ÖZET

KONTROLLÜ OVER STİMÜLASYONUNA YÖNELİK BİLEŞİM

Bu buluşla, infertilite tedavisinde kullanılmaya yönelik, FSH, örneğin rekombinant FSH içeren terkipler açıklanmıştır.

İSTEMLER

1. Serum AMH seviyesi <15 pmol/L olan bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya yönelik, insan hücre çizgisinden elde edilen rekombinant folikül uyarıcı hormon (FSH) içeren bir ürün olup, burada ürün hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 09 ila 0.19 µg insan hücre çizgisinden elde edilen rekombinant FSH'lik bir günlük dozda uygulanacaktır; burada infertilite tedavisi hastanın serum AMH seviyesinin belirlenmesi aşamasını ve tanımlanmış serum AMH seviyesine sahip bir hastaya dozun uygulanmasını aşamasını içerir.

2. İstem 1'e göre kullanılmaya yönelik bir ürün olup, burada insan hücre çizgisinden elde edilen rekombinant FSH α2, 3- ve α2, 6- sialilasyon içerir.

3. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre kullanılmaya yönelik bir ürün olup, burada insan hücre çizgisinden elde edilen rekombinant FSH α2, 3- ve α2, 6- sialilasyon içerir, burada toplam sialilasyonun %1 ila %99'u α2, 3-sialilasyondur ve toplam sialilasyonun %1 ila %99'u α2, 6- sialilasyondur.

4. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre infertilite tedavisinde kullanılmaya yönelik, insan hücre çizgisinden elde edilen rekombinant folikül uyarıcı hormon (FSH) içeren bir ürün olup, burada ürün ayrıca Na^+- veya K^+- tuzlarından veya bunların bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen farmasötik olarak kabul edilebilir bir alkali metal katyon ihtiva eden bir tuz içerir.

TARİFNAME

KONTROLLÜ OVER STİMÜLASYONUNA YÖNELİK BİLEŞİM

Bu buluş infertilite tedavisine yönelik bileşimlerle ve farmasötik ürünlerle ilgilidir.

İn vitro fertilizasyon (IVF) gibi yardımcı üreme teknolojisi (ART) teknikleri iyi bilinmektedir. Bu ART teknikleri genellikle, bir grup folikülün (kohort) tam olgunluğa stimüle edildiği bir kontrollü over stimülasyonu (COS) aşaması gerektirir. Standart COS rejimleri, foliküler gelişimin stimüle edilmesi için, normalde prematüre LH artışının önlenmesi amacıyla stimülasyondan önce ve/veya stimülasyon sırasında bir GnRH analoğu uygulanarak, tek başına veya luteinizan hormon (LH) aktivitesiyle kombinasyon halinde folikül uyarıcı hormon (FSH) gibi gonadotrofinlerin uygulanmasını içerir. COS için genellikle kullanılan farmasötik bileşimler arasında rekombinant folikül uyarıcı hormon (rFSH), idrardan elde edilen FSH, rekombinant FSH + LH terkipleri, idrardan elde edilen menotropin [insana ait menapozal gonadotropin (hMG)] ve yüksek derecede saflaştırılmış insana ait menapozal gonadotropin (HP-hMG) yer alır. IVF, şiddetli durumlarda yaşamı tehdit edebilen over hiperstimülasyon sendromu (OHSS) riskiyle ilişkilendirilebilir.

Kadınların kontrollü over stimülasyonuna (COS) tepki potansiyellerinin öngörülebilmesi bireyselleştirilmiş COS protokollerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Örneğin bu, stimülasyona aşırı tepki verdikleri öngörülen kadınlarda OHSS riskini azaltabilir ve/veya zayıf tepki verenler olarak sınıflandırılmış kadınlarda hamilelikle sonlanımı arttırabilir. Antimülleryan hormonun (AMH) serum konsantrasyonu artık over rezervinin güvenilir bir işareti olarak kabul edilmektedir. AMH'nin düşen seviyeleri, COS sırasında gonadotropinlere azalmış over tepkiyle ilişkilendirilir. Ayrıca AMH'nin yüksek seviyeleri aşırı over tepkisinin iyi bir ön göstergesidir ve OHSS riskinin bir göstergesidir.

ART'ın uygulandığı 35 yaşın altındaki kadınlar üzerinde bir ön çalışmada, OHSS geliştirme riski olan kadınlarda COS için en uygun FSH başlangıç dozunun öngörülmesinde CONSORT dozlama algoritması (bazal FSH, BMI, yaş ve AFC'yi kapsayan) kullanılmıştır (Olivennes ve diğerleri, 2009). Dozun bireyselleştirilmesi, yeterli oosit verimi ve iyi hamilelik oranı sonucunu doğurmuştur. Ancak, yetersiz tepkiye bağlı olarak düşük doz grubunda (75 IU FSH) yüksek oranda iptaller olmuştur ve hastaların önemli bir kısmında OHSS meydana gelmiştir.

Bu nedenle, stimülasyona yeterli tepki ve/veya azalmış OHSS riski sağlayan bireyselleştirilmiş COS protokollerinde kullanılmaya yönelik bir bileşime gereksinim vardır.

Yukarıda belirtildiği gibi, standart COS protokolleri, FSH uygulamasını içerebilir. FSH, ön hipofiz bezi tarafından doğal olarak salgılanır ve foliküler gelişimi ve ovülasyonu destekleme işlevi görür. FSH, hormona biyolojik özgüllüğü kazandıran, ayrıca diğer glikoprotein hormonları LH ve CG'ye özgü bir 92 amino asitlik alfa alt birimi ve sadece FSH'ye özgü bir 111 amino asitlik beta alt birimi içerir (Pierce ve Parsons, 1981). Her bir alt birim, kompleks karbonhidrat kalıntılarının eklenmesiyle posttransyasyonel olarak modifiye edilir. Her iki alt birim de N-bağlı glikan bağlantısı için 2 bölge taşır: amino asitler 52 ve 78'de alfa alt birimi ve amino asit kalıntıları 7 ve 24'de beta alt birimi (Rathnam ve Saxena, 1975, Saxena and Rathnam, 1976). Bu şekilde FSH, kitle ile yaklaşık %30 glikosile olur.

Postmenapozal insan idrarından saflaştırılmış FSH, hem doğal üremede ovülasyonu desteklemek hem de yardımcı üreme teknolojileri için oositler sağlamak amacıyla yıllardan beri infertilite tedavisinde kullanılmaktadır. Over stimülasyonu için follitropin alfa (GONAL-F, Merck Serono / EMD Serono) ve follitropin beta (PUREGON / FOLLISTIM, MSD / Schering-Plough) gibi halihazırda onaylanmış rekombinant FSH (rFSH) ürünleri bir Çin hamsteri Over (CHO) hücre çizgisinden elde edilir. Halihazırda bir insan (insana ait) hücre çizgisinden elde edilen rFHS ürünleri piyasada mevcut değildir.

Mevcut çeşitli izoform miktarlarındaki farklılıkla ilişkilendirilebilen FSH terkipleriyle bağlantılı önemli derecede heterojenlik söz konusudur. Bireye ait FSK izoformları özdeş amino asit dizileri sergiler, ancak posttranslasyonel olarak modifiye edildikleri boyutta farklılık gösterirler; belirli izoformlar karbonhidrat dal yapılarının heterojenliğiyle ve dahil edilen farklı miktarlarda sialik asitle (bir terminal şeker) karakterize edilirler, bunların her ikisi de spesifik izoform biyoaktivitesini etkiler görünmektedir.

Doğal FSH'nin glikosilasyonu hayli karmaşıktır. Doğal olarak elde edilen hipofiz bezi FHS'si, mono-, bi-, tri- ve tetra-antenli glikanların kombinasyonlarını kapsayabilen çok çeşitli yapı içerebilir (Pierce ve Parsons, 1981. Ryan *ve diğerleri,* 1987. Baenziger ve Green, 1988). Glikanlar daha başka modifikasyonlar taşıyabilir: çekirdek fukasilasyonu, ikiye ayırıcı (açıortay) glukozamin, asetil laktozamin ile uzatılmış zincirler, kısmi veya bütün sialilasyon, α2,3 ve α2,6 bağlarıyla sialilasyon ve galaktozla sübstitüe edilmiş sülfatlı galaktozamin (Dalpathado *ve diğerleri,* 2006). Buna ek olarak, bireye ait glikosilasyon bölgelerinde glikan yapılarının dağılımları arasında farklılıklar mevcuttur. Bireylerin serumundan elde edilen ve postmenapozal kadınlardan elde edilen FSH'de karşılaştırılabilir bir seviyede glikan karmaşıklığı bulunmuştur (Wide *ve diğerleri,* 2007).

Rekombinant FSH ürünlerinin glikosilasyonu, konukçu hücre çizgisinde mevcut bir dizi

glikosil-transferazı yansıtır. Piyasada mevcut rFSH ürünleri, genetik yapısı değiştirilmiş Çin hamsteri over hücrelerinden (CHO hücreleri) elde edilir. CHO hücresinden elde edilen rFSH'daki bir dizi glikan modifikasyonu doğal ürünlerde bulunanlara nazaran daha sınırlıdır. CHO hücresinden elde edilen rFSH'de bulunan azalmış glikan heterojenliğine örnekler arasında ikiye ayırıcı glukazamin eksikliği ve çekirdek fukosilasyonu ile asetil laktozamin uzantılarının azalmış içeriği yer alır (Hard *ve diğerleri,* 1990). Buna ilaveten CHO hücreleri yalnızca α2,3 bağlantısını kullanarak sialik asit ekleyebilir (Kagawa *ve diğerleri,* 1988, Takeuchi *ve diğerleri,* 1988, Svensson *ve diğerleri* 1990); CHO hücresinden elde edilen rFHS yalnızca α2,3 bağlı sialik asit içerir ve α2,6 bağlı sialik asit içermez.

Dolayısıyla CHO hücresinden elde edilen FSH, α2,3 bağlı sialik asidin ağır bastığı bir α2,3 ve α2,6-bağlı sialik asit karışımıyla birlikte glikanlar içeren doğal olarak üretilmiş FSH'den (ör. insan hipofiz bezi, serum, idrardan elde edilen FSH) farklıdır.

Ayrıca, piyasada mevcut rekombinant FSH terkibinin, hipofiz bezi, serum veya postmenapozal idrardan elde edilen FSH ile kıyaslandığında 4'ün altında bir eş elektrik noktasıyla (pI) FSH miktarlarında farklılık gösterdiği ispatlanmıştır (Ulloa-Aguirre *ve diğerleri,* 1995). İdrar terkiplerindeki asidik izoform miktarı, CHO hücresinden elde edilen rekombinant ürünler Gonal-f (Merck Serono) ve Puregon'a (Schering Plough) kıyasla çok daha yüksektir (Andersen *ve diğerleri,* 2004). Bu, rekombinant FSH'de sialik asidin düşük bir molar içeriğini yansıtmalıdır, zira sülfatla modifiye edilmiş negatif yüklü glikan rekombinant, FSH'de düşük seviyededir. Doğal FSH'ye kıyasla düşük sialik asit içeriği piyasada mevcut her iki rekombinant FSH ürününün de bir özelliğidir ve imalat işleminde bir kısıtlamayı yansıtabilir.

Materyaller için FSH'nin dolaşım yaşam süresi çeşitli kaynaklarla belgelenmiştir. Bu materyallerden bazıları, pI'larıyla karakterize edildiği gibi, genel moleküler yük bazında fraksiyonlara ayrılmıştır, burada daha fazla asit daha yüksek bir negatif yüke eşittir. Daha önce belirtildiği gibi genel moleküler yüke önemli katkıda bulunan, her bir FSH molekülünün toplam sialik içeriğidir. Örneğin rFSH (Organon) yaklaşık 8 mol/mol'lük bir sailik asit içeriğine sahiptir, buna karşın idrardan elde edilen FSH daha yüksek bir sialik asit içeriğine sahiptir (de Leeuw *ve diğerleri,* 1996). Sıçanda karşılık gelen plazma klirensi oranları 0.34 ve 0.14 ml/dak.'dır (Ulloa-Aguirre *ve diğerleri.* 2003). Bir rekombinant FSH numunesinin yüksek ve düşük pI fraksiyonları olarak ayrıldığı bir başka örnekte, yüksek pI (düşük sialik asit içeriği) fraksiyonunun *in vivo* gücü düşürülmüş ve bu, daha kısa bir plazma yarı ömrüne sahip olmuştur (D'Antonio *ve diğerleri,* 1999). Ayrıca ovülasyon döngüsünün daha ileri

aşamalarında FSH'nin daha bazal dolaşımının, estradiol'ün artan seviyelerinin neden olduğu, ön hipofiz bezinde α2,3 sialil-transferazın aşağı regülasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Damian-Matsumara *ve diğerleri,* 1999. Ulloa-Aguirre *ve diğerleri,* 2001). α2,6 sialil-transferazın sonuçları bildirilmemiştir.

