적인 pFSH A+B 발현, 클론의 형질감염, 분리 및 스크리닝

[0063] FSH를 생산하는 Per.C6 클론은, 단일 플라스미드로부터 FSH의 2가지 폴리펩타이드 체인을 발현시킴으로써 제조하였다(실시예 1).

[0064] 안정적인 클론을 수득하기 위해, 리포솜계 형질감염제와 pFSH A+B 구조체를 형질감염시켰다. 안정적인 클론은 10% FCS가 첨가되고 G418이 포함된 VPRO에서 선별하였다. 형질감염 후 3주 후에, G418 내성 클론을 배양하였다. 전체 250개의 클론을 선별하여 분리하였다. 분리된 클론은 70 - 80% 컨플루언트가 될 때까지 선별 배지에서 배양하였다. FSH 선택적인 ELISA를 이용하여 상층액에서 FSH 단백질 함량을 분석하였고, cAMP 측정 분석을 이용하여 클로닝한 세포주에서의 FSH 수용체에 대한 약리학적 활성을 분석하였다. 기능성 단백질을 발현하는 클론(98)은, 24웰, 6웰 및 T80 플라스크로 배양 확대를 실시하였다.

[0065] 클론 7개의 물질 생산력과 품질을 측정하기 위한 연구를 T80 플라스크에서 개시하여, 충분한 양의 물질을 제조하였다. 세포를 전술한 바와 같이 보충된 배지에서 7일간 배양하고, 상층액을 회수하였다. 생산력은 FSH 선택적인 ELISA를 이용하여 결정하였다. 물질의 등전점 프로파일을 측정하였다(실시예 6). 대표적인 샘플은 도 4에 나타낸다. IEF에 대한 정보를 이용하여 대사 소거율을 분석하기 위한 클론들을 선별하였다(실시예 9). 생산력과 품질이 충분한 클론들(005, 104, 179, 223, 144)을 선별하여, 시알릴트랜스퍼라제 조작을 수행하였다.

[0066] 실시예 5: α2,3- 또는 α2,6-시알릴트랜스퍼라제를 과다 발현하는 세포에서 시알화 수준은 증가된다. FSH를 발현하는 Rer.C6 세포에서의 pST3 또는 pST6의 안정적인 발현, 형질감염, 분리 및 클론 스크리닝

[0067] FSH의 2가지 폴리펩타이드 체인을 이미 발현하고 있는 Per.C6 세포에서(실시예 4), 개별 플라스미드(실시예 2 및 3 참조)로부터 α2,3 시알릴트랜스퍼라제 또는 α2,6 시알릴트랜스퍼라제를 발현시킴으로써, 고도로 시알화된 FSH를 생산하는 Per.C6 클론을 제조하였다. 실시예 4에 기재된 바와 같이, PER.C6[®] 세포로부터 제조한 클론 4개를 선별하여, 생산력, 우수한 증식 프로파일, 기능성 단백질의 생산 및 일부 시알화를 포함하는 생산된 FSH를 포함하여 그 특징들을 확인하였다.

[0068] 안정적인 클론을 실시예 4에 전술한 방법에 따라 제조하였다. α2,3-시알릴트랜스퍼라제 프로그램으로부터 총 202개의 클론과, α2,6-시알릴트랜스퍼라제 프로그램으로부터 총 210개의 클론을 분리하여, 증식시키고, 분석하였다. α2,3- 실험에 사용한 최종 클론의 수는 12개이고, α2,6- 실험에서는 30개였다.

[0069] α2,3-시알릴트랜스퍼라제 클론을 혈청이 결핍된 배지와 현탁 조건에 적응시켰다.

[0070] 앞서와 같이, FSH 선택적인 ELISA, FSH 수용체 세포주에서의 기능적인 반응, IEF(실시예 6), 대사 소거율(실시예 9) 및 Steelman Pohley 분석(실시예 10)을 이용하여, 클론을 분석하였다. 결과는 시판되는 재조합 FSH(Gonal-f, Serono) 및 모균주 FSH Per.C6 세포주와 비교하였다. 대표적인 샘플은 도 5에 나타낸다. 일부 클론들은 시알화 증가를 보이지 않았지만, 대부분의 클론들에 의해 생산되는 FSH는, α2,3- 또는 α2,6- 시알릴

트랜스퍼라제 없이 발현시킨 FSH와 비교하여, 현저히 개선된 시알화를 보이는 것을 알 수 있었다(즉, 많은 수의 시알산을 가진 평균적으로 더 많은 FSH 이소형).

[0071] 결론적으로, Per.C6 세포에서의 FSH와 시알릴트랜스퍼라제의 공동 발현은, FSH만 발현하는 세포와 비교하여, 시알화된 FSH의 수준을 증가시킨다.

[0072] **실시예 6: 등전 포커싱에 의한 Per.C6에서 생산된 FSH 이소형의 pI 분석**

[0073] 전기영동은 전기장에 의한 용매에서의 하전된 분자의 이동으로서 정의된다. 전기장에서의 생물학적 분자의 이동성은 전기장의 세기, 분자의 순전하, 분자의 크기와 형태, 이온 세기 및 분자가 이동하는 매질의 특성에 따라 결정된다.

[0074] 등전 포커싱(IEF)은 pI에 기초로 단백질을 분리하는 전기영동 기법이다. pI는 단백질이 순 전하가 없어져 전기장에서 이동하지 않는 pH이다. FSH 이소형의 시알산 함량은 각 이소형의 pI 포인트를 약간 변동시키며, 이는 각 클론의 Per.C6 FSH 이소형을 가시화하는 기법을 이용하여 조사할 수 있다.

[0075] 세포 배양 상층액내 Per.C6에서 생산된 FSH 이소형의 등전점을 등전 포커싱을 이용하여 분석하였다. Per.C6 FSH 클론의 세포 배양 배지를 실시예 4 및 5에 기술된 방법과 같이 제조하였다.

[0076] Per.C6 FSH 샘플은, 5% 폴리아크릴아미드의 Novex™ IEF 젤에서 양성체 용액 pH 3.0 -7.0 중에 pH 3.0 - 7.0의 구배로 네이티브 조건 하에 분리시켰다.

[0077] 단백질을 제공된 니트로셀룰로스 위로 이동시키고, 일차 항-FSH α 단일클론 항체, 항-마우스 IgG 알카라인 포스파타제가 접합된 이차 항체 및 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트(BCIP) 및 니트로 블루 테트라졸륨(NBT)을 이용하여 가시화시켜, 밴드를 확인하였다.

[0078] 도 4 및 5에 나타난 바와 같이, 밴드는 여러 개의 시알산 분자를 포함하고 있는 FSH의 이소형을 나타낸다.

[0079] 이러한 방법을 이용하여, 다수의 시알산 분자를 가진 FSH 이소형을 생산하는 클론을 동정하였다. $\alpha 2,3$ - 또는 $\alpha 2,6$ -시알릴트랜스퍼라제에 의한 조작시, 시알산 함량이 많고 pI가 낮은 클론이 제조되었다.

[0080] **실시예 7: Per.C6 FSH의 시알산 연결 분석**

[0081] 렉틴을 이용한 글리칸 구별 방법을 이용하여 당접합체를 분석하였다. 이러한 방법으로, 니트로셀룰로스에 결합된 당단백질과 당접합체를 특정화할 수 있다. 렉틴을 선택적으로 특정 모이어티, 예컨대 $\alpha 2,3$ 연결된 시알산을 인지한다. 적용한 렉틴은 결합된 렉틴을 면역학적으로 검출할 수 있는 스테로이드 합텐 디그옥시게닌과 접합된다.

[0082] 모 클론(추가적인 시알릴트랜스퍼라제 없음), $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제 조작된 클론 및 $\alpha 2,6$ -시알릴트랜스퍼라제 조작된 클론으로부터의 정제된 Per.C6 FSH를 표준적인 SDS-PAGE 기법으로 분리시켰다. 시판되는 재조합 FSH (Gonal-f, Serono)를 표준 물질로 사용하였다.

