



MD/EP 3286209 T2 2021.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3286209 (13) T2

(51) Int. Cl.:C07K 14/59 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0206 (22) Data de depozit: 2016.04.22 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european:16721722.3, 2016.04.22 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3286209, 2018.02.28 (31) Numărul cererii prioritare: 15164965 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.04.24 (33) Țara cererii prioritare: EP	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 04/2021, 2021.04.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 48/2020, 2020.11.25 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2018, 2018.04.30
(71) Solicitant: FERRING BV, NL (72) Inventatori: PLAKSIN Daniel, NL; GRINHUT Ayelet, NL (73) Titular: FERRING BV, NL (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Metodă de producere a gonadotrofinei

(57) Rezumat:

1

O celulă gazdă caracterizată prin aceea că cuprinde în genomul său o secvență care codifică un lanț de hCG și utilizarea celulei gazdă pentru a produce hCG recombinant.

Secvențe: 12

Revendicări: 8

Figuri: 7

2

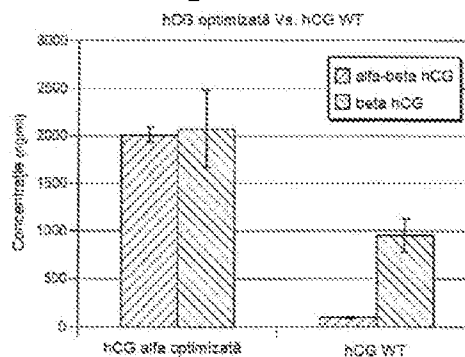


FIG. 7

MD/EP 3286209 T2 2021.04.30

(54) Method of production of gonadotrophin**(57) Abstract:**

1

A host cell characterized in that it comprises integrated into its genome a sequence coding for the a chain of hCG, and use of the host cell to produce recombinant hCG.

2

Sequences: 12

Claims: 8

Fig.: 7

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Prezenta invenție se referă la gonadotrofine pentru utilizare în tratamentul infertilității. În mod special, invenția se referă la gonadotrofina corionică umană (hCG).

Gonadotrofinele sunt un grup de hormoni glicoproteici heterodimerici care reglează funcția gonadică la bărbat și la femeie. Acestea includ hormonul de stimulare foliculară (FSH), hormonul luteinizant (LH) și gonadotrofina corionică (CG).

Gonadotrofina corionică umană (hCG) este secretată, în principal, de placenta umană în timpul sarcinii și susține menținerea corpului galben. hCG cuprinde o subunitate alfa de 92 aminoacizi (lanțul α), comună și celorlalți hormoni glicoproteici LH și FSH, și o subunitate beta de 145 aminoacizi (lanțul β) unică pentru hCG, care determină specificitatea hormonului. Fiecare subunitate este modificată post-translațional prin adăugarea de resturi complexe de carbohidrați. Subunitatea alfa conține site-uri de glicozilare 2-N-legate la aminoacizii 52 și 78 și subunitatea beta conține site-uri de glicozilare 2-N-legate la aminoacizii 13 și 30 și patru site-uri de glicozilare O-legate la aminoacizii 121, 127, 132 și 138.

hCG extrasă din urina femeilor însărcinate [Choragon (Ferring)] a fost folosită timp de mulți ani în tratamentul infertilității. Producerea de hCG extrasă din urină implică colectarea și prelucrarea unor cantități mari de urină. Ovitrelle (Serono), o versiune recombinantă a hCG este de asemenea disponibilă pentru utilizare în tratamentul infertilității. Acest produs recombinant este exprimat în celule din ovarul de hamster chinezesc (CHO) și are un profil farmacocinetic diferit de cel al hCG produsă din urina umană.

Există o eterogenitate considerabilă asociată cu preparatele hCG care se referă la diferențele în cantitățile diferitelor izoforme prezente. Izoformele hCG individuale prezintă secvențe de aminoacizi identice, dar diferă în măsura în care sunt modificate post-translațional; izoformele particulare sunt caracterizate prin eterogenitatea structurilor ramificate de carbohidrați și cantitățile diferite de incorporare a acidului sialic (un zahăr terminal), ambele părând să influențeze bioactivitatea specifică a izoformei.

Glicozilarea produselor hCG recombinante ("rhCG") reflectă gama de glicozil-transferaze prezente în linia de celule gazdă. Produsul rhCG care există, Ovitrelle, este derivat din celulele ovariene de hamster chinezesc modificate genetic (celule CHO). Gama de modificări ale glicanului în rhCG derivată din CHO este mai limitată decât cele găsite pe produsele naturale, derivate din urină. Exemple de eterogenitate a glicanului redusă găsită în rhCG derivată din CHO includ lipsa glucosaminei bisectante și un conținut redus de fucosilare a nucleului și extensii de acetil lactozamină. În plus, celulele CHO sunt capabile să adauge numai acid sialic folosind legătura α 2,3 (Kagawa și colaboratorii, 1988; Takeuchi și colaboratorii, 1988; Svensson și colaboratorii, 1990).

Gonadotrofina hCG din urina umană (adică hCG extrasă din urina femeilor însărcinate) care a fost utilizată până în prezent în tratamentul infertilității este, de fapt, hCG placentară; hCG produsă în placenta (umană) și apoi excretată în urină. Această hCG este extrasă din urină pentru utilizare ca produs farmaceutic. Bousfield și colaboratorii (Rev Endocr Metab Disord (2011) 12: 289-302) afirmă că "în timp ce gonadotrofinele hipofizare prezintă atât acid sialic legat α 2,3- cat și α 2,6-, hCG placentară și gonadotrofine recombinante produse în celulele ovariene de hamster chinezesc posedă doar acid sialic legat α 2,3-". Astfel, hCG din urina umană (care este produsă în placenta) include numai α 2,3-sialilare (cum ar fi produsele recombinante derivate din linia celulară CHO). Astfel, compozițiile farmaceutice cunoscute care includ hCG includ doar acid sialic α 2,3- legat dar nu includ acid sialic α 2,6- legat.

S-a demonstrat că un preparat FSH recombinant (Organon) diferă în cantitățile de FSH cu un punct izoelectric (pI) mai mic de 4 (considerate izoforme acide) în comparație cu FSH din urină pituitară, serică sau post-menopauză (Ulloa-Aguirre și colaboratorii, 1995). Cantitatea de izoforme acide în preparatele urinare de FSH a fost mult mai mare în comparație cu produsele recombinante, Gonal-f (Serono) și Puregon (Organon) (Andersen și colaboratorii 2004). Aceasta trebuie să reflecte un conținut molar mai scăzut de acid sialic în rFSH, deoarece conținutul de glican încărcat negativ modificat cu sulfat este scăzut în FSH. Conținutul mai scăzut de acid sialic, în comparație cu FSH natural, este o caracteristică a ambelor produse FSH disponibile comercial și, prin urmare, trebuie să reflecte o limitare în procesul de fabricație (Bassett și Drievergen, 2005). Durata de viață circulatorie a FSH a fost documentată pentru materiale provenite dintr-o varietate de surse. Unele dintre aceste materiale au fost fracționate pe baza sarcinii moleculare generale, așa cum sunt caracterizate prin până la-ul acestora, în care mai mult acid echivalează cu o sarcină negativă mai mare. Principalul factor care contribuie la încărcarea moleculară generală este

conținutul sialic total al fiecărei molecule FSH. De exemplu, rFSH (Organon) are un conținut de acid sialic de aproximativ 8 mol/mol, în timp ce FSH derivat din urină are un conținut mai mare de acid sialic (de Leeuw și colaboratorii 1996). Ratele de clearance plasmatică corespunzătoare la șobolan sunt de 0,34 și 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre și colaboratorii 2003). Într-un alt exemplu în care un eșantion de FSH recombinant a fost împărțit în fracțiuni pl ridicate și scăzute, eficacitatea *in vivo* a fracțiunii pl ridicat (conținut mai mic de acid sialic) a fost redusă și a avut un timp de înjumătățire plasmatică mai scurt (D'Antonio și colaboratorii 1999). Solicitanții au constatat că, similar cu FSH, produsul hCG recombinant, cunoscut, derivat din CHO (de exemplu Ovitrelle) are, de asemenea, o cantitate mai mică de hCG cu un punct izoelectric (pl) mai mic de 4 (considerate izoforme acide) decât hCG din urină, ceea ce reflectă, de asemenea, un conținut mai scăzut de acid sialic al produsului rhCG cunoscut, în comparație cu hCG din urină.

Solicitanții au dezvoltat o hCG recombinantă derivată de la om (adică o hCG recombinantă care este produsă sau exprimată într-o linie celulară umană, de exemplu realizată prin ingineria genetică a unei linii celulare umane) care are un profil mai acid decât produsul rhCG derivat din linia celulară CHO, Ovitrelle și care are un conținut mai mare de acid sialic. Această rhCG face obiectul cererii internaționale de brevet nr. PCT/GB2010/001854, publicat ca WO 2011/042688. Respectiva hCG recombinantă cu un amestec de acid sialic atât α 2,3-legat cât și α 2,6-legat a fost realizată prin proiectarea genetică a unei linii celulare umane pentru a exprima atât rhCG cât și α 2,3 sialiltransferaza. Produsul exprimat este foarte acid, având un conținut de acid sialic [exprimat în termenii unui raport de moli de acid sialic la moli de proteine] de exemplu 19,1 mol/mol și poartă un amestec de acizi sialici α 2,3-legați și α 2,6-legați; acest din urmă raport fiind asigurat de activitatea sialil transferazei endogene. Cercetările solicitanților indică faptul că tipul de legătură a acidului sialic, α 2,3-legat sau α 2,6-legat poate avea o influență deosebit de puternică asupra clearance-ului biologic al hCG. Liniile celulare umane, spre deosebire de liniile celulare CHO, pot exprima hCG recombinantă cu acizi sialici atașați atât prin legături α 2,3-, cât și prin legături α 2,6-.

Linia celulară din WO 2011/042688 exprimă hCG recombinantă derivată de la om. Cu toate acestea, linia celulară exprimă, de asemenea, un nivel relativ ridicat al lanțului β liber (subunitate beta liberă) și a fost necesară purificarea (pentru a elimina acest lanț β liber din produsul hCG).