Böylece, yukarıda belirtildiği gibi, CHO sistemi kullanılarak eksprese edilen rekombinant proteinler, terminal sialik asit bağlantıları bakımından kendi doğal karşılıklarından farklılık gösterecektir. Bu, farmasötik kullanım amaçlı biyolojik maddelerin üretiminde önemli bir değerlendirmedir, zira karbonhidrat parçaları molekülün farmakolojik özelliklerine katkıda bulunabilir.

Bu müracaatın sahipleri, WO2009/127826A olarak yayınlanmış Uluslararası Patent Müracaatı No. PCT/GB2009/000978'in konusu olan, insandan elde edilen bir rekombinant FSH geliştirmiştir. Hem α2,3 hem de α2,6 bağlı sialik asidin bir karışımıyla birlikte rekombinant FSH, hem rFSH hem de α2,3 sialil transferazın eksprese edilmesi için bir insan hücre çizgisinin yapısı değiştirilerek hazırlanmıştır. Eksprese edilmiş ürün yüksek derecede asidiktir ve hem α2,3- hem de α2,6-bağlı sialik asitlerin bir karışımını taşır; ikinci olarak belirtilen endojen sialil transferaz aktivitesiyle sağlanır. Sialik asit bağlantısı tipinin, α2,3- veya α2,6-nın, FSH'nin biyolojik klirensi üzerinde çarpıcı bir etkiye sahip olabildiği bulunmuştur. Hem α2,3 hem de α2,6-bağlı sialik asitin bir karışımı ile birlikte rekombinant FSH, geleneksel CHO hücrelerinde eksprese edilen rFSH'ye nazaran iki avantaja sahiptir: birincisi materyalin, iki sialil transferazın birleşik aktivitelerine bağlı olarak daha yüksek derecede sialillenmiş olmasıdır; ve ikincisi materyalin doğal FSH'ya daha yakın benzerlik göstermesidir. Bunun, yalnızca α2,3 bağlı sialik asit üretmiş olan (Kagawa *ve diğerleri,*1988, Takeuchi *ve diğerleri,* 1988, Svensson *ve diğerleri,* 1990) ve düşük sialik asit içeriğine sahip (Ulloa-Aguirre *ve diğerleri,* 1995., Andersen *ve diğerleri,* 2004) bir GHO hücresinden elde edilen rekombinant ürünlere nazaran biyolojik olarak daha uygun olması muhtemeldir.

Uluslararası Patent Müracaatı No. PCT/GB2009/000978'de açıklanan rFSH ürünü dallanmış glikan parçaları içerir. FSH, glikanlar (FSH glikoproteinlerine ilişik) içerir ve bu glikanlar çok çeşitli yapılar içerebilir. Teknikte iyi bilindiği gibi, dallanma (bir glikanın), glikanın 1, 2, 3, 4 veya daha fazla terminal şeker kalıntısına veya "antenler"e sahip olması sonucunu doğurarak meydana gelebilir; 1, 2, 3, 4 veya daha fazla terminal şeker kalıntısına veya "antenler"e sahip glikanlar sırasıyla tek antenli, iki antenli, üç antenli veya dört antenli yapılar olarak belirtilir. Glikanların tek antenli, iki antenli, üç antenli veya dört antenli yapılar üzerinde sialilasyonu mevcut olabilir. Uluslararası Patent Müracaatı No. PCT/GB2009/000978'de açıklanan bir

örnek rFSH, aşağıdaki belirtilen nispi oranlarda mono-sialillenmiş, di-sialillenmiş, tri-sialillenmiş ve tetra- sialillenmiş glikan yapıları içerir: %9-%15 mono-sialillenmiş; %27-%30 di-sialillenmiş; %30-%36 tri-sialillenmiş ve %25-%29 tetra-sialillenmiş. Çok iyi bilindiği gibi, bir mono-sialillenmiş glikan yapı bir sialik asit kalıntısı taşır; bir di-sialillenmiş glikan yapı iki sialik asit kalıntısı taşır; bir tri-sialillenmiş glikan yapı üç sialik asit kalıntısı taşır ve bir tetra-sialillenmiş glikan yapı dört sialik asit kalıntısı taşır. Burada, "%X mono-sialillenmiş", "%X di-sialillenmiş", "%X tri-sialillenmiş" veya "%X tetra-sialillenmiş" gibi terimler, herhangi bir yolla sialillenmiş (sialik asit taşıyan) FSH üzerindeki glikan yapıların toplam sayısının bir yüzdesi (%X) olarak ifade edilen, FSH üzerindeki sırasıyla mono-, di, tri veya tetra sialillenmiş olan glikan yapıların sayısını belirtir. Dolayısıyla "%30 - %36 tri-sialillenmiş glikan yapılar" ifadesi, FSH üzerinde sialik asit kalıntıları taşıyan (yani, sialillenmiş) glikan yapıların toplam sayısı üzerinden bu glikan yapıların %30 ila %36'sının tri sialillenmiş olduğunu (üç sialik asit kalıntısı taşıdığı) belirtir. Müracaat sahipleri şaşırtıcı bir şekilde, spesifik bir miktarda tetra-sialillenmiş glikan yapılara sahip FSH'nin (yukarıda belirtilmiş olan PCT/GB2009/000978'de açıklanan örnek rFSH ürününkinden farklı olan) halihazırda piyasada bulunan rekombinant FSH ürünlerinden önemli derecede daha etkili olduğunu bulmuşlardır. Müracaat sahibinin ürünlerinin amino asit dizisi doğal dizidir ve doğal insan FSH'sı ve mevcut CHO'dan elde edilen rFSH ürünleri ile aynıdır. Ancak, şimdiki müracaat sahipleri, hem α2,3 hem de α2,6-bağlı sialik asitin bir karışımına ve/veya spesifik bir miktarda tetra-sialillenmiş glikan yapılara sahip, insandan elde edilen rekombinant FSH ürünlerinin (yani, ör. bir insan hücre çizgisinin yapısı değiştirilerek bir insan hücre çizgisinde üretilmiş veya eksprese edilmiş), COS protokollerinde (ör. bireyselleştirilmiş) kullanıldığında özellikle etkin olabildiğini bulmuşlardır.

Müracaat sahipleri genellikle, transfer için yüksek kalitede iki oositin seçiminin sağlanması amacıyla dokuz oositlik bölgeden oosit toplanmasının gerekli olduğunu bulmuşlardır.

Müracaat sahipleri bu amaca ulaşmak için, düşük AMH'ye (litre başına AMH < 15 pmol/L) sahip denekler için makul derecede yüksek bir rekombinant FSH'nin (örneğin 12 μg) gerekli olduğunu bulmuşlardır. Bu dozda 8 ila 14 oosit, AMH seviyesi düşük deneklerin %60'ından toplanacaktır. Bu, 150 IU Gonal-f ile tedavi edilmiş, AMH seviyesi düşük deneklerin tedavisinde beklenmedik ve önemli bir gelişmedir, burada 8 ila 14 oosit, deneklerin yalnızca %33'ünden toplanır. Müracaat sahipleri bu dozun hastanın vücut ağırlığına göre ayarlanmasına gerek olmadığını bulmuşlardır.

Ancak poülasyonun %60'ı (ve infertilite tedavisi gören 30 yaş altı kadınların %80'i) yüksek

seviyede AMH'ye (yani ≥15 pmol/L oranında AMH) sahiptir. Bu denekler için genellikle ortalama 9 ila 11 oosit toplanması oldukça anlaşılırdır; stimülasyon protokolleriyle ilgili sorun OHSS riskidir. Müracaat sahipleri, düşük dozda insan rekombinant FSH'si dozlanan hastalarda, toplanan oositler ile deneğin vücut ağırlığı arasında bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. Bu da sabit bir dozda FSH (bu, teknikte olağandır) ile tedaviyle ilişkili bir risk olabileceği anlamına gelir. Şimdiki müraacat sahipleri FSH dozu ve AMH seviyesi ve deneğin ağırlığı arasında bir bağlantı kurmuşlardır, bu da bilinen tedavi protokollerine nazaran (bakınız örnek 10) kabul edilebilir veya geliştirilmiş oosit toplama ile birlikte artmış güvenlik profili (azalmış OHSS riski) sağlar.

Buluşun bir başka yönüne göre, ≥15 pmol/L'lik serum AMH seviyesine sahip bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmak üzere insan hücre çizgisinden elde edilen rekombinant folikül uyarıcı hormon (FSH) içeren bir ürün (ör. bir farmasötik bileşim) sağlanmıştır; burada ürün, hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.09 ila 0.19 µg (örneğin 0.09 ila 0.17 µg) insan hücre çizgisinden elde edilen rekombinant FSH'lik bir günlük dozda uygulanacaktır; burada infertilite tedavisi hastanın serum AMH seviyesinin belirlenmesi aşamasını ve tanımlanmış serum AMH seviyesine sahip bir hastaya dozun uygulanmasını aşamasını içerir.

Bir düzenlemede ürün, 15 ila 24.9 pmol/L serum AMH seviyesine sahip bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya yöneliktir ve ürün hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.14 ila 0.19 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik (tercihen 0.15 ila 0.16 µg insandan elde edilen rekombinant FSH) bir günlük dozda uygulanacaktır. Bu düzenlemede infertilite tedavisi hastanın serum AMH seviyesinin belirlenmesi (ör. ölçülmesi) ve 15 ila 24.9 pmol/L serum AMH seviyesine sahip bir hastaya dozun uygulanması aşamasını içerir. Bir başka düzenlemede ürün 25 ila 34.9 pmol/L serum AMH seviyesine sahip bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya yöneliktir ve ürün hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.11 ila 0.14 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik (tercihen 0.12 ila 0.13 µg insandan elde edilen rekombinant FSH) bir günlük dozda uygulanacaktır. Bu düzenlemede infertilite tedavisi hastanın serum AMH seviyesinin belirlenmesi (ör. ölçülmesi) ve 25 ila 34.9 pmol/L serum AMH seviyesine sahip bir hastaya dozun uygulanması aşamasını içerir. Yine bir başka düzenlemede ürün, ≥ 35 pmol/L serum AMH seviyesine sahip bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya yöneliktir ve ürün hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.10 ila 0.11 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik bir günlük dozda uygulanacaktır. Bu düzenlemede infertilite tedavisi hastanın serum AMH seviyesinin belirlenmesi (ör. ölçülmesi) ve ≥ 35 pmol/L serum AMH seviyesine sahip bir hastaya dozun uygulanması aşamasını içerir.

Dozlar OHSS riskini en aza indirgerken etkili bir tepki sağlar.

Yukarıdaki dozlar hastanın (deneğin) ilk stimülasyon protokolünde infertilite tedavisine yönelik olabilir. Daha ileri stimülasyon döngüleri için dozların birinci döngüdeki mevcut over tepkisine göre ayarlanabildiği takdir edilecektir.

Tercihen rFSH (ör. insan hücre çizgisinden elde edilen rekombinant FSH), α2,3- ve α2,6-sialilasyon içerir. Buluşa göre kullanılmaya yönelik FSH (rFSH)'de toplam sialilasyonun %1 ila %99'u α2,3-sialilasyonu olabilir. Buluşa göre FSH (rFSH)'de toplam sialilasyonun %1 ila %99'u α2,6-sialilasyonu olabilir. Tercihen toplam sialilasyonun %50 ila %70'i, örneğin %60 ila %69'u, örneğin yaklaşık %65'i α2,3-sialilasyonudur. Tercihen toplam sialilasyonun %25 ila %50'si, örneğin %30 ila %50'si, örneğin %31 ila %38'i, örneğin yaklaşık %35'i α2,6-sialilasyonudur.

Tercihen rFSH (ör. insan hücre çizgisinden elde edilen rekombinant FSH), mono-, di-, tri- ve tetra-sialillenmiş glikan yapılar içerir, burada sialillenmiş glikan yapıların %15-%24'ü, örneğin %17-%23'ü tetrasialillenmiş glikan yapılardır (ör. aşağıdaki Örneklerde belirtildiği gibi yüklü glikanların WAX analizinde gösterildiği üzere). FSH, glikanlar içerir (FSH glikoproteinlerine ilişik). FSH'deki glikanların çok çeşitli yapılar içerebildiği iyi bilinmektedir. Bu yapılar arasında mono, bi, tri ve tetra-antenli glikanlar yer alır. Burada "sialillenmiş glikan yapıların %X'i tetrasialillenmiş glikan yapılardır" terminolojisi, herhangi bir yolla sialillenmiş (sialik asit taşıyan) FSH üzerindeki glikan yapıların toplam sayısının bir yüzdesi (%X) olarak ifade edilen, FSH üzerinde tetra sialillenmiş, yani dört sialik asit kalıntısı taşıyan glikan yapıların sayısını belirtir. Dolayısıyla "sialillenmiş glikan yapıların %15-%24'ü tetrasialillenmiş glikan yapılardır" ifadesi, FSH üzerinde sialik asit kalıntıları taşıyan (yani, sialillenmiş) glikan yapıların toplam sayısı üzerinden bu glikan yapıların %15 ila %24'ünün tetra sialillenmiş olduğunu (dört sialik asit kalıntısı taşıdığını) belirtir.

rFSH, bir tekli izoform veya izoformların bir karışımı olarak mevcut olabilir.