[0083] 시알산은 DIG 글리칸 구별 키트(Cat. No. 11 210 238 001, Roche)를 제조사의 설명서에 따라 사용하여 분석하였다. SNA(*Sambucus nigra* agglutinin)와의 양성 반응은, 말단에 (2-6) 연결된 시알산을 의미한다. MAA(*Maackia amurensis* agglutinin II)와의 양성 반응은 말단에 ($\alpha 2$ -3) 연결된 시알산을 의미한다.

[0084] 종합적으로, 모 클론 005에는 $\alpha 2,3$ - 및 $\alpha 2,6$ -시알산 2가지가 낮은 수준으로 포함되어 있었다. $\alpha 2,3$ -시알릴트랜스퍼라제로 조작된 클론에는 $\alpha 2,3$ -시알산 연결된 수준이 높았으며, $\alpha 2,6$ -시알산 연결 수준은 낮았다. $\alpha 2,6$ -시알릴트랜스퍼라제로 조작된 클론에는 $\alpha 2,6$ -시알산 연결된 수준이 높았으며, $\alpha 2,3$ -시알산 연결 수준은 낮았다. 표준 대조군인 Gonal-f는 $\alpha 2,3$ -시알산 연결만 포함되어 있다. 이는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 생산된 재조합 단백질에 대해 공지된 사항과 일치된다(Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990).

[0085] 결론적으로, $\alpha 2,3$ - 또는 $\alpha 2,6$ -시알릴트랜스퍼라제를 이용한 Per.C6 FSH 세포의 조작은, 샘플내 FSH가 접합된 시알산 분자의 수를 성공적으로 증가시켰다.

[0086] **실시예 8a: 전체 시알산의 정량**

[0087] 시알산은 단당류로 간주되는 단백질-결합된 탄수화물이며, 갈락토스, 만노스, 글루코스민, 갈락토사민 및 푸코스와 같은 다른 단당류와 조합하여 생성된다.

[0088] 정제된 rFSH(실시예 11)에서의 전체 아미노산을 효소학적 시알산 정량 키트를 제조사의 프로토콜(Sigma, Sialic-Q)에 따라 사용하여 측정하였다. 간략하게는, N-아세틸뉴라민산 알돌레이즈는 시알산을 N-아세틸만노아신과 피루브산으로 촉매한다. 피루브산은 베타-NADH와 락틱 데하이드로게나제에 의해 락트산으로 환원될 수 있다. 베타-NADH 산화는 분광광도측정으로 정확하게 측정할 수 있다.

[0089] 단백질 농도는 라우리 방법(Lowry *et al*, 1951)을 기초로 시판되는 바이신크론산(BCA) 분석 키트(Sigma, B 9643)를 이용하여 마이크로타이터 플레이트에서 측정하였다.

[0090] Per.C6 FSH의 총 시알산 함량을 측정하였고, 6 mol/mol 이상으로 확인되었다.

[0091] **실시예 8b: α2,3, α2,6 및 α2,8 시알산의 상대적인 함량 정량**

[0092] 정제한 rFSH(실시예 11)에서의 α2,3, α2,6 및 α2,8 시알산의 상대적인 백분율을 공지 기법으로 측정하였다.

[0093] rFSH 각 샘플을 고정(젤 블롯)하고, 세정, 환원, 알킬화한 다음 PNGase F로 밤새 절단하였다. 그 후, N-글리칸을 추출하고 진행하였다. NP-HPLC 및 WAX-HPLC 분석을 위해 N-글리칸을 Royle *et al*에 상세하게 언급된 바와 같이 플루오로포어 2AB로 표지하였다. N-글리칸을 TSK 아미드 컬럼(Royle *et al*) 상에서 정상(NP) HPLC로 전개시켰고, 글루코드 유닛(GU)은 체류 시간으로 표현하였다.

[0094] (상기와 같이 추출한) 추출하고 모은 글리칸 샘플을 여러가지 시알리다제로 절단하여 연결을 확인하였다. NAN 1 (제조함 시알리다제)는 α2,3 연결된 비-환원성 말단 시알산(NeuNAc 및 NeuNgc)을 해리시키며, ABS (*Arthrobacter ureafaciens* sialidase)는 α2,3, α2,6 및 α2,8 연결된 비-환원성 말단 시알산(NeuNAc 및 NeuNgc)을 해리시킨다. 샘플을 NP-HPLC로 분석하여, 절단하지 않은 샘플과, NAN1으로 절단한 샘플 및 ABS로 절단한 샘플을 비교하였다. 3가지 NP-HPLC 결과(미절단, NAN1 절단, ABS 절단) 비교에서, ABS 및 NAN1 절단으로 여러가지 결과물이 생기는 것으로 나타났다. 이는, 샘플들에 α2,3, α2,6 및 α2,8 연결을 가진 시알산이 포함되어 있다는 것을 의미한다. 상대적인 백분율은 비절단 글리칸 풀에 존재하는 구조들로부터 계산하였고, α2,3 시알화 비율은 65% - 85% (예, 77.75%); α2,6 시알화 비율은 15 - 35% (예, 21.46%); 및 α2,8 시알화 비율은 0.1 - 3% 범위인 것으로 확인되었다.

[0095] **실시예 8c: 모노, 디, 트리 및 테트라 안테너리 시알화된 구조의 상대적인 함량 정량**

[0096] 정제된 rFSH(실시예 11)로부터 추출한 글리칸에서의, 모노, 디, 트리 및 테트라 시알화된 구조의 상대적인 백분율을 공지된 기법으로 측정하였다.

[0097] rFSH 각 샘플을 고정(젤 블롯)하고, 세정, 환원, 알킬화한 다음 PNGase F로 밤새 절단하였다. 그 후, N-글리칸을 추출하고 진행하였다. NP-HPLC 및 WAX-HPLC 분석을 위해 N-글리칸을 Royle *et al*에 상세하게 언급된 바와 같이 플루오로포어 2AB로 표지하였다.

[0098] 전하에 의해 N-글리칸을 분리하기 위한 약한 음이온 교환(WAX) HPLC(실시예 8b)를 Royle *et al*에 언급된 바와 같이 기준으로서 Fetuin N-글리칸 표준물질을 이용하여 수행하였다. 글리칸은 여기에 포함된 시알산의 갯수에 따라 용출되었다. 샘플들 모두에는 모노(1S), 디(2S), 트리(3S) 및 테트라(4S) 시알화된 구조가 포함되어 있었다. 시알화된 구조의 상대적인 함량은 하기 비율로 확인되었다(1S:2S:4S:4S): 9-15%: 27-30%: 30-36%: 25-29% (예, 10.24 : 28.65 : 35.49 : 25.62).

[0099] **실시예 9: rFSH의 대사 소거율 측정**

[0100] Per.C6 FSH 샘플의 대사 소거율(MCR)을 측정하기 위해, 의식있는 암컷 래트(클론 당 3마리)에 꼬리 정맥을 통해 0시간에 rFSH (1 - 10 μg/rat, 샘플의 ELISA 정량을 기준으로 함, DRG EIA 1288)를 볼루스 주사하였다. 테스트 샘플 주사 후 1, 2, 4, 8, 12, 24 및 32시간 후에 혈액 샘플(400 μl)을 꼬리 끝에서 채혈하였다. 원심분리

하여 혈청을 수집하고, ELISA(DRG EIA 1288)로 FSH 함량을 분석하였다.

[0101] 탈시알로당단백질 수용체(ASGP-R)는 탈시알로페투인(ASF) 등의 탈아실화된(갈락토스-말단의) 당단백질을 인지한다(Pricer and Ashwell, 1971. Van Lenten and Ashwell, 1972). ASGP 수용체와 결합된 탈아실화된 당단백질은 수용체가 재순환되고 리간드가 분해되는 세포에 내재화된(Regoeczi *et al*, 1978, Steer and Ashwell, 1980).

[0102] Per.C6 FSH 물질이 이러한 기전에 의해 소거되는지를 조사하기 위해, ASGP-R를 탈시알로페투인으로 포화시켰다. 모체, $\alpha 2,6$ 또는 $\alpha 2,3$ -시알틸트랜스퍼라제로 조작한 물질의 대사 소거율을, 1-2시간 동안 ASGP-R을 포화하기 위한 탈시알로페투인의 최소 7500배 몰로 병용-투여하여, 기술된 바와 같이 측정하였다.