Solicitanții au dezvoltat acum o nouă linie celulară care exprimă atât rhCG, cât și α 2,3 sialiltransferază, și care produce rhCG cu o cantitate redusă de lanț β liber, îmbunătățind astfel randamentul și reducând nivelul necesar de purificare al produsului (a se vedea Figura 7).

Conform prezentei invenții, este prevăzută o celulă (de exemplu, celulă gazdă) caracterizată prin aceea că aceasta cuprinde, integrată în genomul său o secvență (acid nucleic) care codifică respectivul lanț α din hCG selectată dintre: o secvență conform SECV ID NR: 1; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența din SECV ID NR: 1 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 96,5% identitate de secvență cu secvența din SECV ID NR: 1); o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența din SECV ID NR: 1 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) secvența din SECV ID NR: 1); o secvență conform SECV ID NR: 4; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența din SECV ID NR: 4 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 96,5% identitate de secvență cu secvența din SECV ID NR: 4); și o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența din SECV ID NR: 4 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) secvența din SECV ID NR: 4). De preferință, secvența (acid nucleic) care codifică lanțul α din hCG nu este secvența care este înregistrată ca AH007338 (adică, de preferință, secvența (acid nucleic) care codifică lanțul α din hCG nu este cea prezentată în SECV ID NR: 5). În plus, celula poate cuprinde, integrat, în genomul său un ADNc care codifică o alfa-2,3-sialiltransferază, de exemplu o secvență conform SECV ID NR: 3. Celula poate cuprinde în plus, integrată, în genomul său o secvență (acid nucleic) care codifică lanțul β din hCG, de exemplu secvența conform SECV ID NR: 2.

Celula gazdă poate fi, de exemplu, o celulă PER.C6®, o celulă HT1080, o celulă GT-5s etc. De preferință, celula este o celulă PER.C6®.

Se va aprecia că termenul "o secvență care codifică lanțul α din hCG" sau "o secvență (acid nucleic) care codifică lanțul α din hCG" utilizat în prezenta se referă de asemenea la o secvență care codifică lanțul α din FSH (sau o secvență care codifică lanțul α din LH) deoarece lanțul α din hCG este același cu cel pentru FSH (și LH).

Termenul "secvență de acid nucleic" se referă, în prezenta, la oricare moleculă de acid nucleic care codifică polipeptide cum ar fi peptide, proteine etc. Aceste molecule de acid nucleic

pot fi formate din ADN, ARN sau analogi ai acestora. Totuși, sunt preferate moleculele de acid nucleic obținute pornind de la ADN.

Persoana de specialitate în domeniu este în măsură să înțeleagă în mod clar faptul că modificarea unei secvențe de nucleotide de pornire descrie procesul de optimizare în ceea ce privește utilizarea codonilor. Modificările introduse pot fi identificate cu ușurință comparând secvența modificată și secvența de pornire. Mai mult decât atât, ambele secvențe (adică secvența de pornire și secvența optimizată) vor codifica aceeași secvență de aminoacizi.

Secvența de aminoacizi a lanțului α din hCG umană este dezvăluită în WO2011/042688 (menționată ca SECV ID NR: 1 în acel document) și aceasta este cea descrisă în Fiddes și Goodman 1979. Aceasta este înregistrată ca AH007388 și, în cele ce urmează este prezentată ca SECV ID NR: 5. Secvența de aminoacizi a lanțului β din hCG umană este prezentată în SECV ID NR: 2 și este înscrisă ca NP 000728. Aceste secvențe de aminoacizi corespund secvențelor de aminoacizi de tip sălbatic ale lanțului α - și ale lanțului β - din hCG umană. Termenii "secvență de acid nucleic de tip sălbatic" sau "secvență de acid nucleic de pornire" pentru scopurile prezentei invenții se referă la o secvență de acid nucleic care este destinată a fi utilizată pentru (supra)exprimarea într-o celulă gazdă și care nu a fost adaptată la utilizarea codonilor din celula gazdă, dar este secvența efectivă de acid nucleic de tip sălbatic care codifică proteina. Termenul "secvență de acid nucleic optimizată" pentru scopurile prezentei invenții se referă la o secvență care a fost modificată pentru exprimare într-o celulă gazdă prin adaptarea secvenței de acid nucleic nemodificat/de pornire. O secvență de acid nucleic optimizată codifică o proteină care are aceeași secvență de aminoacizi ca proteina codificată de secvența nemodificată. Solicitanții au dezvoltat o secvență optimizată care codifică lanțul α - din hCG (a se vedea de exemplu SECV ID NR: 1 și 4, Figura 1).

Conform prezentei invenții, într-un alt aspect, este furnizată o secvență de polinucleotide (de exemplu, o secvență de polinucleotide care codifică lanțul α din hCG) care cuprinde o secvență selectată dintre o secvență de acid nucleic conform SECV ID NR: 1; o secvență de acid nucleic conform SECV ID NR: 4; o secvență de acid nucleic cu cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) acidul nucleic din SECV ID NR: 1 și o secvență de acid nucleic cu cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) acidul nucleic din SECV ID NR: 4.

Conform prezentei invenții, într-un alt aspect, este furnizată o metodă de producere a hCG recombinantă într-o celulă, metodă care cuprinde cultivarea celulei într-un mediu adecvat și recoltarea proteinei recombinante (hCG) din respectiva celulă și/sau mediul menționat (de exemplu, recoltarea hCG recombinantă din supernatantul culturii celulare), în care celula (celula gazdă) cuprinde, integrată, în genomul său o secvență (acid nucleic) care codifică lanțul α din hCG selectată dintre: o secvență conform SECV ID NR: 1; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența din SECV ID NR: 1 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența din SECV ID NR: 1); o secvență conform SECV ID NR: 4; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența din SECV ID NR: 4 (de exemplu o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența din SECV ID NR: 4; și o secvență care are cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) secvența din SECV ID NR: 4). De preferință, secvența (acid nucleic) care codifică lanțul α din hCG nu este secvența care este înregistrată ca AH007338. Celula poate cuprinde, în plus, integrat în genomul său un ADNc care codifică o alfa-2,3-sialiltransferază, de exemplu o secvență conform SECV ID NR: 3. Celula poate cuprinde, în plus, integrată în genomul său o secvență (acid nucleic) care codifică lanțul β din hCG, de exemplu secvența conform SECV ID NR: 2. Metoda poate include o etapă sau etape suplimentară(e) de purificare a hCG recombinantă obținută din celula menționată și/sau mediul menționat (de exemplu purificarea hCG recombinantă din supernatantul culturii celulare).

Celula (gazdă) poate fi, de exemplu, o celulă PER.C6®, o celulă HT1080, o celulă GT-5s etc.. De preferință, celula este o celulă PER.C6®.

Secvența (acid nucleic) care codifică lanțul α din hCG poate fi selectată dintre: o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența SECV ID NR: 1 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) secvența din SECV ID NR: 1); o secvență conform SECV ID NR: 4; o secvență care are cel puțin 90% omologie cu secvența din SECV ID NR: 4 (de exemplu o secvență care are cel puțin 90% identitate de secvență cu secvența din SECV ID NR: 4); și o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența din SECV ID NR: 4 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin

99% identitate de secvență cu) secvența SECV ID NR: 4). De preferință, secvența (acid nucleic) care codifică lanțul α din hCG nu este secvența care este înregistrată ca AH007338. Celula poate cuprinde, în plus, integrat, în genomul său un ADNc care codifică o alfa-2,3-sialiltransferază, de exemplu o secvență conform SECV ID NR: 3. Celula poate cuprinde, în plus, integrată în genomul său o secvență (acid nucleic) care codifică lanțul β din hCG, de exemplu secvența conform SECV ID NR: 2. Metoda poate include o etapă sau etape suplimentară(e) de purificare a hCG recombinantă obținută din celula menționată și/sau mediul menționat (de exemplu purificarea hCG recombinantă din supernatantul culturii celulare).

Termenul "celulă gazdă" pentru scopurile prezentei invenții se referă la oricare celulă care este utilizată, în mod obișnuit, pentru exprimare, adică transcripția și translația secvențelor de acid nucleic pentru producerea de exemplu a polipeptidelor. În special, termenul "celulă gazdă" sau "organism" se referă la procariote, eucariote inferioare, plante, celule de insecte sau sisteme de cultură de celule de mamifere. De preferință, celula gazdă este o celulă de mamifer, mai preferabil celula gazdă este o celulă umană, chiar mai preferabil celula gazdă este o celulă PERC6®.

[0023] Termenul "moleculă de acid nucleic recombinant" în înțelesul prezentei invenții este destinat să cuprindă toate felurile de molecule de acid nucleic care sunt capabile să fie introduse într-o celulă gazdă și să efectueze exprimarea unei secvențe de acid nucleic care este conținută în molecula de acid nucleic recombinant. Termenul include, de exemplu, vectori plasmidici și vectori virali (de exemplu, vectori adenovirali, lentivirali și retrovirali), așa cum este bine cunoscut în domeniu.

Este oferită o moleculă de acid nucleic recombinant care cuprinde o (primă) secvență de acid nucleic care codifică lanțul α din hCG, care (primă) secvență de acid nucleic este selectată dintre o secvență conform SECV ID NR: 1; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența din SECV ID NR: 1 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 96,5% identitate de secvență cu secvența din SECV ID NR: 1); o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența din SECV ID NR: 1 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) secvența din SECV ID NR: 1); o secvență conform SECV ID NR: 4; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența din SECV ID NR: 4 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 96,5% identitate de secvență cu secvența din SECV ID NR: 4; și o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența din SECV ID NR: 4 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) secvența din SECV ID NR: 4). Molecula de acid nucleic recombinant cuprinde atât o secvență de acid nucleic optimizată care codifică lanțul α din hCG umană, cât și o secvență de acid nucleic care codifică lanțul β din hCG. De preferință, (prima) secvență de acid nucleic este sub controlul unui promotor care este activ într-o celulă gazdă. De preferință, molecula de acid nucleic recombinant mai cuprinde o a doua secvență de acid nucleic care codifică lanțul β din hCG. Cea de a doua secvență de acid nucleic care codifică lanțul β din hCG poate fi secvența conform SECV ID NR: 2.

Cea de a doua secvență de acid nucleic poate fi sub controlul unui promotor separat care este activ într-o celulă gazdă. Prima secvență de acid nucleic și/sau cea de a doua secvență de acid nucleic poate fi sub controlul unui promotor viral (de exemplu, un promotor CMVie).