Müracaat sahipleri "bireyselleştirilmiş" COS protokolleri tasarlamışlardır, burada spesifik özelliklere sahip rekombinant FSH'nin spesifik dozları, hastaların spesifik AMH seviyeleri bazında hastaları tedavi etmekte kullanılır, böylece (ör. düşük tepki potansiyeli olan hastalarda) stimülasyona yeterli tepki olasılığını arttırır ve/veya (ör.yüksek veya aşırı tepki verenler olarak sınıflandırılmış hastalarda) OHSS riskini azaltır.

AMH'nin serum seviyesi teknikte bilinen herhangi bir usulle belirlenebilir (ör. ölçülebilir). Tercihen serum AMH seviyesi bir kit olan AMH Gen-II enzime bağlı bağışıklık testi kiti

kullanılarak ölçülür (Beckman Coulter, Inc., Webster, Teksas). Bu test, 1.1 pmol/L'lik asgari miktar tayini sınırıyla 0.57 pmol/L'den daha büyük AMH konsantrasyonlarını belirleyebilir. Başka testler de kullanılabilir.

Burada serum AMH değerleri genellikle pmol/L cinsinden belirtilir. Bu, dönüştürme

Burada "hasta" ve "denek" terimleri birbirinin yerine geçebilir şekilde kullanılmıştır.

Ürün (ör. farmasötik bileşim) tercihen yukarıda, burada ve istemlerde tanımlanan insandan elde edilen rFSH miktarlarında bir günlük doz veya bu miktarlara eşdeğer bir günlük doz içerir. (Günlük) doz, bir başlangıç dozu olabilir (yani doz tedavi sırasında azaltılabilir, arttırılabilir veya korunabilir).

Ürün (ör. farmasötik bileşim), tedavinin birinci günü başlayan ve yedi ila onüç gün, örneğin dokuz ila onüç gün, örneğin 10 ila 13 gün, örneğin 10 ila 11 gün devam eden FSH (günlük) uygulamasına yönelik olabilir. Ürün (ör. farmasötik bileşim), bir GnRH agonistinin (ör. Sinarel, Lupron, Dekapeptil) uygulanmasından 12 ila 16 gün, ör. 13 ila 15, ör. 14 gün sonra (ör. uygulamaya başlandıktan sonra, ör. günlük uygulamanın başlamasından sonra) uygulanmaya yönelik olabilir. Ürün (ör. farmasötik bileşim), bir GnRH agonistiyle birlikte uygulanmaya yönelik olabilir. Ürün (ör. farmasötik bileşim), bir GnRH antagonistinin (ör. ganireliks, setroreliks) uygulanmasından önce uygulanmaya yönelik olabilir, örneğin bir GnRH antagonistinin uygulanmasından beş veya altı gün önce uygulanmaya yönelik olabilir. Ürün (ör. farmasötik bileşim), bir GnRH agonistiyle birlikte uygulanmaya yönelik olabilir. Tercihen ürün (ör. farmasötik bileşim), nihayi foliküler olgunlaşmanın indüklenmesi için yüksek bir (ovülatuar) hCG dozunun (örneğin 4,000 ila 11,000 IU hCG, ör. 5,000 IU hCG, 10,000 IU hCG vb.; veya 150 ila 350 mikrogram rekombinant hCG, örneğin 250 mikrogram rekombinant hCG) uygulanmasından önce uygulanmaya yönelik olabilir.

Ürün, günlük dozdan fazla (veya daha az) sıklıkta dozlamaya yönelik olabilir, bu durumda ilişkili dozlar burada belirtilmiş olan (günlük) dozlara eşdeeğer olacaktır.

Burada "infertilite tedavisi" terimi, kontrollü over stimülasyonuyla (COS) veya kontrollü over stimülasyonunun bir aşaması veya safhasını içeren usullerle, örneğin Rahim İçi İnseminasyon (IUI), *in vitro* fertilizasyon (IVF) veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile infertilite tedavisini kapsar. "İnfertilite tedavisi" terimi, ovülasyon indüksiyonuyla (OI) veya ovülasyon indüksiyonunun bir aşaması veya safhasını içeren usullerle infertilitenin tedavisini kapsar. "İnfertilite tedavisi" terimi, endometriyozisi, örneğin aşama I veya aşama II endometriyozisi olan bir denekte ve/veya anovülatuar infertilitesi olan, örneğin WHO tipi

anovülatuar infertilitesi olan bir denekte ve/veya erkek infertilitesi olan bir partnere sahip bir denekte infertilite tedavisi dahil olmak üzere tubal veya açıklanamayan infertilitesi olan bir denekte infertilitenin tedavisini içerir. Ürün (veya bileşim), endometriyozisi olan bir denekte, endometriyozisin çeşitli aşamaları için (aşama IV en şiddetli; aşama I en az şiddetli) Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) sınıflandırma sistemiyle tanımlanmış olan örneğin aşama I veya aşama II endometriyozisi olan bir denekte infertilitenin tedavisine (ve/veya kontrollü over stimülasyonuna) yönelik (kullanılmaya yönelik) olabilir [American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril 1997; 67,817 821.].

Ürün (bileşim), erken foliküler evrede 1 ila 16 IU/L, örneğin 1 ila 12 IU/L'lik bir normal serum FSH seviyesine sahip bir denekte infertilite tedavisine (ve/veya kontrollü over stimülasyonuna) yönelik (kullanılmaya yönelik) olabilir.

Ürün (bileşim), 18 ila 42 yaşında, örneğin 25 ila 37 yaşında bir denekte infertilite tedavisine (ve/veya kontrollü over stimülasyonuna) yönelik (kullanılmaya yönelik) olabilir. Ürün, BMI >1 ve BMI < 35 kg/m^2 olan bir denekte, örneğin BMI >18 ve BMI < 25 kg/m^2 olan bir denekte, örneğin BMI >20 ve BMI < 25 kg/m^2 olan bir denekte infertilite tedavisine (ve/veya kontrollü over stimülasyonuna) yönelik (kullanılmaya yönelik) olabilir.

rFSH tercihen %27 - %33, örneğin %30 - %32 tri-sialillenmiş glikan yapılar içerebilir. rFSH tercihen %24 - %33, örneğin %26 - %30 di-sialillenmiş glikan yapılar içerebilir. rFSH tercihen %12 - %21, örneğin %15 - %17 mono-sialillenmiş glikan yapılar içerebilir. rFSH tercihen, aşağıdaki nispi miktarlarda mono-sialillenmiş, di- sialillenmiş, tri-sialillenmiş ve tetra- sialillenmiş glikan yapılar içerebilir: %15 ila %17 mono-sialillenmiş, %26 - %30 di-sialillenmiş, %27 - %33 (ör. %29 ila %32, ör. %30-%32, ör. %30 ila % 31) tri-sialillenmiş ve %17 - %23 tetra-sialillenmiş (ör. Örneklerde belirtildiği gibi yüklü glikanların WAX analizinde gösterildiği üzere). rFHS %0 ila %7, örneğin %0.1 ila %7, örneğin %3 ila %6, örneğin %5 ila %6 nötr sialillenmiş yapılar içerebilir. FSH, glikanlar (FSH glikoproteinlere ilişik) içerir. Burada, "%X mono-sialillenmiş", "%X di-sialillenmiş", "%X tri-sialillenmiş" veya "%X tetra-sialillenmiş" gibi terimler, herhangi bir yolla sialillenmiş (sialik asit taşıyan) FSH üzerindeki glikan yapıların toplam sayısının bir yüzdesi (%X) olarak ifade edilen, FSH üzerindeki (sırasıyla) mono-, di, tri veya tetra sialillenmiş olan glikan yapıların sayısını belirtir. Dolayısıyla "%27 - %33 tri-sialillenmiş glikan yapılar" ifadesi, FSH üzerinde sialik asit kalıntıları taşıyan (yani, sialillenmiş) glikan yapıların toplam sayısı üzerinden bu glikan yapıların %27 ila %33'ünün tri sialillenmiş olduğunu (üç sialik asit kalıntısı taşıdığını)

belirtir.

rFSH, 6 mol/mol veya daha fazla, örneğin 6 mol/mol ile 15 mol/mol arasında, ör. 8 mol/mol ile 14 mol/mol arasında, örneğin 10 mol/mol ile 14 mol/mol arasında, ör. 11 mol/mol ile 14 mol/mol arasında, ör. 12 mol/mol ile 14 mol/mol arasında, ör. 12 mol/mol ile 13 mol/mol arasında bir sialik asit içeriğine [sialik asit mollerinin protein mollerine oranı olarak ifade edilir] sahip olabilir. rFSH bir insan hücre çizgisinde üretilebilir veya eksprese edilebilir.

Buluşa göre kullanılmaya yönelik FSH'de (rFSH) toplam sialilasyonun %1 ila %99'u α2,3-sialilasyon olabilir. rFSH'de toplam sialilasyonun %10 veya daha fazlası α2,3-sialilasyon olabilir. Örneğin, toplam sialilasyonun %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 veya %90'ı veya daha fazlası α2,3- sialilasyon olabilir. rFHS tercihen, toplam sialilasyonun %50 ila %70'i, örneğin toplam sialilasyonun %60 ila %69'u, örneğin toplam sialilasyonun %63 ila %67'si, örneğin yaklaşık %65'i kadar bir miktarda α2,3-sialilasyon içerebilir. Buluşa göre kullanılmaya yönelik FSH'de (rFSH) toplam sialilasyonun %1 ila %99'u α2,6- sialilasyon olabilir. Buluşun rFSH'sinde (veya rFSH terkibinde) toplam sialilasyonun %5 veya daha fazlası, örneğin%5 ila %99'u α2,6-sialilasyon olabilir. rFSH'de toplam sialilasyonun %50'si veya daha azı α2,6- sialilasyon olabilir. rFHS tercihen, toplam sialilasyonun %25 ila %50'si, örneğin toplam sialilasyonun %30 ila %50'si, örneğin toplam sialilasyonun %31 ila %38'i, örneğin yaklaşık %35'i kadar bir miktarda α2,6-sialilasyon içerebilir. Sialilasyon ile, FSH karbonhidrat yapıları üzerinde mevcut sialik kalıntısı miktarı belirtilir. α2,3-sialilasyon, 2,3 pozisyonunda sialilasyonu (teknikte iyi bilindiği gibi) ve α2,6 sialilasyon 2,6 pozisyonunda sialilasyonu (yine teknikte iyi bilindiği gibi) belirtir. Böylece "% toplam sialilasyon α 2,3 sialilasyon olabilir" ifadesi 2,3 pozisyonunda sialillenmiş FSH'de mevcut sialik asit kalıntılarının toplam sayısının yüzdesini belirtir. "% Toplam sialilasyon α 2,6 sialilasyon olabilir" ifadesi 2,6 pozisyonunda sialillenmiş FSH'de mevcut sialik asit kalıntılarının toplam sayısının yüzdesini belirtir.

rFSH, kütlece %6 veya daha büyük (ör. %6 ile %15 arasında, ör. %7 ile %13 arasında, ör. %8 ile %12 arasında, ör. %11 ile %15 arasında, ör. %12 ile %14 arasında) bir sialik asit içeriğine (her bir FSH molekülü için sialilasyon miktarı) (protein artı karbonhidrat kütlesinden ziyade protein kütlesi bazında) sahip olabilir.

rFSH, glikanların %16'sı veya daha azının (ör. %0.1 ila %16'sı) ikiye ayırıcı N-asetilglukozamin (ikiye ayırıcı GlcNAc veya bisGlcNAc) içerdiği (ör. taşıdığı) rFSH veya bir rFSH terkibi olabilir. Tercihen rFSH (veya rFSH terkibi), glikanların %8 ila %14.5'inin ikiye ayırıcı N-asetilglukozamin (ikiye ayırıcı GlcNAc veya bisGlcNAc) içerdiği (ör. taşıdığı) rFSH

veya rFSH terkibidir.

FSH'nin FSH glikoproteinlerine ilişik glikanlar içerdiği anlaşılacaktır. Ayrıca, glikanların %100'ünün FSH glikoproteinlerine ilişik glikanların tümünü belirttiği veya bu anlama geldiği de anlaşılacaktır. Dolayısıyla burada "glikanların %8 ila %14.5'i ikiye ayırıcı N-asetilglukozamin içerir (taşır) " terminolojisi, FSH glikoproteinlerine ilişik glikanların toplam sayısının %8 ila %14.5'inin ikiye ayırıcı N-asetilglukozamin içerdiğini/taşıdığını belirtir; "glikanların %16'sı veya daha azı ikiye ayırıcı N-asetilglukozamin içerir (taşır)" ifadesi, FSH glikoproteinlerine ilişik glikanların toplam sayısının %16'sı veya daha azının ikiye ayırıcı N-asetilglukozamin içerdiğini/taşıdığını belirtir; vb.