[0103] Per.C6 FSH 모체 클론에 의해 생산되는 물질에는 일부 좀더 긴 MCR 물질이 포함되어 있었지만, 높은 비율이 신속하게 소거되었다(도 7). 가장 시알화된 물질을 포함하고 있는 리드 클론 005를 $\alpha 2,6$ - 또는 $\alpha 2,3$ -시알틸트랜스퍼라제를 이용하여 조작하였다(실시예 5). $\alpha 2,6$ -시알틸트랜스퍼라제로 조작한 클론에서는 시알화 증가가 확인되었지만(도 5), MCR에는 개선이 없었다(도 7). ASGP의 차단은 $\alpha 2,6$ 물질의 MCR을 표준 물질의 MCR로 복원시켰는데, 이는 $\alpha 2,6$ 연결이 증가된 물질이 신속하게 소거된다는 것을 입증한다(도 8). $\alpha 2,3$ -시알틸트랜스퍼라제로 조작 결과, 표준 물질에 상응하는 MCR을 보이는 클론이 제조되었으며(도 9), 시알산 함량 변화는 FSH의 이소형에 대해 공지된 바와 일치하였다(도 10).

[0104] 실시예 10: Steelman-Pohley 생체내 분석

[0105] FSH내 시알산 함량 증가가 생물학적 효과 증가로 나타나는지를 확인하기 위해, 실시예 5에서 제조한 바와 같이 고도로 시알화된 FSH에 의한 래트의 자궁 무게 증가를 조사하였다.

[0106] Per.C6 rFSH 클론으로 인한 자궁 무게 증가를 Steelman and Pohley (1953)의 방법으로 분석하였다. 여과한 세포 배지 샘플 유래의 Per.C6 rFSH를 ELISA (DRG,EIA-1288)로 정량하였다. 샘플(Per.C6 rFSH)과 표준물질(Gonal-f rFSH)을 5가지의 용량(1가지 용량 당 동물 3마리 사용)으로 테스트하였다. Gonal-f는 50, 100, 200, 400 및 800 ng/rat으로 투여하였다. 샘플 용량은, Gonal-f에 상대적인 이것의 AUC 수치를 이용하여 계산하였고, 전형적으로 0.05 - 10 $\mu\text{g/rat}$ 이었다.

[0107] 결론적으로, Per.C6 FSH 모체 클론에 의해 생산된 시알화가 적은 물질(도 11)은 자궁 무게 증가 분석에서 시판되는 rFSH 만큼 강력하지 않았다. 추가적인 $\alpha 2,6$ -연결을 부가하기 위한 시알틸트랜스퍼라제 조작은 시알산 함량을 증가시켰지만, 생체내 분석에서 효능을 개선되지 않았다(도 12). 그러나, 추가적인 $\alpha 2,3$ -연결은 현저하게 효과를 개선시켰지만(도 13), 본 분석에서 2종의 제조합 FSH 조제물(Per.C6 및 CHO-유래)들은 매우 비슷한 프로파일을 보였다.

[0108] 실시예 11: 생산 및 정제에 대한 개관

[0109] 무혈청 배지에서 현탁 배양한 PER.C6 세포에서의 FSH 생산을 위한 방법을 개발하였다. 방법은 아래에 기술되어 있으며, 몇가지 FSH를 생산하는 Per.C6 세포주에 적용하였다.

[0110] 모체 클론 005, $\alpha 2,3$ - 클론 007 및 $\alpha 2,6$ 클론 059 유래의 FSH를 Lowry *et al*. (1976)에 기술된 방법을 변형시켜 제조하였다.

[0111] PER.C6-FSH를 생산하기 위해, 세포주를 무혈청 배지, 즉 Excell 525 (JRH Biosciences)에 적응시켰다. 우선 세포를 T80 배양 플라스크 상에 70% - 90% 컨플루언트 단일층을 형성하도록 배양하였다. 계대 배양으로, 세포를 무혈청 배지, Excell 525 + 4 mM L-글루타민에 세포 밀도 0.3×10^6 cells/ml로 재현탁하였다. 세포 현탁액 25 ml을 250 ml 교반기 플라스크에 넣어, 100 rpm으로 37°C, 5% CO₂에서 교반하였다. 세포 밀도가 $> 1 \times 10^6$ cells/ml에 도달한 후, 세포를 세포 밀도 0.2 또는 0.3×10^6 cells/ml로 서브 배양하였고, 교반기 플라스크에서 100 rpm으로 37°C, 5% CO₂에서 더욱 배양하였다.

[0112] FSH를 생산하기 위해, 세포를 PER.C6 세포의 증식을 지원하는 무혈청 배지, 즉 VPRO (JRH Biosciences)로, 매우 높은 세포 밀도(일반적으로 $> 10^7$ cells/ml(배치 배양물))로 이동시켰다. 세포를 먼저 Excell 525에 $> 1 \times 10^6$ cells/ml로 배양한 다음, 1000 rpm으로 5분간 스핀 다운한 후 VPRO 배지 + 6 mM L-글루타민에 밀도 1×10^6

cells/ml로 다시 현탁하였다. 그런 후, 세포를 교반기 플라스크에서 7-10일간 100 rpm으로 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 이 기간 동안, 세포를 > 10⁷ cells/ml의 밀도로 배양하였다. 세포 생존력이 감소되기 시작한 후에, 배양 배지를 회수하였다. 세포를 1000 rpm에서 5분간 스핀 다운하였고, 상층액은 FSH 정량 및 정제에 사용하였다. FSH 농도는 ELISA (DRG EIA 1288)를 이용하여 측정하였다.

[0113] 그런 후, FSH 정제는 Lowry *et al.* (1976)에 기술된 방법을 변형시켜 수행하였다. DEAE 셀룰로스에서의 크로마토그래피, 세파텍스 G100에서의 젤 여과, 하이드록시아파티트에서의 흡착 크로마토그래피 및 분취용 폴리아크릴아미드 전기영동에 의해 수행하였다.

[0114] 모든 크로마토그래피 과정에서, 면역반응성 FSH의 존재는 RIA (DRG EIA 1288) 및 IEF에 의해 확인하였다(실시예 6)

[0115] **서열번호 1**

[0116] 여포 자극 호르몬 알파 폴리펩타이드

[0117] 등재 번호 AH007338

[0118] FSH 알파의 뉴클레오티드 서열

[0119] 1 atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggtca cattgtcggg gtttctgcat
[0120] 61 gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca
[0121] 121 tttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattg gctgctgctt ctctagagca
[0122] 181 tatccactc cactaagtc caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag
[0123] 241 tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatggggggg tttcaaagtg
[0124] 301 gagaaccaca cgcgctgcca ctgcagtact tgttattatc acaaatctta a

[0125] FSH 알파의 단백질 서열

[0126] 1 MKTLQFFFLF CCWKAICNS CELTNITIAI EKEECRFCIS INTTWCAGYC YTRDLVYKDP
[0127] 61 ARPQIKTCT FKELVYETVR VPGCAHHADS LYTPVATQC HCGKCDSDST DCTVRGLGPS
[0128] 121 YCSFGEMKE

[0129] **서열번호 2**

[0130] 여포 자극 호르몬 베타 폴리펩타이드

[0131] 등재 번호 NM_000510

[0132] FSH 베타의 뉴클레오티드 서열

[0133] 1 atgaagacac tccagttttt cttccttttc tgttgctgga aagcaatctg ctgcaatagc
[0134] 61 tgtgagctga ccaacatcac cattgcaata gagaaagaag aatgtcgttt ctgcataagc
[0135] 121 atcaacacca cttggtgtgc tggctactgc tacaccaggg atctggtgta taaggacca
[0136] 181 gccaggccca aaatccagaa aacatgtacc ttcaaggaac tggatatga aacagtgaga
[0137] 241 gtgcccggct gtgtcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc caccagtgt
[0138] 301 cactgtggca agtgtgacag cgacagcact gattgtactg tgcgaggcct ggggcccagc
[0139] 361 tactgtctcct ttggtgaaat gaaagaataa