Este oferită o celulă gazdă care cuprinde sau care include o moleculă de acid nucleic recombinant așa cum a fost prezentată anterior (de exemplu, o celulă gazdă care cuprinde o moleculă de acid nucleic recombinant care cuprinde o (primă) secvență de acid nucleic care codifică lanțul α din hCG umană, care (primă) secvență de acid nucleic este selectată dintre o secvență conform SECV ID NR: 1; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența din SECV ID NR: 1 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 96,5% identitate de secvență cu secvența din SECV ID NR: 1); o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența din SECV ID NR: 1 (de exemplu secvență care are cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) secvența SECV ID NR: 1); o secvență conform SECV ID NR: 4; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența SECV ID NR: 4 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 97% omologie cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% omologie cu) secvența din SECV ID NR: 4 (de exemplu, o secvență care are cel puțin 97% identitate de secvență cu (de exemplu, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență cu) secvența SECV ID NR: 4).

Solicitanții au constatat că celulele (celulele gazdă), liniile celulare care încorporează aceste celule gazdă, moleculele de acid nucleic recombinant, polinucleotidele și metodele conform

invenției pot produce hCG recombinantă cu randament și puritate ridicate (de exemplu, cu puțin lanț beta liber).

In cele de față, hCG recombinantă ("rhCG" sau "rechCG") include $\alpha 2,3$ -sialilare și $\alpha 2,6$ -sialilare și hCG recombinantă este produsă într-o celulă așa cum este descris și revendicat în prezenta. Respectiva hCG recombinantă poate avea un conținut de acid sialic [exprimat în termeni privind raportul de moli de acid sialic față de moli de proteine] cuprins în intervalul de la 12 mol/mol până la 20 mol/mol, de exemplu de la 12 mol/mol până la 15,5 mol/mol, de exemplu de la 12 mol/mol până la 14,9 mol/mol. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) poate avea un conținut de acid sialic cuprins în intervalul de la 12,5 mol/mol până la 14,5 mol/mol, de exemplu un conținut de acid sialic de la 12,8 mol/mol până la 13,2 mol/mol. Respectiva rhCG (sau preparatul rhCG) poate avea un conținut de acid sialic de 13 mol/mol.

Respectiva rhCG poate fi prezentă ca o singură izoformă sau ca un amestec de izoforme.

Respectiva rhCG recombinantă (sau preparat rhCG) produsă prin metodele și celulele conform invenției include $\alpha 2,3$ -sialilare și $\alpha 2,6$ -sialilare. Prin sialilare se înțelege cantitatea de resturi sialice prezente pe structurile de carbohidrați hCG. Exprimarea $\alpha 2,3$ -sialilare înseamnă sialilare în poziția 2,3 (așa după cum este bine cunoscut în domeniu); și sialilarea $\alpha 2,6$ înseamnă sialilare la poziția 2,6 (de asemenea, bine cunoscută în domeniu). Astfel, în prezenta, exprimarea "% din sialilarea totală poate fi o sialilare $\alpha 2,3$ " se referă la % din numărul total de resturi de acid sialic prezente în hCG care sunt sialilate în poziția 2,3. Termenul "% din sialilarea totală care este $\alpha 2,6$ -sialilare" se referă la % din numărul total de resturi de acid sialic prezente în hCG care sunt sialilate în poziția 2,6. Termenul "% din sialilarea totală care este $\alpha 2,8$ -sialilare" se referă la % din numărul total de resturi de acid sialic prezente în hCG care sunt sialilate în poziția 2,8.

Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) produsă prin metodele și cu celulele conform invenției poate avea de la 1% până la 99% din sialilarea totală care este $\alpha 2,3$ -sialilare. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) produsă prin metodele și cu celulele conform invenției poate avea 1% până la 90% din sialilarea totală care este $\alpha 2,3$ -sialilare. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) conform invenției poate avea 10% sau mai mult din sialilarea totală ca fiind $\alpha 2,3$ -sialilare, de exemplu, 10% până la 90% din sialilarea totală poate fi $\alpha 2,3$ -sialilare. De exemplu, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 sau 90% sau mai mult din sialilarea totală poate fi $\alpha 2,3$ -sialilare. 45% până la 80% din sialilarea totală poate fi $\alpha 2,3$ -sialilare, de exemplu 50% până la 70% din sialilarea totală poate fi $\alpha 2,3$ -sialilare. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) poate include $\alpha 2,3$ -sialilare într-o cantitate care este de la 65% până la 95% din sialilarea totală, de exemplu de la 70% până la 90% din sialilarea totală, de exemplu de la 85 la 90% din sialilare totală.

Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) produsă prin metodele și cu celulele conform invenției poate avea de la 1 până la 99% din sialilarea totală ca fiind $\alpha 2,6$ -sialilare. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) conform invenției poate avea de la 5 până la 50% din sialilarea totală ca fiind $\alpha 2,6$ -sialilare. De exemplu de la 5 până la 45%, de exemplu de la 6 până la 40%, de exemplu de la 7 până la 30%, de exemplu de la 8 până la 20% din sialilarea totală poate fi $\alpha 2,6$ -sialilare. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) poate include $\alpha 2,6$ -sialilare într-o cantitate care este cuprinsă în intervalul de la 20 până la 75% din sialilarea totală, de exemplu, de la 30 până la 60% din sialilarea totală, de exemplu de la 35 până la 45% din sialilarea totală. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) poate include $\alpha 2,6$ -sialilarea într-o cantitate care este de la 5 până la 35% din sialilarea totală, de exemplu de la 10 până la 20% din sialilarea totală. De exemplu, de la 11 până la 55% din sialilarea totală poate fi $\alpha 2,6$ -sialilare.

Respectiva rhCG sau preparatul rhCG produsă(produs) prin metodele și cu celulele conform invenției mai poate include, opțional, $\alpha 2,8$ -sialilarea. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) conform invenției poate avea 5% sau mai puțin din sialilarea totală ca fiind $\alpha 2,8$ -sialilare, de exemplu 0 până la 4%, de exemplu de la 0,1 până la 4% din sialilarea totală poate fi $\alpha 2,8$ -sialilare. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) conform invenției poate să nu aibă $\alpha 2,8$ -sialilare.

Respectiva rhCG (sau preparatul rhCG) produsă(produs) prin metodele și cu celulele conform invenției poate avea un conținut de acid sialic (cantitate de sialilare per moleculă hCG) de (pe baza masei de proteine, mai degrabă decât a masei de proteine plus carbohidrați) de 6% sau mai mult (de exemplu între 6% și 15%, de exemplu între 7% și 13%, de exemplu între 8% și 12%, de exemplu între 11% și 15%, de exemplu între 12% și 14%) în masă.

Respectiva rhCG (sau preparatul rhCG) poate fi produsă sau exprimată într-o linie celulară umană, de exemplu o linie celulară PER.C6®, o linie celulară HT1080 etc.. Respectiva rhCG (sau preparat rhCG) poate fi produsă sau exprimată într-o linie celulară derivată de la om sau o linie celulară umană modificată, de exemplu o linie celulară derivată PER.C6® sau linie celulară PER.C6® modificată, o linie celulară HT1080 modificată sau linie celulară derivată HT1080 etc.. Intr-un exemplu preferat, rhCG este produsă sau exprimată într-o linie celulară PER.C6®, o linie

celulară derivată PER.C6® sau o linie celulară PER.C6® modificată. Respectiva rhCG care este produsă sau exprimată într-o linie celulară umană (de exemplu, o linie celulară PER.C6®, o linie celulară HT1080, o linie celulară GT-5s) va include unii acizi sialici α 2,6-legați (α 2,6 sialilare) furnizați prin activitatea sialil transferazei endogene [a liniei celulare] și va include unii acizi sialici α 2,3-legați (α 2,3 sialilare) furnizați prin activitatea sialil transferazei endogene [a liniei celulare]. Linia celulară poate fi modificată folosind α 2,3-sialiltransferaza. În mod alternativ sau suplimentar, linia celulară poate fi modificată utilizând α 2,6-sialiltransferază. Acest lucru poate simplifica (și face mai eficientă) metoda de producere, deoarece manipularea și controlul, de exemplu, a mediului de creștere celulară pentru a menține sialilarea poate fi mai puțin critică(critic) decât în cazul proceselor cunoscute. Metoda poate fi, de asemenea, mai eficientă, deoarece există puțină rhCG bazică produsă în comparație cu producerea produselor rhCG cunoscute; se produce rhCG mai acidă și separarea/îndepărtarea hCG bazice este mai puțin problematică.

Respectiva rhCG poate fi produsă folosind o α 2,3-sialiltransferază, de exemplu produsă utilizând o linie celulară umană modificată care utilizează o α 2,3-sialiltransferază. Respectiva rhCG poate include acizi sialici α 2,6-legați (α 2,6 sialilare) furnizați prin activitatea sialil transferazei endogene. Respectiva rhCG poate fi produsă utilizând o α 2,3-sialiltransferază și/sau o α 2,6-sialiltransferază, de exemplu produsă utilizând o linie celulară umană modificată utilizând o α 2,3-sialiltransferază și/sau o α 2,6-sialiltransferază.

Structura rhCG conține fragmente de glican. Ramificarea poate avea loc cu rezultatul că glicanul poate avea 1, 2, 3, 4 sau mai multe resturi terminale de zahăr sau "antene", așa după cum este bine cunoscut în domeniu. Respectiva rhCG conform aspectelor invenției poate avea glicani cu structuri glican mono-antenare și/sau bi-antenare și/sau tri-antenare și/sau tetra-antenare. Respectiva rhCG poate include structuri de glican mono-antenare și/sau bi-antenare și/sau tri-antenare și/sau tetra-antenare, de exemplu cu cantități relative după cum urmează: de la 0,1 până la 3% mono-antenare; de la 65% până la 85% bi-antenare; de la 15 până la 25% tri-antenare și de la 0,5 până la 1,5% tetra-antenare (de exemplu, așa cum se arată în analiza WAX a glicanilor încărcăți).