Müracaat sahipleri, ikiye ayırıcı GlcNac taşıyan glikanların %16'sı veya daha azının (ör. %8 ila %14.5) FSH glikoproteinlerinde içerildiği rekombinant FSH'nin (rFSH terkipleri; rFSH bileşimleri) avantajlı farmakokinetik özelliklere sahip olabildiğini bulmuşlardır. İkiye ayırıcı GlcNac taşıyan glikanların miktarı insan idrarından elde edilen ürün Bravelle'dekiyle benzer olduğundan -WO2012/017058'de açıklananlar gibi diğer rekombinant FSH terkiplerininkinden bir hayli daha az- avantajlı özelliklerin ortaya çıkabileceğine inanılmaktadır.

rFSH (veya rFSH terkibi), glikanların %20'si veya daha fazlasının N-Asetilgalaktozamin (GalNAc) içerdiği (ör. taşıdığı), örneğin glilanların %20'si veya daha fazlasının bir terminal GalNAc içerdiği (ör. taşıdığı) bir rFSH veya rFSH terkibi olabilir. Tercihen rFSH (veya rFSH terkibi), glikanların %40 ila %55'inin, örneğin %42 ila %52'sinin GalNAc içerdiği (ör. taşıdığı), bir FSH veya FSH terkibidir. Tercihen rFSH (veya rFSH terkibi), glikanların %40 ila %55'inin, örneğin %42 ila %52'sinin terminal GalNAc içerdiği (ör. taşıdığı) bir FSH veya FSH terkibidir.

FSH'nin FSH glikoproteinlerine ilişik glikanlar içerdiği anlaşılacaktır. Ayrıca glikanların %100'ünün FSH glikoproteinlerine ilişik glikanların tümünü belirttiği veya bu anlama geldiği de anlaşılacaktır. Dolayısıyla burada "burada glikanların %20 veya daha fazlası GalNAc içerir (taşır) " terminolojisi, FSH glikoproteinlerine ilişik glikanların toplam sayısının %20'si veya daha fazlasının N-asetilgalaktozamin (GalNAc) içerdiğini/taşıdığını belirtir; "glikanların %40 ila %55, örneğin %42 ila %52'si terminal GalNAc içerir (taşır)" ifadesi, FSH glikoproteinlerine ilişik glikanların toplam sayısının %40 ila %55, örneğin %42 ila %52'sinin terminal GalNAc içerdiğini/taşıdığını belirtir; vb.

Görünen odur ki α2,6- bağlantısının mümkün olması, yalnızca α2,3- bağlantısına sahip CHO

hücresinden elde edilen ürünlere nazaran tetra sialillenmiş yapıların sayısını arttırır. Müracaat sahipleri ayrıca kendi rFSH ürünlerinin, şeker bileşiminden dolayı diğer onaylanmış ürünlerden daha üstün olduğunu bulmuşlardır: ürün spesifik bir miktarda GalNac içerir veya içerebilir. Bu, tetrasialilasyon ve güçle ilişkilendirilebilir, zira 2,6- sialilasyon GalNac ile ilişkilidir. Diğer bir deyişle şimdiki müracaat sahipleri spesifik özellikler içeren (2,6- bağlantı bölgeleri, GalNac), yüksek sialilasyon derecesine sahip rFSH sağlayan, gelişmiş *in vivo* güç sonucunu doğuran bir rFSH ürünü geliştirmiştir.

rFSH'de (veya rFSH terkibinde) glikanların %16 ila %24'ü (ör. terminal) 1 fukoz-lewis, örneğin glikanların %16.5 ila %18'i (ör. terminal) 1 fukoz-lewis içerebilir. rFSH'de (veya rFSH terkibinde) glikanların %1.5 ila %4.5'i, örneğin %2 ila %4'ü, örneğin %3.7'si (ör. terminal) 2 fukoz-lewis içerebilir. Fukoz lewis içeriğinin güç üzerinde bir etkisi olabilir.

rFSH, bir insan hücre çizgisinde, ör. bir Per.C6 hücre çizgisinde, bir HEK293 hücre çizgisinde, bir HT1080 hücre çizgisinde, vb. üretilebilir veya eksprese edilebilir. Bu, üretim usulünü basitleştirebilir (ve daha etkili kılabilir), zira ör. hücre büyüme ortamının sialilasyonu sürdürmesinin manipüle edilmesi veya kontrol altına alınması bilinen işlemlere kıyasla daha az önemlidir. Ayrıca usul daha etkin olabilir, zira bilinen rFSH ürünlerinin üretimine kıyasla üretilen daha az bazik rFSH söz konusudur; daha asidik rFSH üretilir ve bazik FSH'nin ayrılması/çıkarılması daha az sorun teşkil eder. rFSH, bir Per.C6® hücre çizgisinde, bir PER.C6®'dan elde edilen hücre çizgisinde veya bir modifiye edilmiş PER.C6® hücre çizgisinde üretilebilir veya eksprese edilebilir. Bir insan hücre çizgisinde (ör. PER.C6® hücre çizgisi, HEK293 hücre çizgisi, HT1080 hücre çizgisi vb.) üretilen veya eksprese edilen rFSH, [hücre çizgisinin] endojen sialil transferaz aktivitesiyle sağlanan bir miktar α2,6-bağlı sialik asit (α2,6 sialilasyon) içerecektir ve endojen sialil transferaz aktivitesiyle sağlanan bir miktar α2,3-bağlı sialik asit (α2,3 sialilasyon) içerecektir. Hücre çizgisi α2,3-sialil transferaz kullanılarak modifiye edilebilir. Hücre çizgisi, α2,6-sialil transferaz kullanılarak modifiye edilebilir. Alternatif olarak veya ilaveten rFSH, [hücre çizgisinin] endojen sialil transferaz aktivitesiyle sağlanan α2,6-bağlı sialik asit (α2,6 sialilasyon) içerebilir. Burada "insandan elde edilen rekombinant FSH" terimi, bir insan hücre çizgisinde üretilen veya eksprese edilen rekombinant FSH'yi (ör. bir insan hücre çizgisinin yapısı değiştirilerek üretilen rekombinant FSH'yi) belirtir.

rFSH, α2,3- ve/veya α2,6-sialil transferaz kullanılarak üretilebilir. Bir örnekte rFSH, α2,3-sialil transferaz kullanılarak üretilir. rFSH, endojen sialil transferaz aktivitesiyle sağlanan α2,6-bağlı sialik asit (α2,6 sialilasyon) içerebilir.

Ürün bir farmasötik bileşim olabilir. Farmasötik bileşim infertilite tedavisine yöneliktir. İnfertilite tedavisi yardımcı üreme teknolojileri (ART), ovülasyon indüksiyonu veya rahim içi inseminasyonu (IUI) kapsayabilir. Farmasötik bileşim, örneğin bilinen FSH terkiplerinin kullanıldığı tıbbi bulgularda kullanılabilir.

Ürün veya bileşim, herhangi bir yolla uygulanmak üzere, ör. ağız yoluyla, rektal, parenteral, transdermal (ör. yama teknolojisi), intravenöz, intramusküler, sübkütanöz, intrasusternal, intravajinal, intraperitoneal, lokal (tozlar, merhemler veya damlalar) veya bir bukkal ve nazal sprey olarak iyi bilinen bileşimlere formüle edilebilir. Tipik bir bileşim, diğerlerinin arasında Remington's Pharmaceutical Sciences, Beşinci basım (Matt Publishing Company, 1975), sayfa 1405 ila 1412 ve 1461 - 87, ve 'National Formulary XIV', Ondördüncü basımda (American Pharmaceutical Association, 1975) açıklandığı gibi sulu çözelti, tuzlar ve koruyucular dahil toksik olmayan eksipiyanlar, tamponlar ve benzeri gibi farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı içerir.

Uygun sulu ve susuz farmasötik taşıyıcılar, seyrelticiler, çözücüler veya vehiküllerin örnekleri arasında su, etanol, polioller (gliserol, propilen glikol, polietilen glikol ve benzeri gibi), karboksimetilselüloz ve bunların uygun karışımları, bitkisel yağlar (zeytinyağı gibi), ve etil oleat gibi enjekte edilebilir organik esterler yer alır. Bu buluşun bileşimleri ayrıca, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla koruyucu maddeler, ıslatma maddeleri, emülsifiye edici maddeler, yüzey aktif maddeler ve dağıtıcı maddeler gibi katkı maddeleri içerebilir. Mikropların büyümesinin engellenmesi için antibakteriyel ve antifungal maddeler dahil edilebilir ve bunlar arasında örneğin m-kresol, benzil alkol, paraben, klorobutanol, fenol, sorbik asit ve benzeri yer alır. Bir koruyucu madde dahil edilirse, benzil alkol, fenol ve/veya m-kresol tercih edilir; ancak koruyucu madde hiçbir şekilde bu örneklerle sınırlandırılmamıştır. Bundan başka, şekerler, sodyum klorür ve benzeri gibi izotonik maddelerin dahil edilmesi arzu edilebilir. Ürün veya bileşim ayrıca Na^+- veya K^+- tuzları veya bunların bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen farmasötik olarak kabul edilebilir bir alkali metal katyon ihtiva eden bir tuz içerebilir. Tercihen tuz bir Na+- tuzu, örneğin NaCl veya Na_2SO_4'dür.

Tercihen ürün veya bileşim, rekombinant FSH ve Polisorbat 20, L-metiyonin, fenol, disodyum sülfat ve sodyum fosfat tamponundan bir veya daha fazlasını içerir.

Bazı vakalarda uzun süreli faaliyete etki etmesi için FSH'nin (ve mevcut ise diğer aktif bileşenlerin) sübkütanöz veya intramüsküler enjeksiyondan absorpsiyonun yavaşlatılması istenir. Bu, suda zayıf çözünürlüğe sahip kristalin veya amorf bir sıvı süspansiyonun kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir. O takdirde FSH'nin absorpsiyon oranı, kendi çözünme

oranına bağlıdır, çözünme oranı da kristal boyutuna ve kristalin formuna bağlı olabilir. Alternatif olarak, parenteral olarak uygulanan bir FSK kombinasyon formunun gecikmeli absorpsiyonu, FSH kombinasyonun bir yağ taşıyıcı içinde çözünmesiyle veya süspansiyon haline getirilmesiyle başarılabilir. Enjekte edilebilir depo formlar, FSH'nin (ve mevcut ise diğer maddelerin) mikroenkapsül matrislerinin polilaktid-poliglikolid gibi biyolojik olarak bozunabilir polimerler içinde oluşturulmasıyla hazırlanabilir. FSH'nin polimere oranına ve kullanılan belirli polimere bağlı olarak FSH salınma oranı kontrol altına alınabilir. Diğer biyolojik olarak bozunabilir polimerlerin örnekleri arasında polivinilpirrolidon, poli(ortoesterler), poli(anhidrürler) vb. yer alır. Enjekte edilebilir depo formülasyonlar ayrıca FSH'nin, vücut dokularıyla bağdaşabilen lipozomlar veya mikroemülsiyonlar içinde yakalanmasıyla hazırlanabilir.

Enjekte edilebilir formülasyonlar, örneğin bir bakteri tutucu filtre yoluyla süzülerek veya kullanımdan hemen önce steril su veya daha başka steril enjekte edilebilir ortam içinde çözünebilen veya dağılabilen steril katı bileşimler formunda sterilizasyon maddeleri katılarak sterilize edilebilir. Enjekte edilebilir formülasyonlar, herhangi bir uygun kap, ör. viyal, önceden doldurulmuş şırınga, enjeksiyon kartuşları ve benzeri içinde tedarik edilebilir.

Ürün veya bileşim tek kullanımlık ve çok kullanımlık (birden fazla doz) olarak formüle edilebilir. Ürün veya bileşim çok kullanımlık olarak formüle edilirse, buna bir koruyucu maddenin dahil edilmesi tercih edilir. Bir koruyucu madde dahil edilirse benzil alkol, fenol ve/veya m-kresol tercih edilir, ancak koruyucu madde hiçbir şekilde bu örneklerle kısıtlı değildir. Tek veya çok kullanımlık formüle edilmiş ürün veya bileşim ayrıca Na^+- veya K^+-tuzları veya bunların bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen farmasötik olarak kabul edilebilir bir alkali metal katyon ihtiva eden bir tuz içerebilir. Tercihen tuz bir Na+- tuzu, örneğin NaCl veya Na_2SO_4'dür.

Ürün veya bileşim bir viyal, önceden doldurulmuş kartuş (ör. tekli uygulama için veya birden fazla kullanım için) veya bir "kalem" gibi bir enjeksiyon aleti (ör. birden fazla doz uygulaması için) gibi bir kap içine konabilir.