[0140] FSH 베타의 단백질 서열

[0141] 1 MKTLQFFFLF CCWKAICNS CELTNITIAI EKEECRFCIS INTTWCAGYC YTRDLVYKDP

[0142] 61 ARPKIQKTCT FKELVYETVR VPGCAHHADS LYTPVATQC HCGKCDSDST DCTVRGLGPS

[0143] 121 YCSFGEMKE

[0144] **서열번호 3**

[0145] 베타-갈락토시드 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제 4

[0146] 등재 번호 L23767

[0147] ST3GAL4 뉴클레오티드 서열

[0148] 1 ATGTGTCTCTG CAGGCTGGAA GCTCCTGGCC ATGTTGGCTC TGGTCTGGT CGTCATGGTG

[0149] 61 TGGTATTCCA TCTCCCGGA AGACAGGTAC ATCGAGCTTT TTTATTTTCC CATCCCAGAG

[0150] 121 AAGAAGGAGC CGTGCCTCCA GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG CCTCTAAGCT CTTTGGCAAC

[0151] 181 TACTCCCGGG ATCAGCCCAT CTTCTGCGG CTTGAGGATT ATTTCTGGGT CAAGACGCCA

[0152] 241 TCTGCTTACG AGCTGCCCTA TGGGACCAAG GGGAGTGAGG ATCTGCTCCT CCGGGTGCTA

[0153] 301 GCCATCACCA GCTCCTCCAT CCCCAAGAAC ATCCAGAGCC TCAGGTGCCG CCGCTGTGTG

[0154] 361 GTCGTGGGGA ACGGGCACCG GCTGCGGAAC AGCTCACTGG GAGATGCCAT CAACAAGTAC

[0155] 421 GATGTGGTCA TCAGATTGAA CAATGCCCCA GTGGCTGGCT ATGAGGGTGA CGTGGGCTCC

[0156] 481 AAGACCACCA TGCCTCTCTT CTACCCTGAA TCTGCCCCACT TCGACCCCAA AGTAGAAAAC

[0157] 541 AACCCAGACA CACTCCTCGT CCTGGTAGCT TTCAAGGCAA TGGACTTCCA CTGGATTGAG

[0158] 601 ACCATCCTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCGA AAGGGTTTCT GGAAACAGCC TCCCCTCATC

[0159] 661 TGGGATGTCA ATCCTAAACA GATTCGGATT CTCAACCCCT TCTTCATGGA GATTGCAGCT

[0160] 721 GACAAACTGC TGAGCCTGCC AATGCAACAG CCACGGAAGA TTAAGCAGAA GCCCACCACG

[0161] 781 GGCTGTGTGG CCATCACGCT GGCCCTCCAC CTCTGTGACT TGGTGCACAT TGCCGGCTTT

[0162] 841 GGCTACCCAG ACGCTACAA CAAGAAGCAG ACCATTCACT ACTATGAGCA GATCACGCTC

[0163] 901 AAGTCCATGG CGGGGTCAGG CCATAATGTC TCCAAGAGG CCCTGGCCAT TAAGCGGATG

[0164] 961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCACG TCCTTCTGA

[0165] ST3GAL4 단백질 서열

[0166] 1 MCPAGWLLA MLALVLVMV WYSISREDRY IELFYFPIPE KKEPCLQGEA ESKASKLFGN

[0167] 61 YSRDQPIFLR LEDYFWWKT SAYELPYGTK GSEDLLLRVL AITSSSIPKN IQSLRCRRCV

[0168] 121 VVGNGHRLRN SSLGDANKY DVVIRLNNAP VAGYEGDVGS KTMRLFYPE SAHFDPKVEN

[0169] 181 NPDTLVLVA FKAMDFHWIE TILSDKKVR KGFWKQPPLI WDVNPKQIRI LNPFFMEIAA

[0170] 241 DKLLSLPMQQ PRKIKQKPTT GLLAITLALH LCDLVHIAGF GYPDAYNKKQ TIHYEQITL

[0171] 301 KSMAGSGHNV SQEALAIKRM LEMGAIKNLT SF

[0172] **서열번호 4**

[0173] 베타-갈락토스아미드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제 1

[0174] 등재 번호 NM_003032

[0175] ST6GAL1 뉴클레오티드 서열

[0176] 1 atgattcaca ccaacctgaa gaaaaagtgc agctgctgcg tcctgggtctt tcttctgttt

[0177] 61 gcagtcacat gtgtgtggaa ggaaaagaag aaagggagtt actatgattc ctttaaattg

[0178] 121 caaaccaagg aattccaggt gttaaagagt ctggggaaat tggccatggg gtctgattcc

[0179] 181 cagtctgtat cctcaagcag caccacaggac cccacaggg gccgccagac cctcggcagt

[0180] 241 ctcagaggcc tagccaaggc caaacacagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc

[0181] 301 tcttccaaaa accttatccc taggctgcaa aagatctgga agaattacct aagcatgaac

[0182] 361 aagtacaaa tgctctacaa ggggccagga ccaggcatca agttcagtc agaggccctg

[0183] 421 cgctgccacc tccgggacca tgtgaatgta tccatggtag aggtcacaga ttttccttc

[0184] 481 aatacctctg aatgggaggg ttatctgccc aaggagagca ttaggaccaa ggctgggcct

[0185] 541 tggggcaggt gtgtgttgt gtctgcagcg ggatctctga agtcctcca actaggcaga

[0186] 601 gaaatcgatg atcatgacgc agtcctgagg tttaatgggg caccacagc caacttcaa

[0187] 661 caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctcagtttgt taccacagag

[0188] 721 aagcgttcc tcaaagacag tttgtacaat gaaggaatcc taattgtatg ggacctatct

[0189] 781 gtataccact cagatatccc aaagtgttac cagaatccgg attataattt ctttaacaac

[0190] 841 tacaagactt atcgtaagct gcacccaat cagccctttt acatcctcaa gcccagatg

[0191] 901 ccttgggagc tatgggacat tcttcaagaa atctccccag aagagattca gccaaacccc

[0192] 961 ccactctctg ggatgcttgg tatcatcatc atgatgacgc tgtgtgacca ggtggatatt

[0193] 1021 tatgagttcc tcccatccaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc

[0194] 1081 gatagtgcct gcacgatggg tgcctaccac ccgctgctct atgagaagaa tttggtgaag

[0195] 1141 catctcaacc agggcacaga tgaggacatc tacctgcttg gaaaagccac actgcctggc

[0196] 1201 ttccggacca ttcactgcta a

[0197] ST6GAL1 단백질 서열

[0198] 1 mihtnlkkkf scevlvllf avicvwkekk kgsyydsfkl qtkefqvlks lgklamgsds

[0199] 61 qsvsssstqd phrgrqtlgs lrglakakpe asfqvwnkds ssknliprlq kiwknylsmn

[0200] 121 kykvsykpgp pgikfsaeal rchlrhvnv smvevtdfpf ntsewegylp kesirtkagp

[0201] 181 wgrcavvssa gslkssqlgr eiddhdavlr fngaptanf qdvgtkttir lmnsqlvtte

[0202] 241 krflkdslyn egilivwdps vyhsdipkwy qnpdynffnn yktyrklhpn qpfyilkpqn

[0203] 301 pwelwdilqe ispeeiqnpn pssgmlgiii mmtlcdqvdi yeflpskrkt dvcyyyqkff

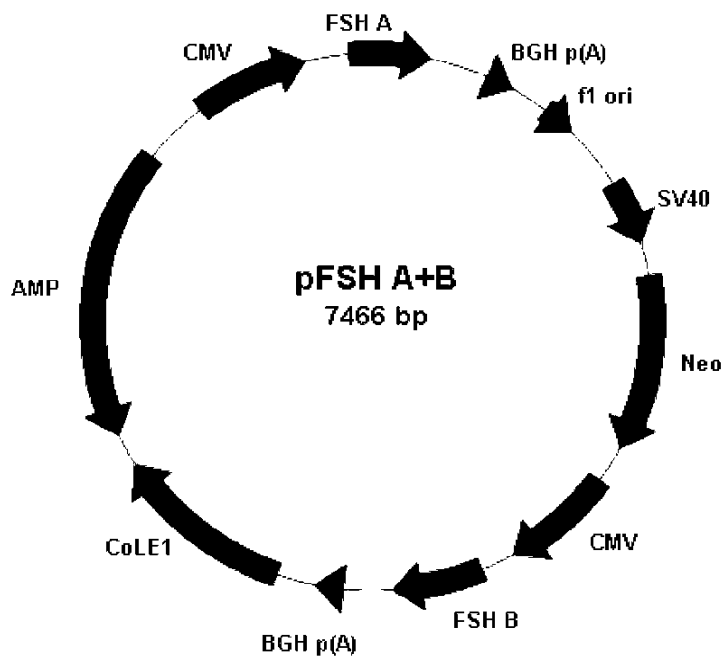
[0204] 361 dsactmgayh pllyeknlvk hlnqgtdedi yllgkatlpg frtihc