Este furnizată o compoziție farmaceutică cuprinzând o hCG recombinantă (rhCG) care are α 2,3-sialilare și α 2,6-sialilare, în care hCG recombinantă este produsă prin metodele și/sau cu celele dezvăluite în prezenta. Respectiva rhCG poate avea un conținut de acid sialic [exprimat în termeni privind raportul între numărul de moli de acid sialic și numărul de moli de proteine] de la 12 mol/mol până la 15,5 mol/mol, de exemplu de la 12 mol/mol până la 14,9 mol/mol (de exemplu așa cum a fost prezentat mai înainte). Respectiva rhCG poate avea un conținut de acid sialic de la 12,5 mol/mol până la 14,5 mol/mol, de exemplu un conținut de acid sialic de la 12,8 mol/mol până la 13,2 mol/mol. De preferință, rhCG are un conținut de acid sialic de 13 mol/mol.

Compoziția farmaceutică poate cuprinde, în plus, FSH și/sau LH.

FSH poate fi obținut prin oricare mijloace cunoscute în domeniu. FSH așa cum este utilizat în prezenta include FSH derivat de la om și recombinant. FSH derivat de la om poate fi purificat din oricare sursă adecvată (de exemplu, urină) prin oricare metodă cunoscută în domeniu. FSH poate fi FSH recombinant - de exemplu exprimat într-o linie celulară umană. Metodele de exprimare și de purificare a FSH recombinant sunt bine cunoscute în domeniu.

LH poate fi obținut prin oricare mijloace cunoscute în domeniu. LH, așa cum este utilizat în prezenta, include LH derivat de la om și recombinant. LH derivat de la om poate fi purificat din oricare sursă adecvată (de exemplu, urină) prin orice metodă cunoscută în domeniu. Metodele de exprimare și purificare a LH recombinant sunt cunoscute în domeniu.

Compoziția farmaceutică poate fi pentru sau pentru utilizare în tratamentul infertilității, de exemplu pentru utilizare în tehnologiile de reproducere asistată (ART), inducerea ovulației sau inseminarea intrauterină (IUI). Compoziția farmaceutică poate fi pentru sau pentru utilizarea în declanșarea maturării finale/ovulației și a luteinizării, stimularea dezvoltării foliculare la femeile cu deficit sever de LH și FSH și/sau în suportul luteal (rhCG/rLH). Compoziția farmaceutică poate fi pentru sau pentru utilizare în inducerea dezvoltării monofoliculare la femeile anovulatorii WHO de tip II (de exemplu, rhCG cu rLH), pentru îmbunătățirea răspunsului multifolicular cu amorsarea LH la pacienții supuși COH (de exemplu, rhCG cu rLH) și pentru suplimentarea la COH pentru a îmbunătăți ratele de implantare/sarcină (de exemplu, rhCG cu rLH) și/sau creșterea ratelor de sarcină în tehnologiile de reproducere asistată. Compoziția farmaceutică poate fi pentru sau pentru utilizare în prevenirea avorturilor (spontane) și/sau în prevenirea prematurității. Compoziția farmaceutică poate fi pentru sau pentru utilizare în tratamentul endometriozei.

Compoziția farmaceutică poate fi utilizată, de exemplu, în afecțiuni medicale unde sunt utilizate preparate hCG cunoscute.

Compozițiile farmaceutice pot fi formulate în compoziții bine cunoscute pentru oricare cale de administrare a medicamentului, de exemplu pe cale orală, rectală, parenterală, transdermică (de exemplu, tehnologia plastei), intravenoasă, intramusculară, subcutanată, intracisternală, intravaginală, intraperitoneală, locală (pulberi, unguente sau picături) sau ca spray bucal sau nazal.

5 O compoziție caracteristică cuprinde un purtător acceptabil farmaceutic, cum ar fi soluție apoasă, excipienți netoxici, incluzând săruri și conservanți, substanțe de tamponare și altele asemenea, așa cum este descris în Remington's Pharmaceutical Sciences ediția a cincisprezecea (Matt Publishing Company, 1975), la paginile 1405 până la 1412 și 1461 până la 87 și forumul național ediția a paisprezecea XIV (American Pharmaceutical Association, 1975), printre altele. Exemplele de

10 purtători, diluanți, solvenți sau vehicule farmaceutice(e), apoși(apoase) și neapoși(neapoase), adecvați(te) includ apă, etanol, polioli (cum ar fi glicerină, propilen glicol, polietilen glicol și altele(alții) asemenea), carboximetilceluloză și amestecuri adecvate ale acestora, uleiuri vegetale (cum ar fi ulei de măsline) și esteri organici injectabili, cum ar fi oleatul de etil. Compozițiile pot conține, de asemenea, aditivi, cum ar fi, dar fără limitare la, conservanți, agenți de umectare,

15 agenți de emulsionare și agenți de dispersie. Agenții antibacterieni și antifungici pot fi incluși pentru a preveni creșterea microbilor și includ, de exemplu, m-crezol, alcool benzoic, paraben, clorbutanol, fenol, acid sorbic și alții asemenea. Mai mult, poate fi de dorit să se fie incluși agenți izotonici cum ar fi zaharuri, clorură de sodiu și alții asemenea.

În unele cazuri, pentru a realiza o acțiune prelungită, este de dorit să fie încetinită

20 absorbția hCG (și a altor ingrediente active, dacă există) din injecție subcutanată sau intramusculară. Acest lucru poate fi realizat prin utilizarea unei suspensii lichide de material cristalin sau amorf cu solubilitate redusă în apă. Viteza de absorbție a hCG depinde apoi de viteza acesteia de dizolvare care, la randul ei, poate depinde de dimensiunea cristallului și forma cristalină. În mod alternativ, absorbția întârziată a unei forme combinate de hCG administrată pe

25 cale parenterală este realizată prin dizolvarea sau suspendarea combinației de hCG într-un vehicul uleios. Formele de depozit injectabile pot fi realizate prin formarea matricilor de microincapsulare ale hCG (și a altor agenți, dacă sunt prezenți) în polimeri biodegradabili, cum ar fi polilactidă-policolidă. Viteza de eliberare a hCG poate fi controlată în funcție de raportul dintre hCG și polimer și de natura polimerului special utilizat. Exemplele de alți polimeri biodegradabili includ polivinilpirolidonă, poli (ortoesteri), poli(anhidride) etc.. Formulările injectabile depozit sunt, de

30 asemenea, preparate prin încapsularea hCG în lipozomi sau microemulsii care sunt compatibili(e) cu țesuturile corpului. Formulările injectabile pot fi sterilizate, de exemplu, prin filtrare printr-un filtru de reținere a bacteriilor sau prin incorporarea agenților de sterilizare sub formă de compoziții solide sterile care pot fi dizolvate sau dispersate în apă sterilă sau alt mediu steril injectabil chiar

35 înainte de utilizare. Formulările injectabile pot fi furnizate în oricare recipient adecvat, de exemplu flacon, seringă preumplută, cartușe de injectare și altele asemenea.

Formulările (de exemplu, formularea injectabilă) pot fi furnizate ca un produs care au compoziții farmaceutice care conțin hCG (opțional cu FSH, LH etc.). Dacă există mai mult decât un ingredient activ (adică hCG și de exemplu FSH sau LH) acestea pot fi adecvate pentru

40 administrare, în mod separat sau împreună. Dacă se administrează în mod separat, administrarea poate fi secvențială. Produsul poate fi furnizat în oricare ambalaj adecvat. De exemplu, un produs poate conține un număr de seringi sau flacoane preumplute care conțin fie hCG, FSH, fie o combinație atât de FSH, cât și de hCG. Seringile sau flacoanele pot fi ambalate într-un ambalaj cu blistere sau în alte mijloace pentru a menține sterilitatea. Un produs poate conține, în mod opțional

45 instrucțiuni pentru utilizarea formulărilor hCG și FSH.

Valoarea pH-ului și concentrația exactă a diferitelor componente ale compoziției farmaceutice sunt ajustate în conformitate cu practica de rutină din acest domeniu. A se vedea GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, ediția a-7-a. Într-o variantă de realizare preferată, compozițiile conform invenției sunt furnizate ca

50 compoziții pentru administrare pe cale parenterală. Metodele generale pentru prepararea formulărilor parenterale sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise în REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, *supra*, la paginile 780-820. Compozițiile parenterale pot fi furnizate ca formulare lichidă sau ca un solid care va fi amestecat cu un mediu steril injectabil chiar înainte de administrare. Într-o variantă de realizare, compozițiile parenterale

55 sunt furnizate ca forme unitare de dozare pentru ușurarea administrării și uniformitatea dozării.

Descrierea detaliată a invenției

Prezenta invenție va fi acum descrisă mai în detaliu cu referire la următoarele exemple și la desenele atașate în care:

60

Figura 1 prezintă secvențe de acid nucleic și aminoacizi derivați ai secvenței alfa hCG optimizată;

Figura 2 prezintă secvențe de acid nucleic și de aminoacid derivați ai secvenței beta hCG;

Figura 3 prezintă secvențele de acid nucleic și de aminoacizi derivați ai ST3GAL4

Figura 4 prezintă o hartă plasmidică a vectorului de exprimare phCGalfa/beta;

Figura 5 prezintă vectorul de exprimare $\alpha 2,3$ -sialiltransferază (ST3GAL4);

- 5 Figura 6 prezintă detectarea izoformelor rhCG cu IEF colorate cu Coomassie Blue în compoziții conform invenției (benzile 4, 5, 6 și 7, 15 ?g per bandă); compoziția derivată din CHO din stadiul tehnicii, Ovitrelle (banda 2, 15 ?g); și un produs din urină umană obținut de la femeile însărcinate Novarel (banda 3, 15?g); și

- 10 Figura 7 compară concentrația de hCG ("alfa-beta hCG") și lanțul beta liber ("beta hCG") produse folosind celulele conform invenției, incluzând secvența nucleică "Optimizată" a subunității alfa, comparativ cu concentrația de hCG ("alfa-beta hCG") și lanțul beta liber ("beta hCG") produse în celule exemple comparative, incluzând subunitatea alfa WT (de tip sălbatic);

Exemplele 1 până la 7

15

Prezentare generală a procesului de dezvoltare a liniei celulare

O singură plasmidă care poartă lanțurile alfa și beta hCG, fiecare condus de la un promotor CMVie separat, a fost transfectată în celule PER.C6® prin electroporare.

- 20 Această plasmidă a purtat o casetă de genă de rezistență la neomicină (Fig 4) permițând selectarea transfectanților utilizând G418 (Geneticin). Pool-urile (reunirile) de transfectanți au fost extinse și apoi supuse clonării cu diluare limitată în plăci cu 96 de godeuri sub selecția G418. Liniile clonale au fost extinse și coloniile cu exprimare ridicată au fost identificate pe baza titrului hCG în supernatantul culturii celulare.