Ürün veya bileşim, FSH içeren (isteğe bağlı olarak hCG, LH, LH aktivitesi ve ve benzerine sahip) bir formülasyon (ör. enjekte edilebilir formülasyon) olabilir. Eğer mevcut ise LH aktivitesi LH veya insan koryonik gonadotrapin, hCG orijinli olabilir. Eğer birden fazla aktif bileşen mevcutsa (yani FSH ve ör. hCG veya LH) bunlar ayrı ayrı veya birlikte uygulanmaya uygun olabilir. Eğer ayrı ayrı uygulanırlarsa uygulama ardışık olabilir. Ürün herhangi bir uygun ambalaj içinde tedarik edilebilir. Örneğin ürün, ya FSH ya da hCG içeren veya FSH ile

hCG'nin bir kombinasyonunu içeren birkaç kap (ör. önceden doldurulmuş şırıngalar veya viyaller) içerebilir. hCG, rekombinant hCG veya üriner hCG olabilir. Eğer ürün, FSH, ör. rekombinant FSH içeren birkaç kaptan (ör. önceden doldurulmuş şırıngalar veya viyaller) oluşuyorsa her bir kap aynı miktarda FSH içerebilir. Bir veya daha fazla kap farklı miktarlarda FSH içerebilir. Şırıngalar veya viyaller sterilliğin korunması için bir blister veya başka vasıtaların içine konabilir. Herhangi bir ürün isteğe bağlı olarak FSH (ve ör. mevcut ise hCG) formülasyonlarının kullanılmasına yönelik talimatlar içerebilir.

Farmasötik bileşimlerin çeşitli bileşenlerinin pH ve tam konsantrasyonları, bu sahadaki rutin uygulamaya göre ayarlanır. Bakınız GOODMAN ve GILMAN'a ait THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICES, 7^{nci} basım. Tercih edilen bir düzenlemede buluşun bileşimleri parenteral uygulanan bileşimler olarak tedarik edilmiştir. Parenteral formülasyonların hazırlanmasına yönelik genel usuller teknikte bilinmektedir ve yukarıda zikredilen REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, sayfa 780-820'de açıklanmıştır. Parenteral bileşimler sıvı bir formülasyon olarak veya uygulamadan önce steril bir enjekte edilebilir ortam ile karıştırılacak olan bir katı halinde tedarik edilebilir. Özellikle tercih edilen bir düzenlemede parenteral bileşimler uygulama kolaylığı ve dozaj homojenliği açısından birim dozaj formunda tedarik edilir.

Buluşun Detaylı Açıklaması

Bu buluş şimdi ilişikteki çizimlere atıfla daha detaylı olarak açıklanacaktır; çizimlerde:

Şekil 1, pFSHalfa/beta ekspresyon vektörünün bir plazmid haritasını gösterir;

Şekil 2, α2,3-sialil transferaz (ST3GAL4) ekspresyon vektörünü gösterir;

Şekil 3, α2,6-sialil transferaz (ST6GAL1) ekspresyon vektörünü gösterir;

Şekil 4, α2,3-sialil transferaz ile yapısı değiştirildikten sonra sabit bir şekilde FSH'yi eksprese eden PER.C6® hücreleriyle üretilmiş rekombinant FSH örneklerinde sialik asit dağılımı bolluk (miktar) %'sini gösterir.

Şekil 5, α2,3-sialil transferaz ile yapısı değiştirildikten sonra sabit bir şekilde FSH'yi eksprese eden PER.C6® hücreleriyle üretilmiş rekombinant FSH örneklerinde glikan yükü dağılımı bolluk (miktar) %'sini gösterir.

Şekil 6, 225IU Gonal f (alt satır, noktalı çizgi) ve 225 IU Buluşun Örneği (üst satır, satırın tamamı) uygulanmasını takiben inhibin-B konsantrasyonunun bir karşılaştırmasını gösterir.

Şekil 7, AMH seviyesi düşük tedavi grubundan (Örnek 10, 10A) toplanan oositler üzerinde vücut ağırlığının etkisini gösterir; ve

Şekil 8, AMH seviyesi yüksek tedavi grubundan toplanan oositler üzerinde vücut ağırlığının etkisini gösterir.

Dizi Seçimi

İnsana ait FSH

Fiddes ve Goodman'a (1981) göre FSH alfa polipeptit geninin kodlama bölgesi kullanılmıştır. Dizi AH007338 olarak depolanmıştır ve inşa sırasında bu protein dizisinin başka hiçbir varyantı mevcut değildir. Burada dizi DİZİ İD NO:1 olarak belirtilmiştir

Keene *ve diğerlerine* (1989) göre FSH beta polipeptit geninin kodlama bölgesi kullanılmıştır. Dizi NM_000510 olarak depolanmıştır ve inşa sırasında bu protein dizisinin başka hiçbir varyantı mevcut değildir. Burada dizi DİZİ İD NO:2 olarak belirtilmiştir.

Sialil transferaz

α2,3-Sialil transferaz - Kitagawa ve Paulson'a (1994) göre beta-galaktosamid alfa-2,3-sialil transferaz 4 (α2,3-sialil transferaz, ST3GAL4) geninin kodlama bölgesi kullanılmıştır. Dizi, L23767 olarak depolanmıştır ve burada DİZİ İD NO: 3 olarak belirtilmiştir.

α2,6-Sialil transferaz - Grundmann *ve diğerleri*'ne (1990) göre beta- galaktosamid alfa-2,6-sialil transferaz 4 (α2,6-sialil transferaz, ST6GAL1) geninin kodlama bölgesi kullanılmıştır. Dizi, NM_003032 olarak depolanmıştır ve burada DİZİ İD NO: 4 olarak belirtilmiştir.

ÖRNEKLER

Örnek 1- FSH ekspresyon vektörünün inşası

FSH alfa polipeptit (AH007338, DİZİ İD NO: 1) ve FSH beta polipeptit'in (NM_003032, DİZİ İD NO: 2) kodlama dizisi, sırasıyla FSHa-fw ile FSHa-rev ve FSHb-fw ile FSHb-rec primer kombinasyonları kullanılarak PCR ile güçlendirilmiştir.

FSHa-fw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGGATTACTACAGAAAAATATGC-3' (DİZİ İD NO:9)

FSHa-rev 5'-GGATGGCTAGCTTAAGATTTGTGATAATAAC-3' (DİZİ İD NO:10)

FSHb-fw 5'-CCAGGCGCGCCACCATGAAGACACTCCAGTTTTTC-3' (DİZİ İD NO: 11)

FSHb-rev 5'-CCGGGTTAACTTATTATTCTTTCATTTCACCAAAGG-3' (DİZİ İD NO: 12)

Sonuçta oluşan güçlendirilmiş FSH beta DNA, kısıtlama enzimleri *Asc*I ve *Hpa*I ile parçalanmış ve bir neomisin seçim markörü taşıyan CMV'den elde edilen memeliye ait ekspresyon vektörü üzerindeki *Asc*I ve *Hpa*I bölgelerine yerleştirilmiştir. Benzer şekilde FSH alfa DNA, *Bam*HI ve *Nhe*I ile parçalanmış ve halihazırda FSH beta polipeptit DNA içeren ekspresyon vektörü üzerindeki *Bam*HI ve *Nhe*I bölgelerine yerleştirilmiştir.

Vektör DNA, *E.coli*'nin DH5α suşunun dönüştürülmesinde kullanılmıştır. Güçlendirme için koloniler toplanmıştır. Hem FSH alfa hem beta içeren vektör ihtiva eden koloniler dizilim için seçilmiştir ve hepsi de DİZİ İD NO: 1 ve DİZİ İD NO: 2'ye göre doğru dizileri içerir. Transfeksiyon için Plazmid pFSH A+B#17 seçilmiştir (Şekil 1).

Örnek 2- ST3 ekspresyon vektörünün inşası

Beta-galaktosid alfa-2,3-sialil transferaz 4'ün (ST3, L23767, DİZİ İD NO: 3) kodlama dizisi, primer kombinasyon 2,3STfw ve 2,3STrev kullanılarak PCR ile güçlendirilmiştir.

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3' (DİZİ İD NO: 13)

2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3' (DİZİ İD NO: 14)

Sonuçta oluşan güçlendirilmiş ST3 DNA, kısıtlama enzimleri *Bam*HI ve *Afl*II ile parçalanmış ve bir higromisin direnç markörü taşıyan CMV'den elde edilen memeliye ait ekspresyon vektörü üzerindeki *Bam*HI ve *Afl*II bölgelerine yerleştirilmiştir. Vektör daha önce açıklandığı şekilde güçlendirilmiş ve dizilmiştir. Klon pST3#1 (Şekil 2), DİZİ İD NO: 3'e göre doğru diziyi içermiş ve transfeksiyon için seçilmiştir.

Örnek 3 - ST6 ekspresyon vektörünün inşası

Beta-galaktosamid alfa-2,6-sialil transferaz 1'in (ST6, NM_003032, DİZİ İD NO: 4) kodlama dizisi, primer kombinasyon 22,6STfw ve 2,6STrev kullanılarak PCR ile güçlendirilmiştir.

2,6STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3' (DİZİ İD NO: 15)

2,6STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3' (DİZİ İD NO: 16)

Sonuçta oluşan güçlendirilmiş ST6 DNA, kısıtlama enzimleri *Bam*HI ve *Afl*II ile parçalanmış

ve bir higromisin direnç markörü taşıyan CMV'den elde edilen memeliye ait ekspresyon vektörü üzerindeki *Bam*HI ve *Afl*II bölgelerine yerleştirilmiştir. Vektör daha önce açıklandığı şekilde güçlendirilmiş ve dizilmiştir. Klon pST36#11 (Şekil 3), DİZİ İD NO: 4'e göre doğru diziyi içermiş ve transfeksiyon için seçilmiştir.

Örnek 4- PER.C6® hücrelerindeki pFSH α+β'nın stabil ekspresyonu. Klonların transfeksiyonu, izolasyonu ve taranması.

FSH üreten PER.C6® klonları, tek bir plazmidden FSH'nin her iki polipeptit zincirinin eksprese edilmesiyle oluşturulmuştur (bakınız Örnek 1).

Stabil klonların elde edilmesi için pFSH α+β yapısına sahip bir lipozom bazlı transfeksiyon maddesi kullanılmıştır. Stabil klonlar, %10 FCS ile takviye edilmiş ve G418 içeren VPRO'dan seçilmiştir. Transfeksiyondan üç hafta sonra G418 dirençli klonlar büyümüştür. Klonlar izolasyon için seçilmiştir. İzole edilmiş klonlar, %70-%80 birleşene kadar seleksiyon ortamında kültürlenmiştir. Suyun üzerinde yüzen kısım (süpernatantlar) bir FSH selektif ELİZA kullanılarak FSH protein içeriği açısından ve bir cAMP akümülasyon testi kullanılarak klonlanmış hücre çizgisinde FSH reseptöründeki farmakolojik etkinlik açısından değerlendirilmiştir. İşlevsel proteini eksprese eden klonlar kültürün yayılması için 24 yuvaya, 6 yuva ve T80 küçük deney tübüne dağıtılmıştır.

Yedi klondan verimliliğin ve kalitenin belirlenmesi çalışmaları, yeterli materyalin oluşturulması için T80 deney tüplerinde başlatılmıştır. Hücreler daha önce açıklandığı gibi takviye edilmiş ortamda 7 gün kültürlenmiş ve suyun üstünde yüzen kısım toplanmıştır. Verimlilik FSH selektif ELİZA kullanılarak belirlenmiştir. Materyalin izoelektrik profili teknikte bilinen usullerle, izolektrik odaklamayla (IEF) belirlenmiştir. Yeterli verimlilik ve kalitedeki klonlar sialil transferaz mühendisliği için seçilmiştir.

Örnek 5 -α2,3-sialil transferazı aşırı eksprese eden hücrelerde sialilasyon seviyesi artar. PER.C6® hücrelerini eksprese eden FSH'de pST3'ün stabil ekspresyonu. Klonların transfeksiyonu, izolasyonu ve taranması.

Yüksek derecede sialillenmiş FSH üreten PER.C6® klonları, halihazırda (Örnek 4'den) FSH'nin her iki polipeptit zincirini eksprese eden PER.C6® hücrelerinde ayrı ayrı plazmidlerden α2,3 sialil transferazın eksprese edilmesiyle oluşturulmuştur (Örnek 2). Örnek 4'de gösterildiği gibi PER.C6® hücrelerinden üretilen klonlar verimlilik, iyi büyüme profili, işlevsel protein üretimi ve bir miktar sialilasyon içeren üretilmiş FSH dahil, özelliklerine göre seçilmiştir. Stabil klonlar daha önce Örnek 4'de açıklandığı şekilde oluşturulmuştur. Klonlar

izole edilmiş, yayılmış ve değerlendirilmiştir. α2,3-sialil transferaz klonları, serum içermeyen ortam ve süspansiyon koşullarına adapte edilmiştir.