도면

도면1

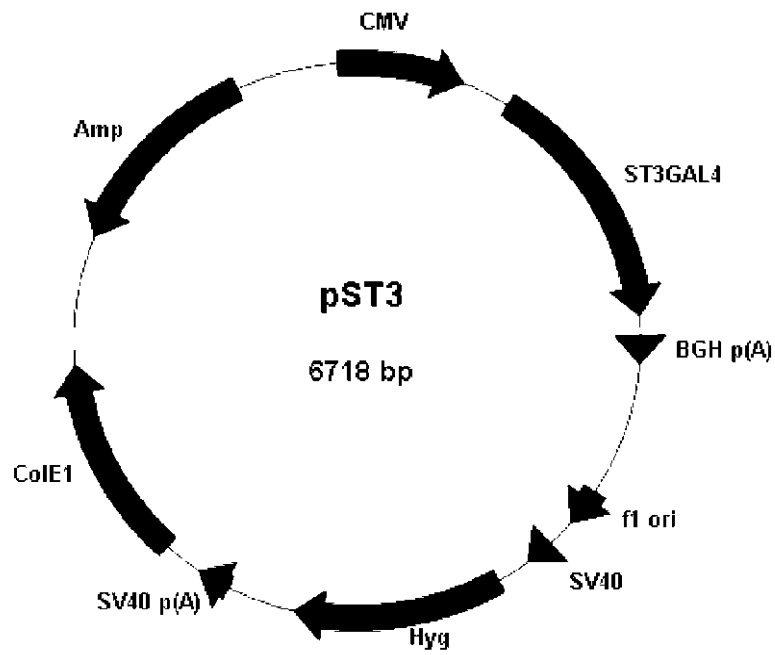
도 1, 2 및 3: pFSHalpha/beta, pST3 및 pST6 발현 벡터의 플라스미드 맵. CMV = 사이토메갈로바이러스 프로모터, BGHp(A) = 소 성장 호르몬 폴리-아데닐화 서열, f1 ori = f1 복제 오리진, SV40 = 유인원 바이러스 40 프로모터, Neo = 네오마이신 내성 마커, Hyg = 히그로마이신 내성 마커, SV40 p(A) = 유인원 바이러스 40 폴리-아데닐화 서열, FSH A = 여포 자극 호르몬 알파 폴리펩타이드, FSH B = 여포 자극 호르몬 베타 폴리펩타이드, ST3GAL4 = α 2,3-시알릴트랜스퍼라제, ST6GAL1 = α 2,6-시알릴트랜스퍼라제, CoIE1 = CoIE1 복제 오리진, Amp = 암피실린 내성 마커.

도 1. FSH 발현 벡터



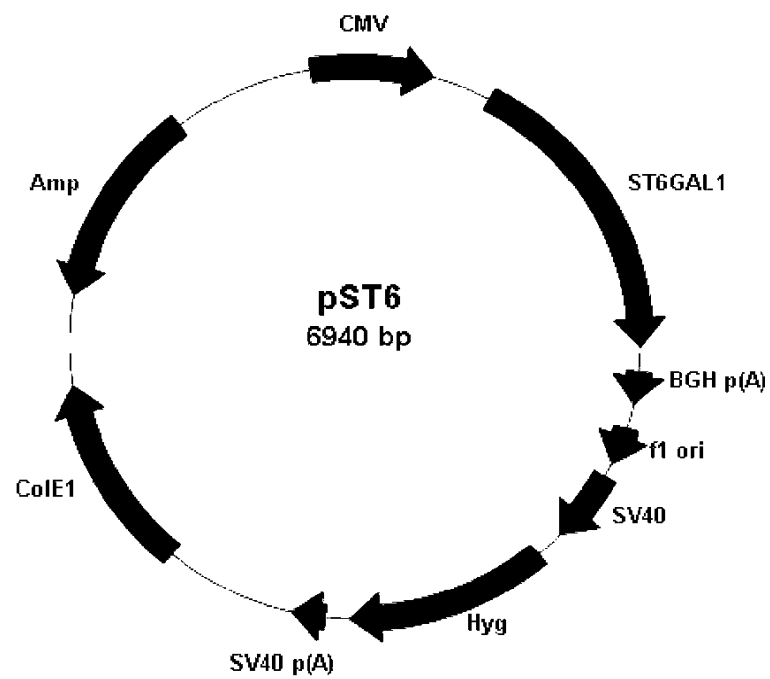
도면2

도 2. α 2,3-시알릴트랜스퍼라제 (ST3GAL4) 발현 벡터



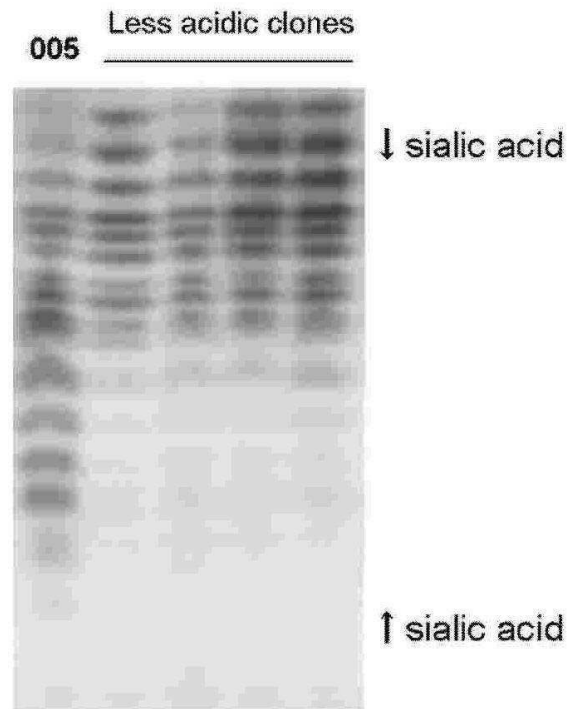
도면3

도 3. α 2,6-시알릴트랜스퍼라제 (ST6GAL1) 발현 벡터



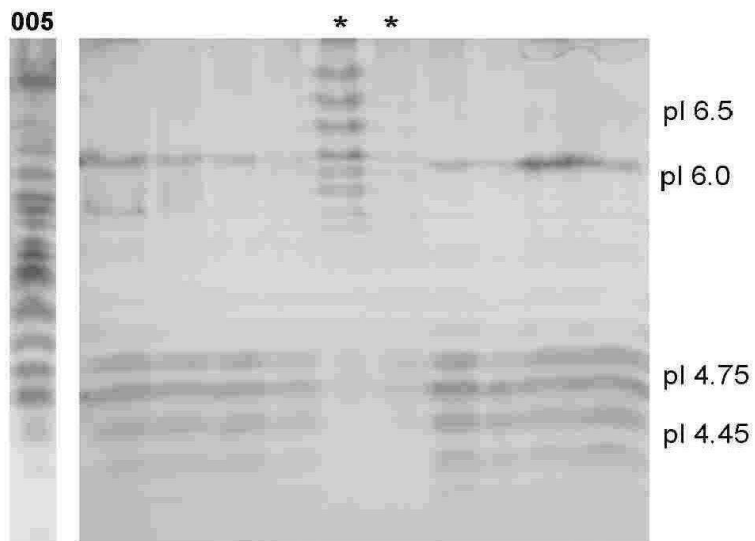
도면4

도 4. FSH 를 안정적으로 발현하는 Per.C6 세포에 의해 생산되는 재조합 FSH 의 등전 포커싱. 세포 배양 상층액은 pH 3.0 -7.0 구배 상에서 천연 조건 하에 분리시킴. 클론 005 시알릴트랜스퍼라제 조작용으로 취한 5 개의 클론 중 하나임. 산성 이소형이 적은 클론은 버림.