- 25 Au fost selectate cinci clone conducătoare, pe baza unei productivități ridicate și fiecare a fost apoi transfectată cu o a doua plasmidă care exprimă gena $\alpha 2,3$ -sialiltransferaza ST3GAL4 împreună cu markerul de selecție pentru higromicină (Fig 5). Fiecare dintre cele cinci pool-uri de transfecție a fost extins și supernatantele culturii celulare au fost evaluate pentru concentrația hCG și parametrii farmacocinetici (PK) *in vivo*.

- 30 Pool-urile promițătoare au fost apoi supuse unui alt ciclu de clonare cu diluare limitată. Clonele rezultate au fost extinse și supernatantele culturii celulare au fost evaluate pentru concentrația de hCG și galactoză expusă pe proteina hCG (prin lectină ELISA). Cele cu un nivel scăzut de galactoză expusă au fost supuse unor teste suplimentare, incluzând PK *in vivo*. Clonele care au produs hCG cu profiluri PK optime, au avut galactoză expusă scăzută și au exprimat proteina la niveluri ridicate au fost evaluate și selectate pentru caracteristicile de productivitate și
- 35 de creștere.

Exemplul 1: Selecția secvențelor și a vectorilor plasmidei

- Regiunea de codificare a genei pentru polipeptida alfa hCG este prezentată în Fig 1. Regiunea de codificare a genei pentru secvența de polipeptidă alfa hCG este menționată, în
- 40 prezenta, ca SECV ID NR: 1.

Regiunea de codificare a genei pentru polipeptida beta hCG a fost utilizată în conformitate cu Fiddes și Goodman (1980). Secvența este înregistrată ca NP_000728 și este în concordanță cu secvențele de proteine din CGbeta3, CGbeta5 și CGbeta7. Secvența este menționată, în prezenta, ca SECV ID NR:2.

- 45 Regiunea de codificare a genei pentru beta-galactozidă alfa-2,3-sialiltransferaza 4 ($\alpha 2,3$ -sialiltransferază, ST3GAL4) a fost utilizată în conformitate cu Kitagawa și Paulson (1994). Secvența este înregistrată ca L23767 și menționată, în prezenta, ca SECV ID NR: 3.

Au fost utilizate două plasmide: prima, phCG, co-exprimă lanțurile alfa și beta hCG; și a doua, exprimă gena sialiltransferază ST3GAL4.

50

Exemplul 2a: Construcția vectorului de exprimare hCG

Respectiva phCG este un lanț alfa sintetic a hCG, optimizată pentru utilizarea codonilor în celulele de mamifere, incluzând peptida semnal alfa hCG nativă. Aceasta poate fi proiectată prin metode bine cunoscute în domeniu.

- 55 Secvența de codificare a polipeptidei alfa hCG (SECV ID NR: 1) și a polipeptidei beta hCG (NP_000728, SECV ID NR: 2) au fost amplificate prin PCR utilizând metode bine cunoscute în domeniu (a se vedea, de exemplu, cererea internațională de brevet publicată ca WO2011/042688). ADN-ul alfa phCG a fost digerat cu *Bam*HI și *Nhe*I și inserat în site-urile *Bam*HI și *Nhe*I pe un vector de exprimare de mamifer condus CMV (vectorul Crucell pcADN3002Neo). Acesta a plasat gena în orientarea corectă pentru exprimare condusă de un promotor CMVie cu un semnal BGH poliA în aval. Gena beta hCG nativă, incluzând peptida
- 60

semnal nativă, a fost digerată cu enzimele de restricție *Ascl* și *HpaI* și inserată în site-urile *Ascl* și *HpaI*, astfel încât exprimarea să fie condusă de un al doilea promotor CMVie cu un semnal BGH poli A, suplimentar, în aval. Structura schelet a vectorului a inclus, de asemenea, un marker a rezistenței la neomicină, precum și elemente necesare pentru selecție și replicare în celulele procariote. Vectorul a fost amplificat și secvențiat folosind metode generale care sunt cunoscute în domeniu. Secvențele lanțurilor beta native (de tip sălbatic) și alfa hCG sunt prezentate în figurile 1 și, respectiv, 2.

Toate coloniile selectate pentru secvențiere au conținut secvențele corecte conform SECV ID NR: 1 și SECV ID NR: 2. Plasmida pHCG A + B a fost selectată pentru transfecție (Figura 4).

Exemplul 2b: Construcția vectorului de exprimare ST3

Gena ST3GAL4 este exprimată în pST3. Secvența de codificare a beta-galactozidei alfa-2,3-sialiltransferazei 4 (ST3, L23767, SECV ID NR: 3, Fig 3) a fost amplificată prin PCR utilizând combinația de primeri 2,3STfw și 2,3STrev.

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'
2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

ADN-ul ST3 amplificat rezultat a fost digerat cu enzimele de restricție *Bam*HI și *A*/III și inserate în site-urile *Bam*HI și *A*/III pe vectorul de exprimare de mamifer condus CMV, care poartă un marker de rezistență la higromicină (vectorul pcADN3002Neo) astfel încât să fie localizat în aval de promotorul CMVie și în amonte de secvența BGH polyA. Structura schelet a vectorului a inclus, de asemenea, un element producător a rezistenței la higromicină, precum și elemente necesare pentru selecție și replicare în celulele procariote. Vectorul a fost amplificat așa cum a fost descris anterior și secvențiat. Clona pST3 # 1 (Figura 5) a conținut secvența corectă conform SECV ID NR: 3 și a fost selectată pentru transfecție.

Exemplul 3 - Transfecția plasmidei

Plasmida pHCG (Fig. 4), care are un singur site PvuI localizat în gena beta-lactamazei procariote, a fost linearizată cu PvuI (New England Biolabs Nr. Cat. R0150). ADN-ul plasmidic liniarizat a fost transfectat în celule PER.C6® după cum urmează.

Culturile celulare au fost menținute în mediu PERMAB complet (CD4PERMAB (Hyclone Nr. Cat. SH30871.01) suplimentat cu L-glutamină la concentrația finală de 3mM (Invitrogen Nr. Cat. 25030-123) și Pluronic F68 la o concentrație finală de 1,0 g/l (Invitrogen Nr. Cat. 24040-032) în baloane Erlenmeyer de 250 ml. Celulele au fost menținute într-un incubator cu agitare prin vibrare (Kuhner Climo-shaker ISF1 - X) setat la 100rpm, 5% CO₂ și temperatura de 37°C, timp de cel puțin 14 zile înainte de transfecție. Cu 48 de ore înainte de transfecție, celulele au fost transferate în mediu proaspăt la o densitate de 0,5x10⁶ celule/ml.

În ziua transfecției, celulele au fost numărate într-un Beckman Coulter ViCell XR pentru a determina densitatea celulară și pentru asigurare că viabilitatea a fost >90%. Celulele au fost recoltate prin centrifugare și resuspendate în mediu PERMAB proaspăt înainte de a fi amestecate cu ADN pHCG liniarizat. Mixul celule/ADN a fost electro-șocat în camera unui electroporator setat la 250V timp de 5 msec, înainte de a fi transferat rapid la 10 ml de mediu PERMAB preîncălzit. Acest proces a fost repetat în total de 6 ori și toate cele 6 transfecții au fost reunite într-un singur balon de cultură de țesut T-175cm². Balonul a fost plasat într-un incubator static setat la temperatura de 37°C, 5% CO₂. După 48 de ore, celulele au fost resuspendate în volumul adecvat de PERMAB selectiv (mediu PERMAB complet + G418 (125?g/ml)) pentru a da o densitate de celule viabile de 0,5x10⁶ celule/ml.

Cultura reunită a fost trasvazată de două ori pe săptămână, menținând celulele la o densitate de 0,3x10⁶ celule/ml, în mediu selectiv până când viabilitatea celulară a crescut la >50%. În acest moment, celulele au fost transferate în culturi sub agitare prin vibrare în baloane Erlenmeyer de 250 ml. După câteva săptămâni în cultura sub agitare prin vibrare, supernatantul reunit a fost eșantionat și testat pentru concentrația de hCG. Odată ce a fost stabilit că pool-ul a fost pozitiv pentru exprimarea hCG, celulele au fost pregătite pentru clonare cu diluare limitată.

O suspensie de celule la o densitate de 0,3 celule viabile/ml a fost preparată în mediu PERMAB suplimentat cu G-418 la 125 ?g/ml. Suspensia de celule a fost distribuită în plăci de cultură tisulară cu 96 de godeuri cu fund plat la 200μl/godeu și incubată într-o atmosferă umidificată la temperatura de 37°C, 5% CO₂ (Binder CB150). Plăcile au fost scanate în mod regulat folosind Genetix Clone Select Imager pentru a urmări creșterea celulelor din fiecare godeu.

După două săptămâni, au fost identificate 535 de godeuri care conțineau colonii de celule în creștere, în mod activ. Supernatanții din aceste godeuri au fost eșantionați și testați pentru hCG

folosind un kit comercial (DRG diagnostics HCG ELISA Nr. Cat. EIA1469). Pe baza rezultatelor acestor teste, un total de 162 din colonii au fost transferate în plăci cu 24 de godeuri care conțin 0,5 ml/godeu de mediu PERMAB selectiv. Când celulele din godeuri erau aproape de confluență, supernatantul din fiecare dintre cele 162 de godeuri a fost eșantionat și testat pentru nivelurile de hCG. Pe baza acestor rezultate, 91 dintre cele mai bune linii celulare de exprimare au fost selectate pentru expansiune în baloane T-25. Aceste linii celulare au fost din nou crescute până aproape de confluență, moment în care supernatantele au fost eșantionate și testate pentru hCG așa cum a fost prezentat mai înainte. Pe baza acestor rezultate, cele mai bune 58 de linii celulare de exprimare au fost extinse în baloane T-75. Analiza ratei de producere specifică (SPR) a fost efectuată pe fiecare dintre aceste 58 de linii celulare prin metode cunoscute în domeniu și productivitatea specifică a fost exprimată în pg/celulă/zi.