Daha önce olduğu gibi klonlar, bir FSH selektif ELİZA, bir FSH reseptör hücre çizgisinde işlevsel tepki, IEF, metabolik klirens oranı ve Steelman Pohley analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar piyasada mevcut bir rekombinant FSH (Gonal-f, Serono) ve parental FSH PER.C6® hücre çizgileriyle karşılaştırılmıştır. Klonların büyük bir kısmıyla üretilen FSH, α2,3- sialil transferaz olmadan eksprese edilen FSH'ye nazaran önemli derecede artmış sialilasyona sahiptir (yani daha yüksek sayıda sialik asitle ortalama daha fazla FSH izoformu). Sonuç olarak, PER.C6® hücrelerinde sialil transferaz ile birlikte FSH ekspresyonu, yalnızca FSH eksprese eden hücrelere nazaran sialillenmiş FSH seviyesini arttırmıştır.

Örnek 6- Üretim ve saflaştırmanın gözden geçirilmesi

Serum içermeyen ortamda süspansiyon içinde kültürlenmiş PER.C6® hücrelerinde FSH üretilmesi için bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntem aşağıda açıklanmıştır ve birkaç FSH üreten PER.C6® hücre çizgisine uygulanmıştır.

Lowry *ve diğerleri* (1976) tarafından açıklanan usulün bir modifikasyonu kullanılarak α2,3-klonundan (Örnek 5) FSH hazırlanmıştır.

PER.C6®FSH'nin üretilmesi için hücre çizgileri serum içermeyen bir ortama, yani Excell 525'e (JRH Biosciences) adepte edilmiştir. Hücreler ilk önce, bir T80 kültür tüpü içinde %70-%90'lık bir birleşmiş tek sınıf oluşturulması için kültürlenmiştir. Geçiş sırasında hücreler serum içermeyen ortam, Excell 525 + 4 mM L-Glutamin içinde, $0.3x10^6$hücre/ml'lik bir hücre yoğunluğa gelecek şekilde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Hücre süspansiyonunun 25 ml'si bir 250 ml'lik çalkalama tüpü içine konmuş ve 37°C'da, %5 CO_2'de 100 devir/dakikada çalkalanmıştır. > $1x10^6$ hücre/ml'lik bir hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra hücreler 0.2 veya $0.3x10^6$ hücre/ml'lik bir hücre yoğunluğuna alt-kültürlenmiş ve 37°C'da, %5 CO_2'de 100 devir/dakikada çalkalama tüpleri içinde daha ileri kültürlemeye tabi tutulmuştur.

FSH üretimi için hücreler, PER.C6® hücrelerinin çok yüksek hücre yoğunluklarına (çoğunlukla bir batch-harman- kültür içinde > 10^7hücre/ml) büyümesini destekleyen bir serum içermeyen üretim ortamına, yani VPRO'ya (JRH Biosciences) aktarılmıştır. Hücreler ilk önce Excell 525 içinde > $1x10^6$ hücre/ml'ye kültürlenmiş, daha sonra 5 dakika 1000 devir/dakikada hızı yavaşlatılarak döndürülmüş ve akabinde VPRO ortamı + 6 mM L-glutamin içinde

$1x10^6$ hücre/ml'lik bir yoğunluğa gelecek şekilde süspansiyon haline getirilmiştir. Daha sonra kültürler bir çalkalama tüpü içinde 37°C'da, %5 CO_2'de ve 100 devir/dakikada 7-10 gün kültürlenmiştir. Bu süre boyunca hücreler > 10^7 hücre/ml'lik bir yoğunluğa büyümüşlerdir. Hücre yaşayabilirliği düşmeye başladıktan sonra kültür ortamı toplanmıştır. Hücreler 5 dakika 1000 devir/dakikada döndürülmüş ve suyun üstünde yüzen kısım FSH'nin miktarının belirlenmesi ve saflaştırılmasında kullanılmıştır. FSH konsantrasyonu ELİZA (DRG EIA 1288) kullanılarak belirlenmiştir.

Daha sonra, Lowry *ve diğerleri,* (1976) tarafından açıklanan usulün bir modifikasyonu kullanılarak FSH'nin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Yük (şarj) selektif kromatografi kullanılarak saflaştırma, teknikte iyi bilinen usullerle yüksek derecede sialillenmiş formların zenginleştirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Tüm kromatografik işlemler sırasında FSH'nin sialillenmiş formlarının zenginleştirilmesi RIA (DRG EIA 1288) ve/veya IEF ile doğrulanmıştır.

Örnek 7 - α2,3 ve α2,6 sialik asitin nispi miktarlarının belirlenmesi

Saflaştırılmış rFSH üzerinde (Örnek 6) α2,3 ve α2,6 sialik asitin nispi miktar yüzdeleri bilinen teknikler kullanılarak ölçülmüştür.

N-Glikanlar, denşirme koşulları altında PNGase F kullanılarak numunelerden serbest bırakılmıştır ve daha sonra 2-aminobenzamit ile etiketlenmiştir. Daha sonra serbest bırakılmış glikan formları ayrılmış ve yük dağılımının belirlenmesi için Zayıf Anyon Değişim (WAX) kolonuyla incelenmiştir. Toplam sialik asidin belirlenmesi için 2,3,6,8 sialidaz ile işlemden geçmiş ve 2,3 sialik asidin belirlenmesi için 2,3 sialidaz ile işlemden geçmiş etiketlenmiş glikanlar wax kolonuyla daha ileri analize tabi tutulmuştur.

Yüklü glikanların nispi yüzdeleri, parçalanmamış ve parçalanmış glikan havuzlarında mevcut yapılardan hesaplanmış ve Şekil 4'de gösterilmiştir (8 numune için). Bunların, α2,3 sialilasyon için %50-%70 (örneğin yaklaşık %60 veya %65) ve α2,6 sialilasyon için %28 ila %50, genellikle %30 ila %35 aralığında (ör. yaklaşık %31 veya %35) olduğu bulunmuştur.

Örnek 8- Mono, di, tri ve tetra sialillenmiş glikan yapıların nispi miktarlarının belirlenmesi

Saflaştırılmış rFSH'den (Örnek 6) özütlenmiş glikanlar üzerindeki mono, di, tri ve tetra sialillenmiş yapıların nispi miktar yüzdesi bilinen teknikler kullanılarak ölçülmüştür.

N-Glikanlar, denşirme koşulları altında PNGase F kullanılarak numunelerden serbest

bırakılmıştır ve daha sonra 2-aminobenzamit ile etiketlenmiştir. Glikanlar, denşirme koşulları altında PNGase F kullanılarak numunelerden serbest bırakılmıştır ve daha sonra 2-aminobenzamit ile etiketlenmiştir. Daha sonra serbest bırakılmış glikan formları ayrılmış ve sialilasyon dağılımının belirlenmesi için Zayıf Anyon Değişim (WAX) kolonuyla incelenmiştir. Nötr, mono-sialillenmiş, di-sialillenmiş, tri-sialillenmiş ve tetra-sialillenmiş yapıların nispi miktarları Şekil 5'de gösterilmiştir (8 numune için Şek. 4'de gösterilmiştir).

rFSH, aşağıdaki nispi miktarlarda nötr, mono-sialillenmiş, di- sialillenmiş, tri- sialillenmiş ve tetra-sialillenmiş glikan yapılar içerir: nötr %5-%6; %15-%17 mono-sialillenmiş; %26-%30 di--sialillenmiş; %30-%32 tri--sialillenmiş ve %17-%23 tetra-sialillenmiş.

Örnek 8a

Saflaştırılmış rFSH'nin dokuz numunesinden (Örnek 6'nın usulleriyle üretilen) özütlenen, saflaştırılmış rFSH üzerindeki α2,6 sialik asitin nispi miktar yüzdesi bilinen teknikler kullanılarak ölçülmüştür.

N-Glikanlar, denşirme koşulları altında PNGase F kullanılarak numunelerden serbest bırakılmıştır ve daha sonra 2-aminobenzamit ile etiketlenmiştir. Daha sonra serbest bırakılmış glikan formları ayrılmış ve yük dağılımının belirlenmesi için Zayıf Anyon Değişim (WAX) kolonuyla incelenmiştir. Toplam sialik asidin belirlenmesi için 2,3,6,8 sialidaz ile işlemden geçmiş ve 2,3 sialik asidin belirlenmesi için 2,3 sialidaz ile işlemden geçmiş etiketlenmiş glikanlar wax kolonuyla daha ileri analize tabi tutulmuştur (bakınız Örnek 8). Analiz, α2,6 sialik asidin hesaplanmasına olanak sağlamıştır.

Yüklü glikanların nispi yüzdeleri, parçalanmamış ve parçalanmış glikan havuzlarında mevcut yapılardan hesaplanmış ve aşağıdaki Tabloda gösterilmiştir. Bunların, α2,6 sialilasyon için %25 ila %50, genellikle %30 ila %35 aralığında olduğu bulunmuştur.

Saflaştırılmış rFSH'nin dokuz numunesinden (Örnek 6'nın usulleriyle üretilen) özütlenen, glikanlar üzerindeki ikiye ayırıcı (açıortay) GlcNac, GalNac ve 1-Fucoz Lewis'in nispi miktarlarının yüzdeleri bilinen teknikler kullanılarak ölçülmüştür. N-Glikanlar, PNGase F kullanılarak glikoproteinden serbest bırakılmıştır ve daha sonra 2-aminobenzamid (2AB) ile etiketlenmiştir. Analiz, glikanların enzimatik degredasyonuyla kombinasyon halinde iki boyutlu (2D) HPLC analiziyle gerçekleştirilmiştir. Doğrulama için glikanlar MALDI-MS ile incelenmiştir. Alfa 2,6-sialik asit ve terminal kalıntıların nispi miktarları, Gonal F (CHO hücresinden elde edilen rekombinant FSH) ve Bravelle (insan idrarından elde edilen FSH) için nispi miktarlarla birlikte aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Numune	Ref. O	Ref N	I-1	I-2	I-3	II	II	III-1	III-2	Ortl yaş	Gona I F	Bravelle
	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si	bolluk %'si
2,6 sialik asit	27.7	34.9	26.2	30.1	31.1	28.3	30.4	35	33	30.7	0	55.4
1GalNAc	51	44.6	50.7	44.7	49	47.6	45.3	46.4	44.9	47.1	0	11.3
İkiye ayırıcı g GlcNAc	10	12.4	10.2	8.9	8.7	11.8	11.4	10.6	13.9	10.9	55	14
1 Fukoz Lewis	21.1	16.7	23.3	16.1	20.3	18.1	17.9	18.7	19.0	19.0	3.1[1]	2.2
2 Fukoz Lewis	4	4.1	4.3	1.9	3.1	4.2	3.8	3.9	4.4	3.7	-	n.d.[2]

[1] 3.1 değeri toplam ½ Fukoz Lewis tir. [2] Belirlenmemiş

Buluşun FSH'sında GalNAc miktarının yaklaşık %44.9 ile %51 arasında farklılık gösterdiği, ortalama yaklaşık %47.1 olduğu görülebilir.

Buluşun FSH'sında ikiye ayrıcı GlcNAc miktarının yaklaşık %8.7 ile %13.9 arasında farklılık gösterdiği, ortalama yaklaşık %10.9 olduğu görülebilir.

Buluşun FSH'sında 1 Fukoz Lewis miktarının yaklaşık %16.1 ile %23.3 arasında farklılık gösterdiği, ortalama yaklaşık %19 olduğu görülebilir.

Buluşun FSH'sında 2 Fukoz Lewis miktarının yaklaşık %1.9 ile %4.4 arasında farklılık gösterdiği, ortalama yaklaşık %3.7 olduğu görülebilir.

Örnek 9 - GONAL-F'e kıyasla FE 999049'da güvenirlik, tolere edilebilirlik, farmakokinetikler, farmakodinamikler ve bağışıklık sağlayıcılığı araştıran bir çoklu doz çalışması

Çalışma popülasyonu

Toplam 48 (her bir ilaç için 24) sağlıklı kadına yedi gün, günlük dozlarda 14.6 µg FE 999049 (buluşa göre bir bileşim, Örnek 6'ya göre üretilmiştir) veya 16.5 µg Gonal-F uygulanmıştır

Güvenirlik sonuçları

FE 999049 ve GONAL-F'in çoklu doz uygulaması, Olumsuz Vakalar (AE'ler), yaşamsal bulgular, ECG, klinik laboratuvar ölçümleri ve fiziksel muayene ile değerlendirildiği üzere güvenilirdir ve genellikle iyi tolere edilmiştir. Çalışma sırasında olumsuz bir durum evya ölüm meydana gelmemiştir.

Farmakokinetik sonuçlar

7 günlük FE 999049 ve GONAL-F uygulamasını takiben FSH konsantrasyon değerleri, bir sonraki enjeksiyondan hemen önce değerlendirildiği üzere artmış ve 6-7 günden sonra istikrarlı durum seviyesine erişir görünmüştür. Ancak bu, FE 999049'a maruz bırakmada (AUC ve Cmax), Gonal-F'e kıyasla %60 daha yüksektir.