도면5

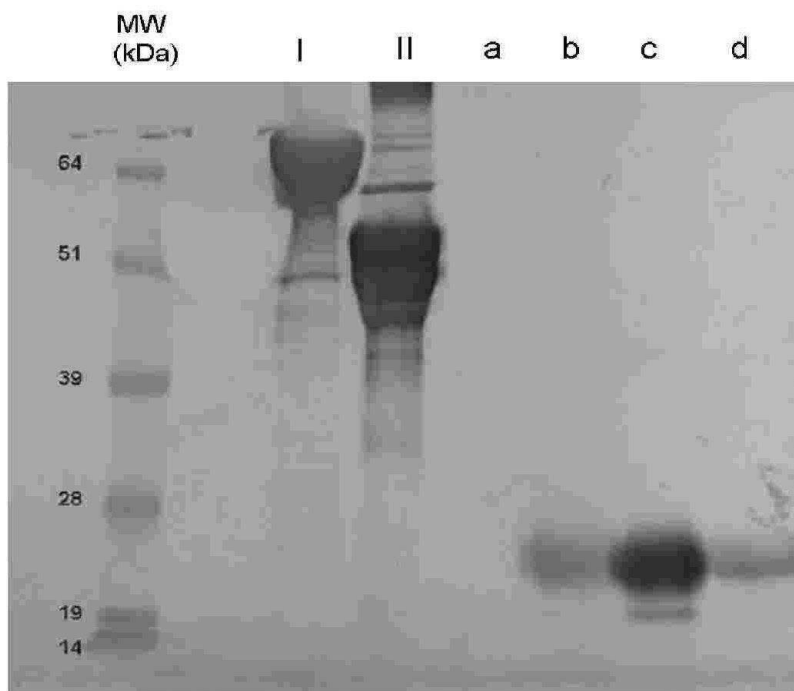
도 5. $\alpha 2,3$ - 또는 $\alpha 2,6$ -시알릴트랜스퍼라제로 조작한 후, 안정적으로 FSH 를 발현하는 Per.C6 세포에서 생산시킨 재조합 FSH 의 등전 포커싱 분석. 세포 배양 상층액을 pH 3.0 -7.0 구배로 천연 조건하에 분리시킴. 클론 005 은 모체 Per.C6 FSH 세포주임. 염기성 또는 혼성 프로파일을 보이는 클론들은 중지시킴(*). 나머지 클론들은 시알릴트랜스퍼라제로 성공적으로 조작되었음을 나타내며, FSH 에서의 시알산 분자의 수는 증가됨.



도면6a

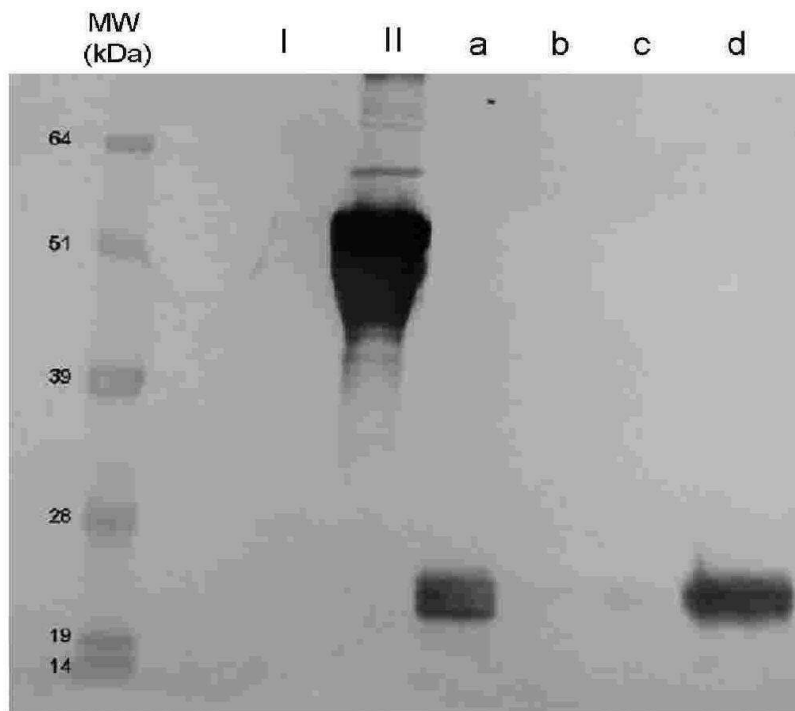
도 6. Per.C6 FSH 의 시알산 연결 분석. 정제된 Per.C6 FSH 를 2 세트로 SDS PAGE 로 분리하고, 니트로셀룰로스로 이동시켜 DIG 글리칸 구별 키트(Cat. No. 11 210 238 001, Roche)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 가시화하였다. SNA(*Sambucus nigra* agglutinin)과의 양성 반응은 말단이 (2-6) 연결된 시알산을 의미한다(A). MAA(*Maackia amurensis* agglutinin)와의 양성 반응은 말단이 (2-3) 연결된 시알산을 의미한다(B). 레인 I 은 α 2,6 연결만 있는 제조사의 대조군. 레인 II 는 α 2,6 연결과 α 2,3 연결이 포함된 제조사의 대조군. 샘플 a, CHO 유래의 시판되는 재조합 FSH (Gonal-f, Serono). 샘플 b, 모체 Per.C6 의 rFSH, 시알릴트랜스퍼라제 조작 안함. 샘플 c, α 2,6-시알릴트랜스퍼라제 조작한 Per.C6 rFSH. 샘플 d, α 2,3-시알릴트랜스퍼라제 조작한 Per.C6 rFSH.