Astfel, în acest exemplu, o plasmidă care încorporează lanțuri alfa și beta hCG a fost transfectată în celule PER.C6® și transfectanții au fost selectați folosind mediu care conține G418. Coloniile de celule, în creștere, au fost supuse screening-ului pentru concentrația hCG în supernatant și cele care exprimă cel mai înalt nivel au fost extinse în continuare. După ciclurile ulterioare de extindere și screening au fost selectate 20 de clone care au exprimat hCG pentru studii de creștere și de productivitate. Pe baza rezultatelor acestor studii au fost selectate 5 clone pentru transfecție cu o a doua plasmidă care încorporează gena ST3GAL4.

Exemplul 4 - Transfecție cu plasmida ST3GAL4 pST3

Clonele stabile au fost generate așa cum a fost descris anterior în Exemplul 3.

Cele mai bune cinci clone produse prin metoda descrisă în Exemplul 3 au fost selectate pentru transfecție cu plasmida ST3GAL4 pST3 (a se vedea Exemplul 2, Figura 3 și 5). Transfecția a fost efectuată prin electroporare utilizând aceeași metodă ca cea descrisă în Exemplul 3, cu excepția faptului că transformanții au fost selectați în mediu PERMAB complet, suplimentat cu higromicină la 0,5 μg/ml în loc de G418. Folosind această metodă, s-au obținut cinci pool-uri care au exprimat hCG.

Probele de supernatante din pool-urile de transfecție au fost analizate într-un model farmacocinetic de șobolan și, pe baza acestor date împreună cu datele din testul de legare RCA-lectină (care măsoară galactoza expusă la lanțurile hCG), a fost selectat un singur pool pentru clonarea cu diluare limitată, ulterioară prin metode cunoscute în domeniu.

Această clonare prin diluare a produs >600 de clone, fiecare dintre acestea fiind, de asemenea, supusă screening-ului pentru exprimarea hCG și gradul de galactoză expusă, așa cum este măsurat prin legarea RCA-lectină. Acele clone cu cele mai scăzute niveluri de galactoză expusă au fost extinse în continuare și probele au fost supuse la PK *in vivo* și coroborării datelor de legare a lectinei. Cinci clone derivate din singurul pool au fost evaluate în continuare pentru caracteristicile de creștere și de productivitate.

Fiecare dintre aceste clone a fost extinsă și s-a realizat o bancă de celule stoc de inseminare urmand proceduri standard de crioconservare. Stocurile de la banca de celule stoc de inseminare au fost dezghețate și s-au dovedit a fi viabile.

Exemplul 5 - Analiza prin focalizare izoelectrică

Electroforeza este definită ca transportul moleculelor încărcate printr-un solvent printr-un camp electric. Mobilitatea unei molecule biologice printr-un camp electric va depinde de intensitatea câmpului, sarcina netă a moleculei, dimensiunea și forma moleculei, puterea ionică și proprietățile mediului prin care moleculele migrează.

Focalizarea izoelectrică (IEF) este o tehnică electroforetică pentru separarea proteinelor pe baza pI a acestora. Parametrul pI este pH-ul la care o proteină nu are sarcină netă și nu va migra într-un camp electric. Conținutul de acid sialic al izoformelor hCG modifică, subtil, punctul pI pentru fiecare izoformă, care poate fi exploatată folosind această tehnică pentru a vizualiza izoformele Per.C6 hCG din fiecare clonă.

Punctele izoelectrice ale izoformelor hCG produse de Per.C6 au fost analizate folosind focalizarea izoelectrică. Pe.C6 hCG a fost produsă așa cum este descris în Exemplul 6.

Probele Pe.C6 hCG au fost separate pe geluri Novex® IEF conținând 5% poli(acrilamidă) în condiții native pe un gradient de pH 3,0 -7,0 într-o soluție de amfoliți pH 3,0 - 7,0. Proteinele au fost vizualizate folosind colorarea Coomassie Blue, urmand metode bine cunoscute în domeniu.

Figura 6 prezintă detectarea izoformelor rhCG prin IEF colorate cu Coomassie Blue în compoziții obținute conform invenției produse pornind de la liniile celulare clonate realizate prin metoda prezentată în exemplul 6 (benzile 4, 5, 6 și 7, 15 ?g per

bandă); compoziția derivată din CHO conform stadiului tehnicii, Ovitrelle (banda 2, 15 ?g); și un produs din urina umană obținut de la femeile însărcinate Novarel (banda 3, 15?g). Benzile

reprezintă izoforme ale hCG care conțin număre diferite de molecule de acid sialic. Figura 6 indică faptul că hCG recombinantă derivată din linia celulară umană, proiectată cu $\alpha 2,3$ -sialiltransferază (compoziții conform invenției) este mai acidă decât Ovitrelle și hCG din urină de la femeile însărcinate.

Figura 7 compară concentrația hCG ("alfa-beta hCG") și a lanțului beta liber ("beta hCG") produse folosind celulele conform invenției (adică folosind linii celulare realizate prin metoda prezentată în exemplele 1-4) care includ subunitatea alfa "optimizată", în comparație cu concentrația de hCG ("alfa-beta hCG") și lanțul beta liber ("beta hCG") produsă în celule din exemplul comparativ, care include subunitatea alfa WT (de tip sălbatic). Figura 7 prezintă faptul că celulele conform invenției exprimă cantități mari de hCG și un exces scăzut de subunitate beta liberă. Cu alte cuvinte, randamentul și puritatea hCG recombinantă produsă cu celulele și prin metodele conform invenției sunt îmbunătățite în mod semnificativ.

Tabelul A indică procentul de subunități β -hCG libere în probe semi-purificate din diferite loturi de hCG produse folosind celulele conform invenției (adică folosind linii celulare realizate prin metoda prezentată în exemplele 1 până la 4) care includ subunitatea alfa "optimizată" ("Opt. Alfa hCG"), comparativ cu procentul de subunități β -hCG libere în probele semi-purificate de hCG produse în celulele din exemplul comparativ, incluzând subunitatea alfa WT (de tip sălbatic) ("WT alfa hCG"), așa cum este determinat prin cromatografie HPLC cu fenil-5PW hidrofob.

Tabelul A ilustrează faptul că celulele conform invenției exprimă cantități mari de hCG și un exces destul de redus de subunitate beta liberă (5,7 - 10,6%) comparativ cu celulele care includ subunitatea alfa WT (64 - 66%). Cu alte cuvinte, randamentul și puritatea hCG recombinantă produsă cu celulele și prin metodele conform invenției sunt îmbunătățite în mod semnificativ.

Tabelul A

Clonă	% β -hCG liberă (PHE-5PW)
alfa hCG WT (1G2)	64,1
alfa hCG WT (1G2)	66,0
alfa hCG Opt. (13,8)	5,7
alfa hCG Opt. (29)	7,5
alfa hCG Opt. (29)	6,6
alfa hCG Opt. (29)	10,6

Exemplul 6 - Prezentare generală a producerii și purificării

A fost dezvoltată o procedură pentru a produce hCG recombinantă în celule PER.C6 care au fost cultivate în suspensie în mediu fără ser. Procedura este descrisă în cele ce urmează și a fost aplicată mai multor linii celulare PER.C6 care produc hCG.

HCG recombinantă pornind de la clonă transfectată cu $\alpha 2,3$ -sialiltransferază a fost preparată utilizând metodele din Exemplele 1 până la 4 descrise mai înainte.

Celulele au fost crescute în baloane cu agitator prin vibrație în mediu 6GRO (SAFC) până la obținerea unei densități celulare de 1×10^6 până la 3×10^6 celule/ml. Celulele au fost transferate într-un bioreactor cu rezervor, sub agitare, de sticlă, de 5L, cu o densitate de aproximativ 1×10^6 celule/ml. Bioreactorul a funcționat în modul perfuzie folosind un suport Proper 1 (Lonza).

În continuare, purificarea rhCG produs a fost efectuată utilizând diverse etape de ultrafiltrare, cromatografie de captare cu schimb de anioni și de cationi, cromatografie hidrofobă și cromatografie cu pseudo-afinitate, prin metode bine cunoscute în domeniu.

În timpul tuturor procedurilor cromatografice, prezența hCG recombinantă imunoreactivă a fost confirmată prin ELISA (DRG EIA 1469) și IEF (Exemplul 5).

40

Exemplul 7 - Conținutul de acid sialic

Acidul sialic este un carbohidrat legat de proteine considerat a fi o monozaharidă și apare în combinație cu alte monozaharide cum ar fi galactoză, manoză, glucozamină, galactozamină și fucoză. Acidul sialic total per rhCG purificată conform invenției a fost măsurat folosind o metodă bazată pe metoda lui Stanton și colaboratorii (J. Biochem. Biophys. Methods. 30 (1995), 37 - 48).

A fost măsurat conținutul total de acid sialic al probelor de hCG recombinantă Per.C6, modificată cu $\alpha 2,3$ -sialiltransferază (produsă prin metodele din Exemplul 4 și 6) și rezultatele sunt cuprinse în Tabelul 1 prezentat în cele ce urmează [exprimate în termeni privind raportul dintre moli de acid sialic și moli de proteine].

50

Exemplul 8 - Bioanaliza hCG conform USP

A fost efectuată o bioanaliză a hCG, pentru a determina activitatea specifică a hCG, pentru fiecare dintre probele cuprinse în Tabelul 1 prezentat în cele ce urmează. Activitatea a fost

- măsurată conform USP (USP Monographs: Chorionic Gonadotropin, USPC Official 8/1/09-11/30/09), folosind Ovitrelle ca un standard. Ovitrelle are o activitate biologică de 26.000 IU/mg (Curr Med Res Opin. 2005 Dec; 21 (12): 1969 - 76). Limita de acceptare a fost >21.000 IU hCG/mg. Activitatea biologică pentru probele de hCG derivată din linia celulară umană din hCG-uri recombinante, proiectate cu α 2,3-sialiltransferază este inclusă în Tabelul 1, prezentat în cele ce urmează.

Tabelul 1

Probă	1	2	3	4	5	6
Conținut de acid sialic (SA) (μ mol SA/ μ molhCG)	13	13	13	13	13	15
Eficacitate UI/mg	25363	25009	24904	24623	25645	26623
% Eficacitate (Ovitrelle 26000 UI/mg)	97,5	96,2	95,8	94,7	98,6	102,4
Probă	7	8	9	10	11	
Conținut de acid sialic (SA) (μ mol SA/ μ molhCG)	14	14	13	13	13	
Eficacitate UI/mg	27227	26142	26539	26181	24230	
% Eficacitate (Ovitrelle 26000 UI/mg)	104,7	100,5	102	101	93,2	

- 10 După cum se vede din cele prezentate anterior eficacitatea este similară și poate fi mai mare decât cea a Ovitrelle (a se vedea, de exemplu, proba 7).