Farmakodinamik sonuçlar

İnhibin-B (bakınız şekil 6), östradiol ve progesteronun tümünün konsantrasyonları FE 999049 ve GONAL-F'in uygulanmasını takiben artmıştır, ancak daha büyük boyutta GONAL-F'e nazaran FE 999049'un uygulanmasını takiben artmıştır. Foliküllerin hem sayısı hem boyut dağılımı GONAL F'e nazaran FE 999049'a daha fazla tepki ortaya koymuştur.

Örnek 9'da spesifik bir miktarda (%17-%23) tetra-sialillenmiş glikan yapılara ve örneğin spesifik miktarlarda α2,3 sialilasyon ve α2,6 sialilasyona sahip FSH'nın, halihazırda piyasada mevcut rekombinant FSH ürünlerinden önemli derecede daha etkili olduğu ortaya konmuştur.

Örnek 10 - GONAL F'yle karşılaştırmalı olarak FE 999049'u araştıran bir çoklu doz çalışması

Aşağıdaki örnekte, in vitro fertilizasyon (IVF)/intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için kontrollü over stimülasyonuna tabi tutulan hastalarda FE 999049'un doz-tepki ilişkisini değerlendiren randomize, kontrollü, kör değerlendirmeli, parallel gruplu, çok uluslu, çok merkezli bir çalışma açıklanmıştır. Hasta popülasyonu 18 ile 37 yaş arası, 18.5 ila 32.0 kg/m^2 BMI'lı 265 IVF hastasıdır. Çalışma, primer sonlanım noktası olarak toplanan oositlerin sayısı ile bir doz-tepki çalışması olarak tasarlanmıştır. İkincil sonlanım noktaları, endokrin profili, folikül gelişimi, oosit fertilizasyonu, embriyo kalitesi ve tedavinin etkinliği (yani toplam gonadotropin tüketimi ve stimülasyon süresi) bakımından FE 999049'un farklı dozlarının niteliksel ve nicel etkisini araştıracaktır. Çalışma, FE 999049'un, IVF/ICSI döngülerinde

kontrollü over stimülasyonunda kullanılmasının hamilelik oluşturmadaki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla tasarlanmıştır.

Denekler, uygunluk açısından randomizasyondan önce 3 ay içinde, over tepkisiyle ilgili olarak çalışma popülasyonunun homojenliğinin arttırılması ve çalışma sırasında kullanılan FE 999049 dozlarına ve GONAL-F dozuna potansiyel zayıf ve hiper tepki verenlerin sayısının en aza indirgenmesi için bir antimülleryan hormon (AMH) değerlendirmesi dahil olmak üzere dahil edilme kriterleri ve dışlama kriterleri ile değerlendirilmiştir. AMH değerlendirmesi AMH Gen-II enzimine bağlı bağışıklık test kiti (Beckman Coulter, Inc., Webster, Teksas) kullanılarak ölçülmüştür. Bu test, 1.1 pmol/L'lik bir asgari miktar sınırıyla 0.57 pmol/L'den daha büyük AMH konsantrasyonlarını saptayabilir.

Adet döngüsünün 2-3üncü günü denekler, ya 90 IU, 120 IU, 150 IU, 180 IU veya 210 IU FE 999049 ya da 150 IU GONAL-F ile tedavi edilmek üzere 1:1:1:1:1:1 tarzında randomize edilmiş ve over stimülasyonu başlatılmıştır. Randomizasyon, taramada AMH seviyesine göre sınıflandırılmıştır [5.0-14.9 pmol/L (düşük AMH) ve 15.0 ila 44.9 pmol/L (yüksek AMH)].

Gonal F, FDA talebi doğrultusunda kütleye göre (FbM) doldurulur; bu nedenle µg doza atıfta bulunmak doğrudur. Gonal-F etiketi 600 IU/44 µg'ye işaret eder, bu da 150 IU'nun 11 µg olduğunu belirtir. Ancak, bu çalışmada 11.3 µg Gonal-F'in 150 IU'ta eşit olduğunu gösteren bazı varyasyonlar ve batch (seri) sertifikası mevcuttur. FE999049 dozları biyolojik aktivitiden ziyade protein içeriğiyle (µg) sunulur. Dolayısıyla FE999049 dozları 5.2µg (90 IU), 6.9µg (120 IU), 8.6µg (150 IU), 10.3µg (180 IU) veya 12.1µg'dir (210 IU).

Denek ve doz dağılımı aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (veriler, denek sayısıdır):

Tablo 1

	FE 999049					GONAL-F	
	5.2µg	6.9µg	8.6µg	10.3µg	12.1µg	11.3 (11) µg	Toplam
Taranmış							334
Randomize edilmiş ve maruz bırakılmış	42	45	44	45	46	43	265

AMH seviyesi yüksek sınıf (15.0 - 44.9 pmol/L)	23	26	24	24	26	25	148 (%56)
AMH seviyesi düşük sınıf (5.0-14.9 pmol/L)	19	19	20	20	21	18	117 (%44)
Ön-protokol	40	42	42	44	44	43	255

FE 999049 veya GONAL-F'in günlük doz seviyesi tüm stimülasyon süresi boyunca sabittir. Stimülasyon sırasında denekler stimülasyonun 1, 4 ve 6ncı günü ve bundan sonra en azından her iki günde bir monitörde izlenmiştir. ≥15 mm'lik 3 folikül gözlemlendiğinde izleme hergün gerçekleştirilmiştir. Denekler azami 16 gün FE 999049 veya GONAL-F ile işleme tabi tutulmuştur.

Prematüre LH artışının önlenmesi için bir GnRH antagonisti (ganireliks asetat, ORGALUTRAN, MSD /Schering-Plough) 0.25 mg'lık bir günlük dozda, stimülasyonun 6ncı günü başlatılabilir ve stimülasyon süresi boyunca devam ettirilir. Nihai foliküler olgunlaşmanın tetiklenmesi ≥17 mm'lik bir çapa sahip ≥3 folikül gözlemlendiği gün gerçekleştirilir. Eğer ≥12 mm'lik bir çapa sahip <25 folikül varsa 250 µg rekombinant hCG (koriogonadotropin alfa, OVITRELLE, Merck Serono/EMD Serono) uygulanır. Eğer ≥12 mm'lik bir çapa sahip 25-35 folikül varsa 0.2 mg GnRH agonisti (triptorelin asetat, DECAPEPTYL/GONAPEPTYL, Ferring Pharmaceuticals) uygulanır. ≥12 mm'lik bir çapa sahip >35 foliküle tanımlanan aşırı over tepkisi durumunda tedavi iptal edilir. Stimülasyonun 10uncu günü gözlemlenen, ≥10 mm'lik çapa sahip <3 foliküle tanımlanan zayıf over tepkisi durumunda döngü iptal edilebilir.

Oosit toplanması nihai foliküler olgunlaşmanın tetiklenmesinden 36 saat (± 2saat) sonra gerçekleştirilir ve oosit IVF ve/veya ICSI ile inseminasyona tabi tutulur. Fertilizasyon ve embriyo gelişimi, oositin toplanmasından transfer gününe kadar değerlendirilir. Nihai foliküler olgunlaşmanın hCG ile tetiklendiği denekler için mevcut en iyi kalitede blastosist, oosit toplanmasından sonraki 5inci gün transfer edilir, bu esnada geriye kalan blastosistler dondurulur. Nihai foliküler olgunlaşmanın GnRH agonisti ile tetiklendiği denekler için taze döngüde embriyo transferi gerçekleştirilmez ve bunun yerine blastosistler 5inci gün dondurulur. Oosit toplanmasından sonraki günden itibaren klinik hamilelik vizitine kadar luteal fazın desteklenmesini için günde 3 kez vajinal progesteron tabletleri (LUTINUS,

Ferring Pharmaceuticals) 100 mg verilir. Embriyo transferinden 13-15 gün sonra bir βhCG testi gerçekleştirilir ve klinik hamilelik embriyo transferinden 5-6 hafta sonra transvajinal ultrason (TVU) ile doğrulanacaktır.

Sonuçlar

Toplanan oosit sayısı (primer sonlanım noktası) aşağıdaki Tabloda gösterilmiştir.

Tablo 2

	FE 999049					GONAL-F
	5.2 µg	6.9 µg	8.6 µg	10.3 µg	12.1 µg	11.3 (11)µg
Toplanan oositler						
Tümü	5.2 (3.3)	7.9 (5.9)	9.2 (4.6)	10.6 (7.0)	12.2 (5.9)	10.4 (5.2)
Yüksek AMH	5.9 (3.9)	9.1 (6.4)	10.6 (4.8)	13.6 (7.8)	14.4 (5.8)	12.4 (5.4)
Düşük AMH	4.5 (2.2)	6.3 (4.9)	7.4 (3.8)	6.9 (3.6)	9.4 (4.9)	7.8 (3.4)

Veriler, ortalamadır (SD)

Ana amaca ulaşılmıştır: toplanan oosit sayısıyla ilişkili olarak FE 999049 için belirli bir doz-tepki ilişkisi kurulmuştur. Bu bulgu yalnızca genel çalışma popülasyonu için değil, aynı zamanda randomizasyonda kullanılan iki AMH sınıfından her biri için de gözlemlenmiştir.

FE 999049 için belirli bir doz-tepki, ör. estradiol, inhibin B ve inhibin A gibi tüm amaçlanan kilit farmakodinamik parametreler için de ispat edilmiştir. Benzer bir mikrogram doz seviyesinde FE 999049 ile farmakodinamik tepkilar GONAL-F ile olandan (bu sonuçlar gösterilmemiştir) çok daha büyük olmuştur.

FE 999049'a maruz bırakıldıktan sonra serum FSH konsantrasyonları GONAL-F'den önemli derecede daha yüksek idi. Sonuçlar, FE 999049'un PK profilinin GONAL F'inkinden farklı olduğunu doğrular. FE 999049 ile tedavi edilmiş IVF/ICSI hastalarında fertilizasyon oranları, blastosist gelişimi ve hamilelik oranları beklentiler dahilinde olmuştur.

FE 999049'un kullanımıyla ilgili güvenlik kaygısı olmamıştır. İyi bir lokal tolere edilebilirlik belgelenmiştir

Daha ileri analiz

Müracaat sahipleri, toplanan oosit sayısıyla ilişkili olarak aşağıdaki kriterleri karşılayan FE 999049 dozunun(dozlarının) tanımlanması için verileri daha ileri analize tabi tutmuştur:

- 8-14 aralığında toplanan oosit
- <8 oositli hastaların en küçük oranı
- ≥20 oositli hastaların en küçük oranı

Müracaat sahipleri ayrıca vücut ağırlığının etkisini araştırmıştır. İlişkili olduğu durumda doz bir ortalama denek için µg/kg'a çevrilmiştir. Bu µg/kg ve ±0.01 µg/kg değerleri, toplanan oositlerin dağılımı, bunun yanı sıra güvenlik profiliyle ilişkili olarak bir modelde değerlendirilmiş ve optimal doz tanımlanmıştır.

AMH seviyesi düşük sınıf

Tablo 2'den görüldüğü üzere, ilk kriteri karşılayan (8-14 aralığında toplanan oositler) FE999049 dozu 12.1 µg (ortalama 9.4 toplanan oosit) olmuştur. Oositlerin dağılımı aşağıda Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3

	FE 999049					GONAL-F
	5.2µg	6.9µg	8.6µg	10.3µg	12.1µg	11.3(11)µg
Toplanan oosit						
<4	%32	%24	%15	%10	%10	%6
4-7	%63	%42	%45	%60	%20	%56
8-14	%5	%24	%35	%30	%60 ⟷	%33
15-19	%0	%5	%5	%0	%5	%6
≥20	%0	%5	%0	%0	%5	%0

Veriler, deneklerin %'sidir

Kutu ve okla gösterildiği gibi, 12.1 µg'lik bir FE999049 dozu, AMH seviyesi düşük gruptaki hastaların %60'ında istenilen en çok sayıda oositlerin toplanmasını sağlar. Bu, Gonal F'e göre (deneklerin yalnızca %33'ünde istenilen en çok sayıda oosit) dikkate değer bir gelişmedir.

Tablo 4'de AMH seviyesi düşük sınıfta aşırı tepki emarelerinin analizi gösterilmektedir (veriler deneklerin sayısıdır). Görüldüğü gibi ılımlı veya şiddetli yapıda erken OHSS'in göstergesi mevcut değildir ve önleyici faaliyetin gerekli olduğu vakalar da olmamıştır; AMH seviyesinin düşük olduğu bir hastada 12.1 µg'lık FE999049 dozu ile ilişkili kaygı uyandıracak bir durum olmamıştır.