A



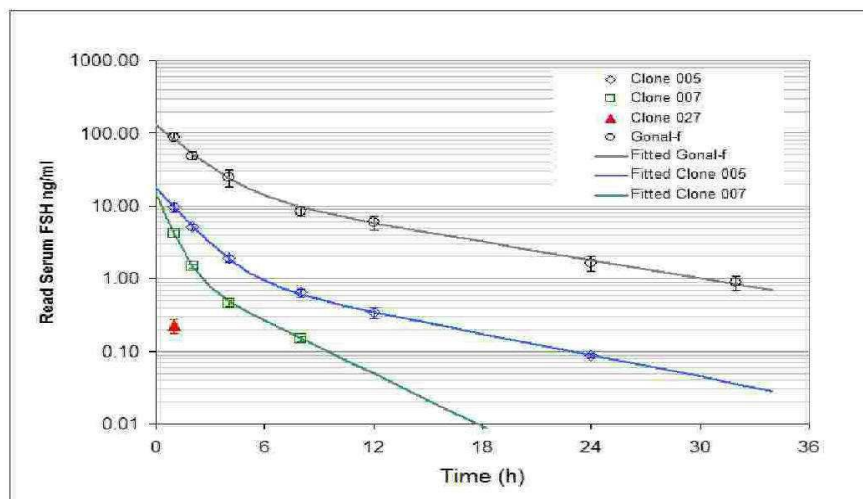
도면6b

B



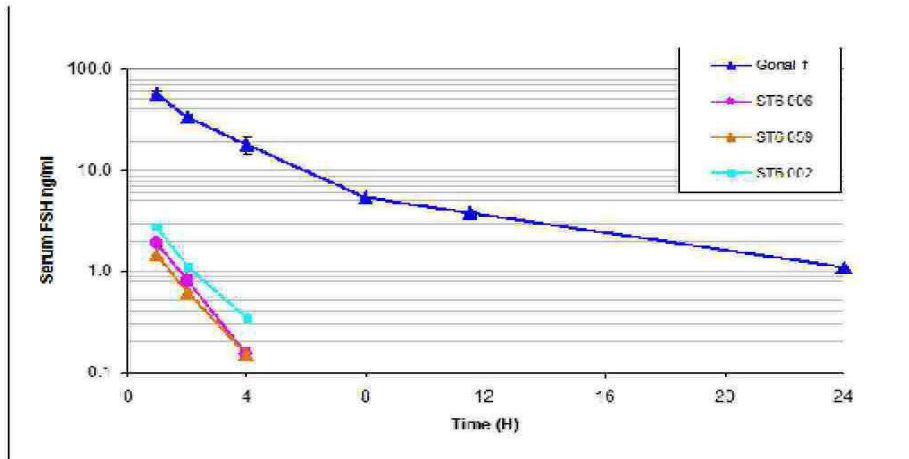
도면7

도 7. Per.C6 FSH 샘플의 대사 소거율. 암컷 래트(클론 당 3 마리)에 rFSH (1 - 10 μ g/rat)를 꼬리 정맥으로 0 시간에 블루스 주사하였다. 시간 경과에 따라 혈액 샘플을 취하여 ELISA 로 FSH 함량을 분석하였다.



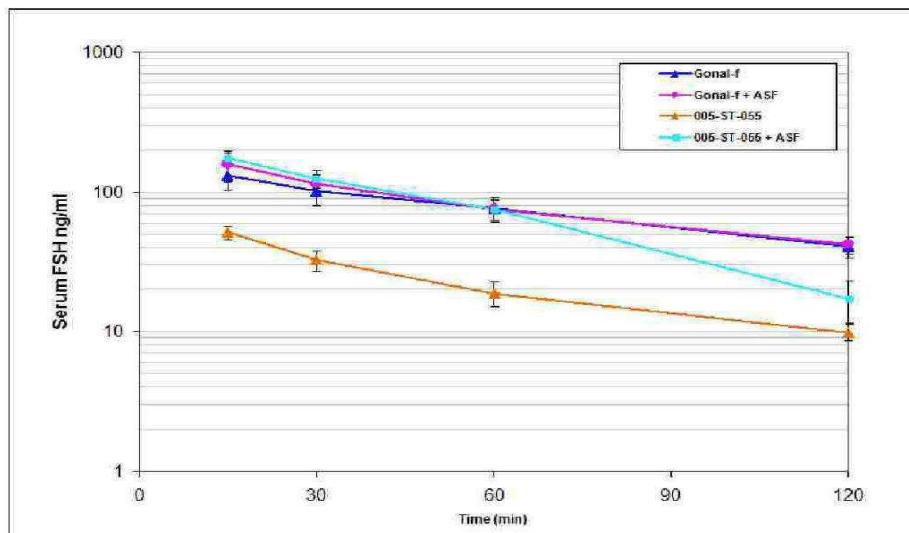
도면8

도 8. α 2,6-시알릴트랜스퍼라제로 조작시킨 Per.C6 FSH 샘플의 대사 소거율. 암컷 래트(클론 당 3 마리)에 rFSH (1 - 10 μ g/rat)를 꼬리 정맥으로 0 시간에 블루스 주사하였다. 시간 경과에 따라 혈액 샘플을 취하여 ELISA 로 FSH 함량을 분석하였다.



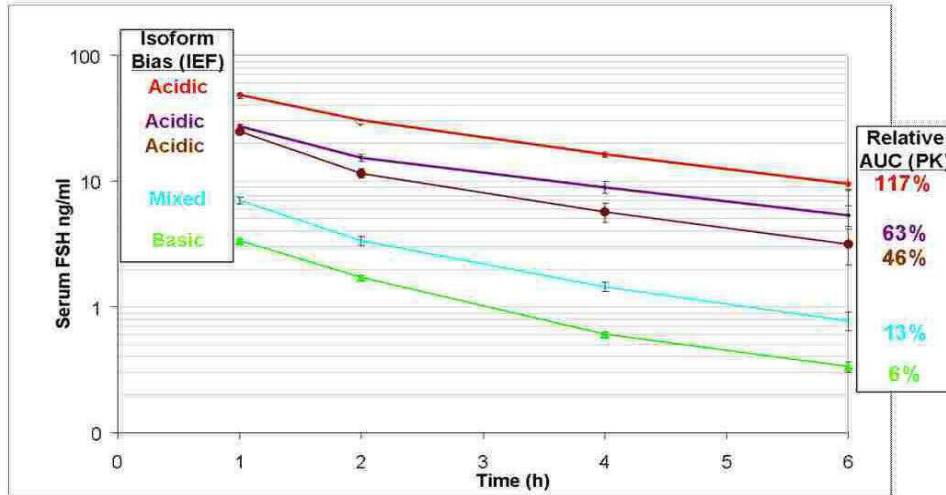
도면9

도 9. α 2,6-시알릴트랜스퍼라제로 조작한 Per.C6 FSH 샘플과 ASGP-R 을 포화시키기 위한 7500 배 물 과량의 아시알로페투인의 병용-투여의 대사 소거율.



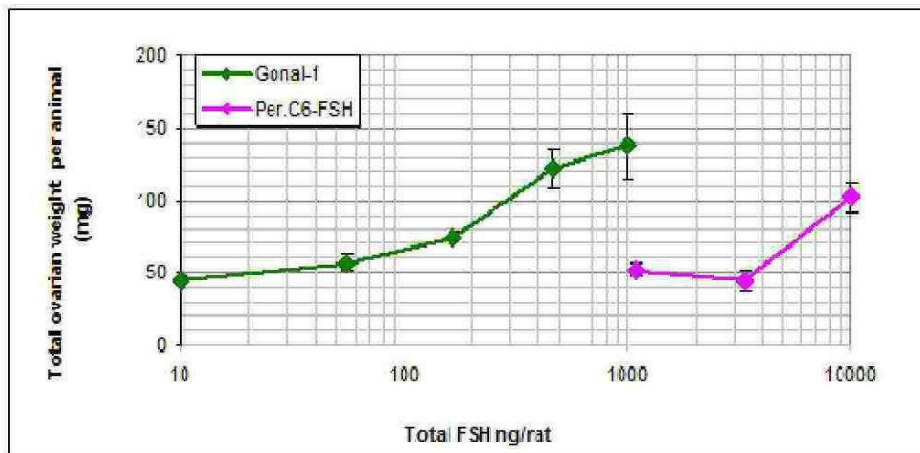
도면10

도 10. α 2,3-시알릴트랜스퍼라제로 조작한 Per.C6 FSH 샘플의 대사 소거율. IEF 프로파일을 기초로 시알산 함량에 따라 샘플을 선택함.



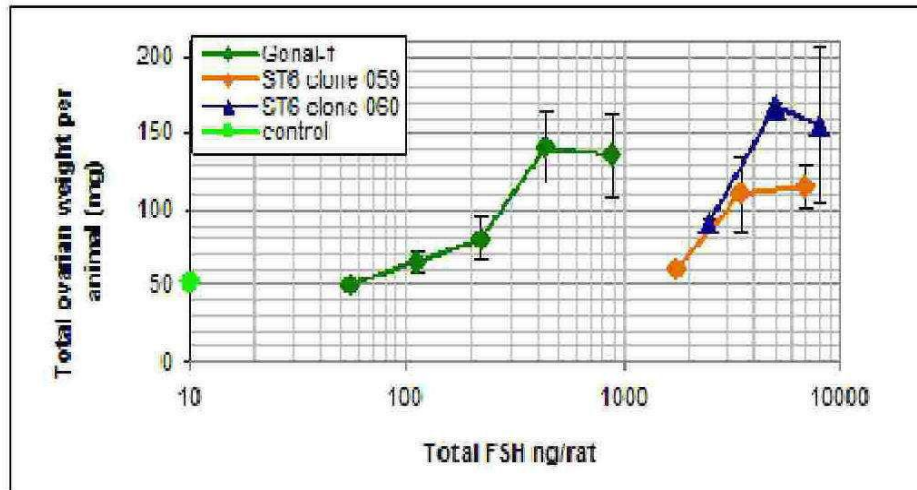
도면11

도 11. Steelman and Pohley (1953)의 방법에 따른 난소 무게 증가. Per.C6 rFSH 및 표준물질 (Gonal-f rFSH)을 여러가지 용량으로 테스트 하였다(용량 당 래트 3 마리).