Referințe

- 15 Andersen CY, Westergaard LG, and van Wely M. (2004). FSH isoform composition of commercial gonadotrophin preparations: a neglected aspect? *Reprod Biomed Online*. 9(2), 231-236.
- Bassett RM, and Drievergen R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reprod Biomed Online*. 10(2), 169-177.
- 20 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
- 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.
- 25 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.
- 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.
- 30 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1), 265-75.
- 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.
- 35 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.
- 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.
- 40 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.
- 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.
- 45 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.
- 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.

5 Alfa hCG optimizată

Secvența de nucleotide a lanțului alfa din hCG optimizată (SECV ID NR: 1)

```

1  ATGGACTACT  ACCGGAAGTA  CGCCGCCATC  TTCTTGGTGA  CCCTGAGCGT
GTTCTCTGCAC
61  GTGCTGCACA  GCGCCCCTGA  CGTGCAGGAC  TGCCCCGAGT  GCACCCTGCA
GGAAAACCCC
121  TTCTTCAGCC  AGCCTGGCGC  CCCTATCCTG  CAGTGCATGG  GCTGCTGCTT
CAGCAGAGCC
181  TACCCACACC  CCCTGCGGAG  CAAGAAAACC  ATGCTGGTGC  AGAAAAACGT
GACCAGCGAG
241  AGCACCTGCT  GCGTGGCCAA  GAGCTACAAC  CGGGTGACCG  TGATGGGCGG
CTTCAAGGTG
301  GAGAACCACA  CCGCTGCCA  CTGCAGCACC  TGCTACTACC  ACAAGTCCT

```

10 Secvența de proteine a alfa hCG optimizată

```

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

```

Poliptidă beta gonadotrofină corionică umană

15 Număr de acces NP_000728

Secvența de nucleotide a lanțului beta din hCG (SECV ID NR: 2)

Secvența de nucleotide

```

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

```

20

Secvența de proteine a lanțului beta din hCG

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

Beta-galactozidă alfa-2,3-sialiltransferază 4

Număr de acces L23767

5 Secvență de nucleotide a ST3GAL4 (SECV ID NR: 3)

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

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

Lanțul alfa din hCG optimizată

Secvența de nucleotide a lanțului alfa din hCG optimizată (SECV ID NR: 4)

5

1 GCCCCTGACG TGCAGGACTG CCCCAGAGTGC ACCCTGCAGG AAAACCCCTT
 CTTTCAGCCAG
 61 CCTGGCGCCC CTATCCTGCA GTGCATGGGC TGCTGCTTCA GCAGAGCCTA
 CCCCACCCCC
 121 CTGCGGAGCA AGAAAACCAT GCTGGTGCAG AAAAACGTGA CCAGCGAGAG
 CACCTGCTGC
 181 GTGGCCAAGA GCTACAACCG GGTGACCGTG ATGGGCGGCT TCAAGGTGGA
 GAACCAACAC
 241 GCCTGCCACT GCAGCACCTG CTACTACCAC AAGTCCT

Secvența de proteine a lanțului alfa din hCG optimizată

1 APDVQDCPEC TLQENFFFSQ PGAPILQCMG CCFSTRAYPTP LRSKKTMLVQ
 KNVTSSESTCC

61 VAKSYNRVTV MGGFKVENHT ACHCSTCYH KS

10

polipeptida alfa hCG

Număr de acces AH007338

Secvența de nucleotide din alfa hCG (SECV ID NR: 5)

1 ATGGATTACT ACAGAAAATA TGCAGCTATC TTTCTGGTCA CATGTGCGGT
 GTTCTGTCAT
 61 GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGCAGGAT TGCCCAAGAT GCACGCTACA
 GGAAAACCCA
 121 TTCTTCTCCC AGCCGGGTGC CCAATACTT CAGTGCATGG GCTGCTGCTT
 CTCTAGAGCA
 181 TATCCCACTC CACTAAGGTC CAAGAAGACG ATGTGGGTCC AAAAGAACGT
 CACCTCAGAG
 241 TCCACTTGCT GTGTAGCTAA ATCATATAAC AGGGTCACAG TAATGGGGGG
 TTTCAAAGTG

15

301 GAGAACCACA CGGCGTGCCA CTGCAGTACT TGTTATTATC ACAAATCTTA A

Secvența de proteine din alfa hCG

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

LISTINGUL SECVENȚELOR

5	<110> Ferring Pharmaceutical A/S	
	<120> Metodă de producere a gonadotrofinei	
	<130> P/68899.WO01	
	<150> 15164965.4	
10	<151> 2015-04-24	
	<160> 12	
	<170> PatentIn versiunea 3.5	
	<210> 1	
	<211> 349	
15	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
	atggactact accggaagta cgccgccatc ttcctggtga ccctgagcgt gttcctgcac	60
	gtgctgcaca gcgcccctga cgtgcaggac tgccccgagt gcaccctgca ggaaaacccc	120
	ttcttcagcc agcctggcgc ccctatcctg cagtgcattg gctgctgctt cagcagagcc	180
	tacccacccc ccctgcggag caagaaaacc atgctggtgc agaaaaacgt gaccagcgag	240
	agcacctgct gcgtggccaa gagctacaac cgggtgaccg tgatgggcgg cttcaagggtg	300
	gagaaccaca ccgctgcca ctgcagcacc tgctactacc acaagtcct	349
	<210> 2	
20	<211> 498	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
	atggagatgt tccaggggct gctgctgttg ctgctgctga gcatgggcgg gacatgggca	60
	tccaaggagc cgcttcggcc acggtgcgc cccatcaatg ccaccctggc tgtggagaag	120
	gagggtgcc ccgtgtgcat caccgtcaac accaccatct gtgccggcta ctgcccacc	180
	atgaccgcg tgctgcaggg ggtcctgccg gccctgcctc aggtggtgtg caactaccgc	240
	gatgtgcgct tcgagtcctat ccggctccct ggctgccgc gcggcgtgaa ccccggtgctc	300
	tcctacgccg tggtctctcag ctgtcaatgt gactctgcc gccgcagcac cactgactgc	360
	gggggtccca aggaccacc cttgacctgt gatgacccc gcttcagga ctctcttcc	420
	tcaaaggccc ctccccccag ccttccaagt ccatccgac tccggggcc ctcggacacc	480
	ccgatcctcc cacaataa	498
25	<210> 3	
	<211> 999	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	

	atgtgtcctg caggctggaa gctcctggcc atgttggctc tggctcctggt cgtcatggtg	60
	tggatattcca tctcccggga agacaggtag atcgagcttt tttattttcc catcccagag	120
	aagaaggagc cgtgcctcca gggtagaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggcaac	180
	tactcccggg atcagcccat cttcctgcgg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca	240
	tctgcttacg agctgcccta tgggaccaag gggagttagg atctgctcct ccgggtgcta	300
	gccatcacca gctcctccat ccccaagaac atccagagcc tcagggtgcc ccgctgtgtg	360
	gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgccat caacaagtac	420
	gatgtggtca tcagattgaa caatgcccc a gtggtggct atgagggtga cgtgggtcc	480
	aagaccacca tgcgtctctt ctaccctgaa tctgccact tcgaccccaa agtagaaaac	540
	aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag	600
	accatcctga gtgataagaa gcgggtgcga aagggtttct ggaaacagcc tcccctcatc	660
	tgggatgtca atcctaaaca gattcggatt ctcaaccctc tcttcatgga gattgcagct	720
	gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gccaccacg	780
	ggcctgttgg ccatcacgct ggccctccac ctctgtgact tgggtgcacat tgccggcttt	840
	ggctaccag acgcctacaa caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc	900
	aagtccatgg cggggtcagg ccataatgtc tccaagagg ccctggccat taagcggatg	960
	ctggagatgg gagctatcaa gaacctcacg tccttctga	999
	<210> 4	
	<211> 277	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
	gcccctgacg tgcaggactg ccccgagtgc accctgcagg aaaaccctt cttcagccag	60
	cctggcgccc ctatcctgca gtgcatgggc tgtgcttca gcagagccta cccaccccc	120
	ctgcggagca agaaaaccat gctggtgcag aaaaacgtga ccagcgagag cacctgctgc	180
	gtggccaaga gctacaaccg ggtgaccgtg atgggcggct tcaaggtgga gaaccacacc	240
	gcctgccact gcagcacctg ctactaccac aagtcc	277
	<210> 5	
	<211> 351	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
	atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggtca cattgtcggg gtttctgcat	60
	gtttctcatt ccgtcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgtaca ggaaaacca	120
	ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattg gctgctgctt ctctagagca	180
	tatcccactc cactaaggtc caagaagacg atgttggctc aaaagaacgt cacctcagag	240
	tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagtg	300
	gagaaccaca cggcgtgcc a ctgcagtact tgttattatc acaaattcta a	351
15	<210> 6	
	<211> 116	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
20 25 30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
35 40 45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
50 55 60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
65 70 75 80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
85 90 95

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

Tyr His Lys Ser
115

<210> 7

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu Met Phe Gln Gly Leu 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> 8

<211> 332

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

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> 9
 <211> 92
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro
1 5 10 15

Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys
20 25 30

Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu
35 40 45

Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser
50 55 60

Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr
65 70 75 80

Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
85 90

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
20 25 30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
35 40 45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
50 55 60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
65 70 75 80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
85 90 95
Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
100 105 110

Tyr His Lys Ser
115

<210> 11

10 <211> 37

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

ccaggatcgc ccaccatgtg tctgcaggc tggaagc 37

15 <210> 12

<211> 35

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

20 ttttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg 35

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2011/042688
- WO-A2-2011/084145
- WO-A2-2013/151666

(57) Revendicări:

1. Secvență de polinucleotide cuprinzând o secvență de acid nucleic conform SECV ID NR: 1; sau o secvență de acid nucleic cu cel puțin 97% identitate de secvență cu acidul nucleic din SECV ID NR: 1.

2. Secvență de polinucleotide cuprinzând o secvență de acid nucleic conform SECV ID NR: 4; sau o secvență de acid nucleic cu cel puțin 97% identitate de secvență cu acidul nucleic din SECV ID NR: 4.

3. Celulă **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde, integrat în genomul său, o secvență care codifică lanțul α din hCG selectată dintre: o secvență conform SECV ID NR: 1; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența din SECV ID NR: 1; o secvență care are cel puțin 97% omologie cu secvența din SECV ID NR: 1; o secvență conform SECV ID NR: 4; o secvență care are cel puțin 96,5% omologie cu secvența din SECV ID NR: 4; și o secvență care are cel puțin 97% omologie cu secvența SECV ID NR: 4.

4. Celulă conform revendicării 3, care este o celulă PER.C6®.

5. Celulă conform oricăreia dintre revendicările 3 sau 4 **caracterizată prin aceea că** aceasta mai cuprinde, integrat în genomul său, un ADNc care codifică alfa-2,3-sialiltransferaza.

6. Celulă conform oricăreia dintre revendicările de la 3 la 5 **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde, în plus, integrat în genomul său, o secvență de acid nucleic care codifică lanțul β al hCG.

7. Metodă pentru producerea proteinei recombinante într-o celulă, cuprinzând cultivarea unei celule conform oricăreia dintre revendicările de la 3 până la 6 într-un mediu adecvat și recoltarea proteinei recombinante din respectiva celulă și/sau din respectivul mediu.

8. Metodă conform revendicării 7, în care proteina recombinantă este hCG.

[illegible]

[illegible]

1320	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1400	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1500	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1600	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1700	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1800	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79																					

Fig 4 și 5: Hărțile plasmidice ale phCGalfa/beta și vectorii de exprimare pST3. CMV=promotorul cytomegalovirus, BGHp(A) = secvența poli-adenilare Hormonul de Creștere Bōvin, fl ori = fl origine a replicării, SV40 = promotorul Virusului Simian 40, Neo = marker rezistență la Neomicină, Hyg = marker rezistență la Higromicină, SV40 p(A) = secvența poli-adenilare Virusului Simian 40, hCG α = polipeptida alpha gonatropină corionică umană, hCG β = polipeptida beta gonatropină corionică umană, ST3GAL4 = α 2,3-sialiltransferază, ST6GAL1 = α 2,6-sialiltransferază, ColEI = ColEI origine a replicării, Amp = marker rezistență la ampicilină

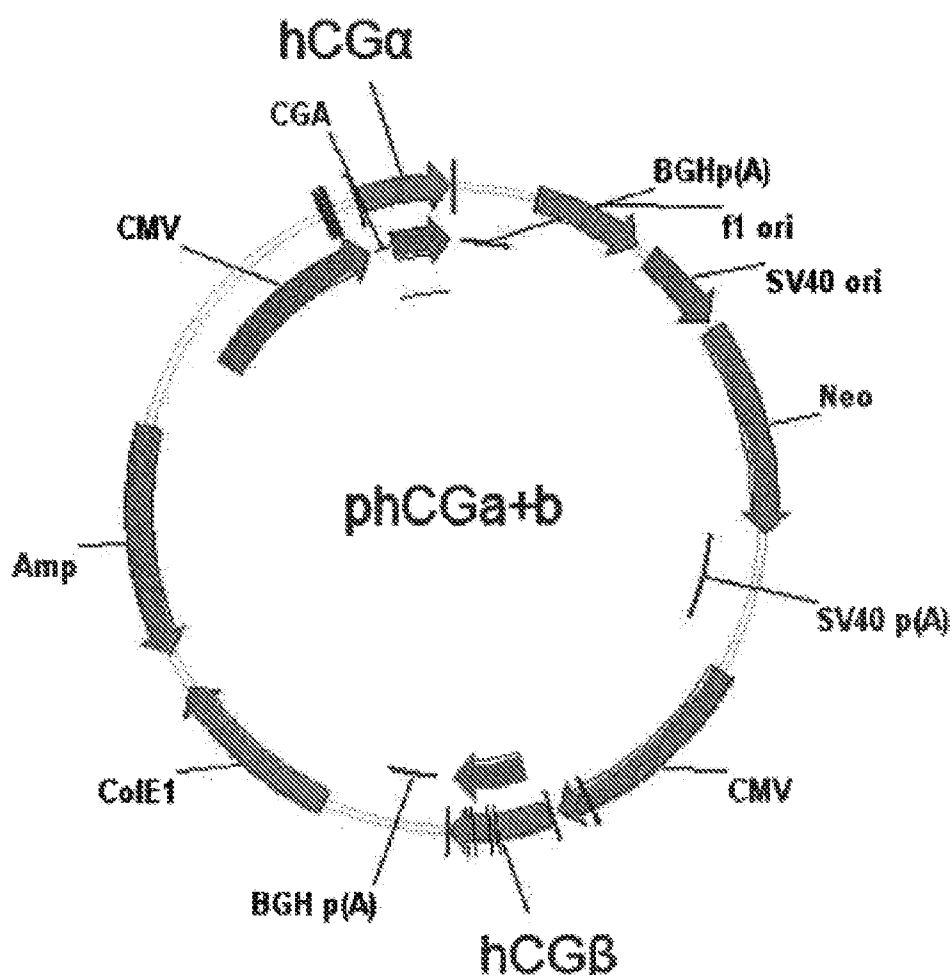


Figura 4. Vectorul de exprimare phCG

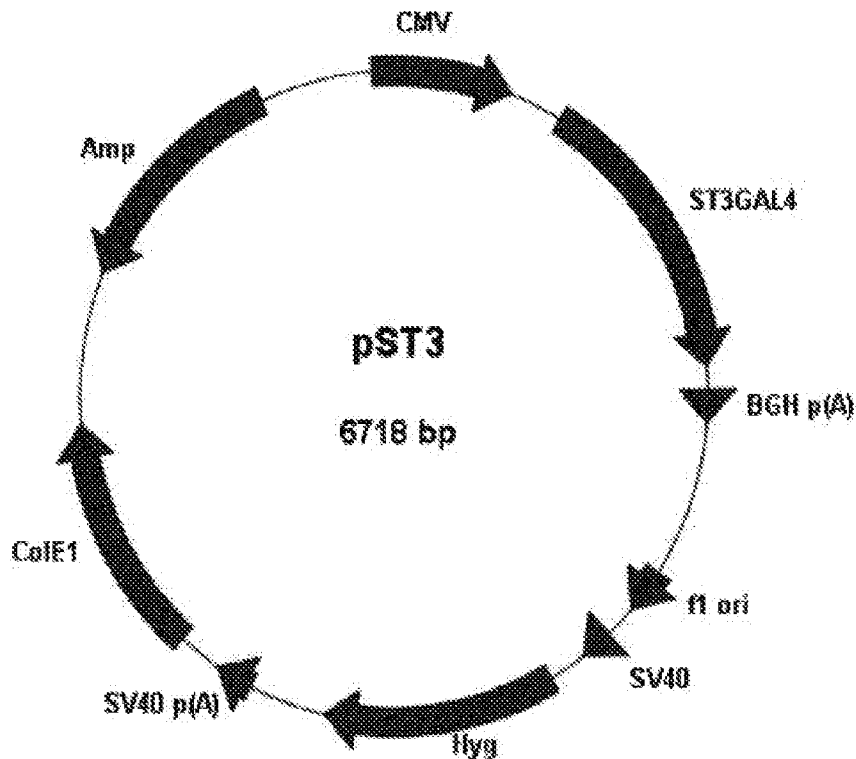


Figura 5. prezintă vectorul de exprimare $\alpha 2,3$ -sialiltransferază (ST3GAL4)

Figura 6: prezintă detectarea izoformelor rhCG cu IEF colorate cu Coomassie Blue în compoziții conform invenției (benzile 4, 5, 6 și 7, 15 μ g per bandă); compoziția derivată din CHO din stadiul tehnicii, Ovitrelle (banda 2, 15 μ g); și un produs din urină umană obținut de la femeile însărcinate Novarel (banda 3, 15 μ g); markerul IEF (banda 1 (pl de sus 7,0, 6,8, 6,5, 6,0, 5,1, și, respectiv 4,75))

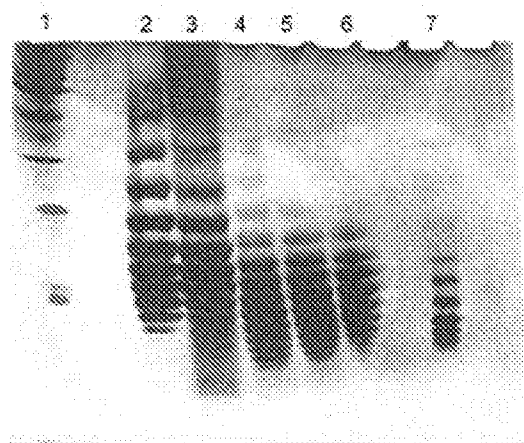


FIG. 6

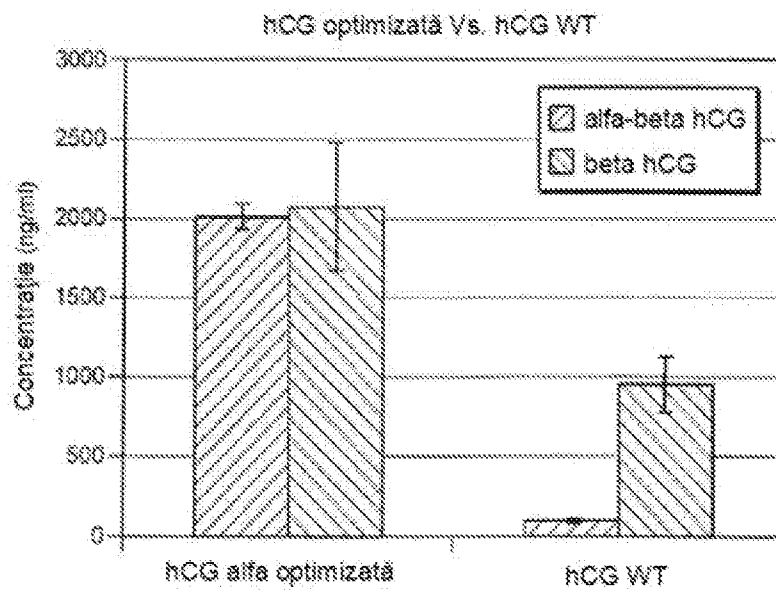


FIG. 7