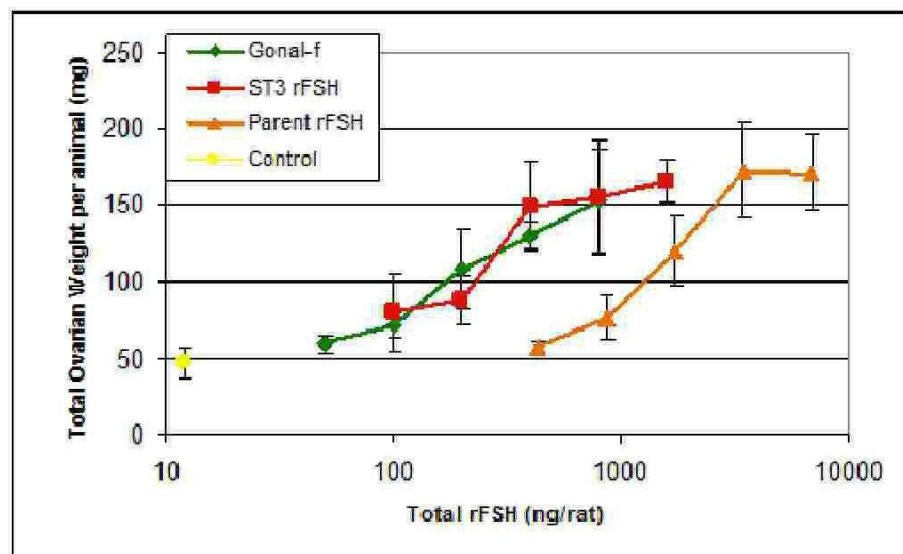
도면12

도 12. Steelman and Pohley (1953)의 방법에 따른 난소 무게 증가. α 2,6-시알릴트랜스퍼라제 조작한 Per.C6 의 rFSH 및 표준물질 (Gonal-f rFSH)을 여러가지 용량으로 테스트하였다(용량 당 래트 3 마리).



도면13

도 13. Steelman and Pohley (1953)의 방법에 따른 난소 무게 증가. 모 체 Per.C6 의 rFSH, α 2,3-시알릴트랜스퍼라제 조작한 Per.C6 의 rFSH 및 표준물질 (Gonal-f rFSH)을 5 가지 용량으로 테스트하였다(용량 당 래트 3 마리).



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Ferring International Center S.A.

<120> Pharmaceutical Preparation

<130> P/60084.W001

<150> US 61/045424

<151> 2008-04-16

<150> EP 08251528.9

<151> 2008-04-25

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggtca cattgtcggg gtttctgcat	60
gttctccatt ccgtctctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca	120
ttttctctcc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattg gctgctgctt ctctagagca	180
tatcccactc cactaaggct caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag	240
tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagt	300
gagaaccaca cggcgtgcca ctgcagtact tgttattatc aaaaatctta a	351

<210> 2

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

atgaagacac tccagttttt cttccttttc tgttgctgga aagcaatctg ctgcaatagc	60
tgtgagctga ccaacatcac cattgcaata gagaaagaag aatgtcgttt ctgcataagc	120
atcaacacca ctiggtgtgc tggctactgc tacaccaggg atctgggtga taaggaccca	180
gccaggccca aaatccagaa aacatgtacc ttcaaggaac tggtatatga aacagtgaga	240
gtgcccggt gtgtcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc caccagtggt	300

cactgtggca agtgtgacag cgacagcact gattgtactg tgcgaggcct ggggccccagc 360
tactgtctct ttggtgaaat gaaagaataa 390

<210> 3
<211> 999
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> SEQ ID 3 Nucleotide Sequence of ST3GAL4
<400> 3

atgtgtcctg caggctggaa gtcctcggcc atgttggctc tggtcctggt cgtcatggtg 60

tggtattcca tctcccgga agacaggtag atcgagcttt tttattttcc catcccagag 120
aagaaggagc cgtgcctcca gggtaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggaac 180
tactcccgga atcagcccat cttcctgcgg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca 240
tctgcttacg agctgccta tgggaccaag gggagtgagg atctgctcct ccgggtgcta 300
gccatcacca gtcctccat cccaagaac atccagagcc tcaggtagcg ccgtgtgtg 360
gtcgtggga acgggcaccg gctgcggaac agtcactgg gagatgcat caacaagtag 420
gatgtggtca tcagattgaa caatgcccc gtggctggct atgagggtga cgtgggctcc 480

aagaccacca tgcgtctctt ctacctgaa tctgccact tcgacccaa agtagaaaac 540
aaccagaca cactcctgt cctgtagct ttcaaggca tggacttcca ctggattgag 600
accatcctga gtgataaga gcgggtgca aagggtttct ggaaacagcc tcccctcatc 660
tggtatgtca atcctaaca gattcggatt ctcaaccct tcttcatgga gattgcagct 720
gacaaactgc tgagcctgcc aatgaacag ccacggaaga ttaagcaga gccaccacg 780
ggcctgttgg ccatcacgt ggccctccac ctctgtgact tggtagcat tgccgcttt 840
ggctaccag acgctacaa caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc 900

aagtccatgg cggggtcagg ccataatgtc tccaagagg ccctggccat taagcgatg 960
ctggagatgg gagctatcaa gaacctcacg tccttctga 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 tcctggtctt tcttctgttt 60

gcagtcattct gtgtgtggaa ggaaaagaag aaaggagatt actatgattc ctttaaattg 120
 caaaccaagg aattccaggt gttaaagagt ctggggaaat tggccatggg gtctgattcc 180
 cagtctgtat cctcaagcag caccacaggac cccacaggg gccgccagac cctcggcagt 240

ctcagaggcc tagccaaggc caaaccagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc 300
 tcttccaaaa 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 gtgtgttgt gtctgcagcg ggatctctga agtcctcca actaggcaga 600
 gaaatcgatg atcatgacgc agtcctgagg tttaatgggg caccacagc caacttcaa 660

caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctcagtttgt taccacagag 720
 aagcgcttcc tcaagacag tttgtacaat gaaggaatcc taattgtatg ggacccatct 780
 gtataccact cagatatccc aaagtggtag cagaatccgg attataattt ctttaacaac 840
 tacaagactt atcgtaagct gcacccaat cagccctttt acatcctcaa gcccagatg 900
 ccttgggagc tatgggacat tcttaagaa atctcccag aagagattca gcaaacccc 960
 ccatcctctg ggatgcttgg tatcatcatc atgatgacgc tgtgtgacca ggtggatatt 1020
 tatgagttcc tccatccaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc 1080

gatagtgcct gcacgatggg tgcctaccac ccgtgctct atgagaagaa tttggtgaag 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 FSH 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> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Sequence of FSH beta

<400> 6

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile

1 5 10 15
Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
20 25 30
Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
35 40 45
Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
50 55 60
Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg

65 70 75 80
Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
85 90 95
Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys

100 105 110
 Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
 115 120 125
 Glu

<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 FSHa-fw

<400> 9

ccaggatccg ccaccatgga ttactacaga aaaatatgc 39

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer FSHa-rev

<400> 10

ggatggctag cttaagattt gtgataataa c 31

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer FSHb-fw

<400> 11

ccaggcgcgc caccatgaag acactccagt tttc 35

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer FSHb-rev

<400> 12

ccgggttaac ttattattct ttcatttcac caaagg 36

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer 2,3STfw

<400> 13

ccaggatccg ccaccatgtg tctgcaggc 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 aagttagcag tgaatgggcc gg	32