Tablo 4

	FE 999049					GONAL-F
	5.2µg	6.9µg	8.6µg	10.3µg	12.1µg	11.3(11)µg
Tüm denekler	19	19	20	20	21	18
Erken OHSS, ılımlı/şiddetli	0	0	0	0	0	0
GnRH agonist tetikleyici	0	0	0	0	0	0
Önleyici faaliyet*	0	0	0	0	0	0
≥ 15 oosit	0	2	1	0	2	1
Yukarıdakilerden herhangi biri	**0**	**2**	**1**	**0**	**2**	**1**

Şekil 7'de çeşitli dozlar için, toplanan oositler (AMH seviyesinin düşük olduğu sınıftan) üzerinde vücut ağırlığının etkisi gösterilmiştir. Oklar, 12.1 µg dozla tedavi edilmiş, 45kg ile 90 kg arasında vücut ağırlığına sahip deneklerden toplanan oositlerin sayısına işaret eder. Görüldüğü üzere (metin kutucuğu), 45 kg'lık vücut ağırlığı olan hastalarla 90kg vücut ağırlığı olan hastalar arasındaki farklılık yaklaşık 0.5 oositten azdır; diğer bir deyişle FE999049 dozu en az 12 µg olduğunda, AMH seviyesi düşük hastalarda vücut ağırlığına göre dozlama gerekli değildir, zira bu dozda vücut ağırlığına göre toplanan oositlerde belirgin bir farklılık yoktur.

Dolayısıyla müracaat sahipleri 6 ila 18 µg, örneğin 9 ila 14 µg, örneğin 12 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik bir dozun veya buna eşdeğer bir dozun serum AMH'sı <15 pmol/L, örneğin 0.05-14.9 pmol/L ,örneğin 5.0-14.9 pmol/L olan bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya uygun olduğunu bulmuşlardır. Doz, OHSS riskini en aza indirgerken etkin bir tepki de sağlar.

AMH seviyesi yüksek sınıf

Tablo 2'den görüldüğü üzere, FE999049'un üç dozu ilk kriteri (8-14 aralığında toplanan oositler) karşılamıştır: 6.9 µg (ortalama 9.1 toplanan oosit), 8.6 µg (ortalama 10.6 toplanan oosit) ve 10.3 µg (ortalama 13.6 toplanan oosit).

Şekil 8'de çeşitli dozlar için, toplanan oositler (AMH seviyesinin yüksek olduğu sınıftan) üzerinde vücut ağırlığının etkisi gösterilmiştir. Oklar, 6.9 µg, 8.6 µg ve 10.3 µg'lik dozlarla tedavi edilmiş, 45kg ile 90 kg arasında vücut ağırlığına sahip deneklerden toplanan oositlerin sayısına işaret eder. Görüldüğü üzere (metin kutucuğu) farklılık belirgindir: 6.9 µg doz için 90 kg'lık bir hastaya kıyasla 45 kg'lık bir hastadan fazladan 6 oosit toplanacaktır; 8.6 µg doz için 90 kg'lık bir hastaya kıyasla 45 kg'lık bir hastadan fazladan 4 oosit toplanacaktır ve 10.3 µg doz için 90 kg'lık bir hastaya kıyasla 45 kg'lık bir hastadan fazladan 2.5 oosit toplanacaktır. Diğer bir deyişle FE999049 dozu 12 µg'den az olduğunda, AMH seviyesi yüksek hastalarda vücut ağırlığına göre dozlamanın bir etkisi vardır, zira bu dozlarda vücut ağırlığına göre toplanan oositlerde belirgin bir farklılık mevcuttur.

Aşağıdaki Tablo 5a'da AMH'ye göre toplanan oositlerin (Tablo 2'den) bir ileri dağılımı gösterilmiştir. Bu, AMH'nın her bir sınıfı için ilk kriteri karşılayan (8-14 aralığında toplanan oositler) dozları göstermektedir (kutucuklar).

Tablo 5a

	FE 999049				
	5.2 µg	*6.9 µg*	*8.6 µg*	*10.3 µg*	*12.1 µg*
Toplanan oosit					
15-24 pmol/L	*4.9(3.8)*	*7.3(3.6)*	*10.6(5.1)*	*11.5(6.7)*	*12.3(5.9)*

	FE 999049				
	5.2 µg	*6.9 µg*	*8.6 µg*	*10.3 µg*	*12.1 µg*
25-34 pmol/L	*7.0(1.8)*	*9.1(6.8)*	*9.7(6.7)*	*15.5(6.4)*	*16.7(4.9)*
35-45 pmol/L	*8.5(9.2)*	*21.0(1.4)*	*11.3(2.6)*	*18.0 (12.2)*	*15.7(6.5)*

Aşağıdaki Tablo 5b'de, bu alt gruplar için ya aşırı tepkiye ya da agonist tetiklemesine bağlı olarak tedavinin iptal edildiği hastaların bir analizi gösterilmiştir. Örneğin 25-34 pmol/L AMH sınıfına dahil bir hastada tedavi 10.3 µg'lik dozu takiben aşırı tepkiye bağlı olarak iptal edilmiş, 25-34 pmol/L AMH sınıfına dahil bir hastada tedavi 12.1 µg'lik dozu takiben aşırı tepkiye bağlı olarak iptal edilmiştir; 35-45 pmol/L AMH sınıfına dahil bir hastada tedavi 10.3 µg'lik dozu takiben agonist tetiklemesine bağlı olarak iptal edilmiştir ve 35-45 pmol/L AMH sınıfına dahil bir hastada tedavi 6.9 µg'lik dozu takiben agonist tetiklemesine bağlı olarak iptal edilmiştir.

Tablo 5b

	FE 999049				
	5.2µg	6.9µg	8.6µg	10.3µg	12.1µg
aşırı tepkiye veya agonist tetiklemesine**** bağlı OHSS*** iptali					
15-24 pmol/L	0	0	0	0	0
25-34 pmol/L	0	0	0	1***	1***

FE 999049

	5.2µg	6.9µg	8.6µg	10.3µg	12.1µg
35-45 pmol/L	0	1****	0	1****	0

Bu nedenle, iptallerin en aza indirgenmesi ve oosit toplanmasının en yüksek seviyeye çıkarılması için yüksek AMH sınıfında vücut ağırlığına (Şekil 8) ve AMH seviyesine göre dozun ayarlanmasının yararlı olacağı görülebilir.

Müracaat sahipleri, aşağıda belirtilen dozların OHSS riskini azaltırken etkin bir tepki de sağlayacağını bulmuşlardır (kg hastanın vücut ağırlığının kg'ıdır).

Serum AMH	**doz**	**(Azami doz)**
< 15 pmol/L	12 µg	(12 µg)
15-24 pmol/L	0.14-0.19 µg/kg, örneğin 0.15-0.16 µg/kg, tercihen 0.15 µg/kg	(12 µg)
25-34 pmol/L	0.11-0.14 µg/kg; örneğin 0.12-0.13 µg/kg, tercihen 0.13 µg/kg	(12 µg)
≥ 35 pmol/L	0.10-0.11 µg/kg, tercihen 0.11 µg/kg	(12 µg)

Aşağıdakiler, vücut ağırlığına göre dozlama istenmediğinde uygundur.

Serum AMH	**doz**	**(Azami doz)**
< 15 pmol/L	12 µg	12 µg
15-24 pmol/L	9.3-10 µg	(12 µg)
25-34 pmol/L	7.3-8 µg	(12 µg)
≥ 35 pmol/L	6.3 - 7 µg	(12 µg)

Aşağıdakiler AMH'nın daha az kategorisi gerekli olduğunda uygundur.

4 AMH kategorileri		**3 AMH kategorileri**		**2 AMH kategorileri**		**Bir doz**	
AMH	Doz	AMH	Doz	AMH	Doz	AMH	Doz
<15	12 µg	<15	12 µg	<15	12 µg	-	0.16 µg/kg
15-24	0.15-0.16 µg/kg	15-24	0.15-0.16 µg/kg	≥15	0.14 µg/kg		
25-34	0.12-0.13 µg/kg	≥25	0.12 µg/kg				
≥ 35	0.10-0.11 µg/kg						

Aşağıdakiler, vücut ağırlığına göre dozlama istenmediğinde uygundur.

4 AMH kategorileri		**3 AMH kategorileri**		**2 AMH kategorileri**		**Bir doz**	
AMH	Doz	AMH	Doz	AMH	Doz	AMH	Doz
<15	12 µg	<15	12 µg	<15	12 µg	-	9.3 µg veya 10 µg
15-24	9.3-10 µg	15-24	9.3-10 µg	≥15	8.7 µg		
25-34	7.3-8 µg	≥25	7.3 µg				
≥35	6.3-7 µg						

Böylece müracaat sahipleri 9 ila 14 µg, örneğin 12 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik bir dozun veya buna eşdeğer dozun serum AMH'sı <15 pmol/L, örneğin 0.05-14.9 pmol/L ,örneğin 5.0-14.9 pmol/L olan bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya uygun olduğunu bulmuşlardır. Doz, OHSS riskini en aza indirgerken etkin bir tepki de sağlar.

Müracaat sahipleri, hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.09 ila 0.19 µg insandan elde

edilen rekombinant FSH'lik bir dozun (günlük doz) serum AMH seviyesi ≥15 pmol/L olan bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya uygun olduğunu bulmuşlardır. Müracaat sahipleri, hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.14 ila 0.19 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik (tercihen 0.15 ila 0.16 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik) bir dozun (günlük doz) serum AMH seviyesi 15 ila 24.9 pmol/L olan bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya uygun olduğunu bulmuşlardır. Müracaat sahipleri, hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.11 ila 0.14 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik (tercihen 0.12 ila 0.13 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik) bir dozun (günlük doz) serum AMH seviyesi 25 ila 34.9 pmol/L olan bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya uygun olduğunu bulmuşlardır. Müracaat sahipleri, hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.10 ila 0.11 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'lik bir dozun (günlük doz) serum AMH seviyesi ≥ 35 pmol/L olan bir hastada infertilite tedavisinde kullanılmaya uygun olduğunu bulmuşlardır.

Örnek 10 A - Bireyselleştirilmiş COS protokolü (düşük AMH)

Seçilen hastalar teknikte bilinen usullerle in vitro fertilizasyon (IVF) / intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için COS'a tabi tutulur. Ön-tedavi protokolü, hastanın serum AMH seviyesinin AMH Gen-II enzime bağlı bağışıklık testi (Beckman Coulter, Inc., Webster, Teksas) kullanılarak değerlendirilmesini/taranmasını içerir. Bu test, 1.1 pmol/L'lik asgari miktar tayini sınırıyla 0.57 pmol/L'den daha büyük AMH konsantrasyonlarını belirleyebilir. AMH daha başka test kitleri kullanılarak da (örneğin Roche çıkışlı) ölçülebilir.

COS protokolü, tarama sırasında AMH seviyesine göre FE 999049'un başlangıç dozunun uygulanmasından ayrı olarak ilerler. <14.9 pmol/L'lik bir AMH seviyesine sahip bir hastaya, Örnek 6'daki usule göre imal edilmiş yaklaşık 12 µg FE 999049, bir insandan elde edilen rekombinant FSH ürününün bir başlangıç günlük dozu uygulanacaktır. 15 ila 24.9 pmol/L'lik bir AMH seviyesine sahip bir hastaya, hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.15 ila 0.19 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'nın bir başlangıç günlük dozu uygulanacaktır. 25 ila 34.9 pmol/L'lik bir AMH seviyesine sahip bir hastaya, hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.11 ila 0.13 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'nın bir başlangıç günlük dozu uygulanacaktır. ≥ 35 pmol/L'lik bir AMH seviyesine sahip bir hastaya, hastanın vücut ağırlığının her bir kg'ı için 0.10 ila 0.11 µg insandan elde edilen rekombinant FSH'nın bir başlangıç günlük dozu uygulanacaktır.

Örnek 11 - Bireyselleştirilmiş COS protokolleri.

Bu protokoldeki dozlar Örnek 10A'dan daha az tercih edilir.

Seçilen hastalar teknikte bilinen usullerle in vitro fertilizasyon (IVF) / intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için COS'a tabi tutulur. Ön-tedavi protokolü, hastanın serum AMH seviyesinin AMH Gen-II enzime bağlı bağışıklık test kiti (Beckman Coulter, Inc., Webster, Teksas) kullanılarak değerlendirilmesini/taranmasını içerir. Bu test, 1.1 pmol/L'lik asgari miktar tayini sınırıyla 0.57 pmol/L'den daha büyük AMH konsantrasyonlarını belirleyebilir.

COS protokolü, aşağıdaki tabloyla uyumlu olarak tarama sırasında AMH seviyesine göre FE 999049'un başlangıç dozunun uygulanmasından ayrı olarak ilerler. Böylece, 5-14.8 pmol/L'lik bir AMH seviyesine sahip bir hastaya, Örnek 6'daki usule göre imal edilmiş yaklaşık 8-11 µg FE 999049, bir insandan elde edilen rekombinant FSH ürünü formunda 180 IU FSH uygulanacaktır. 30-44.9 pmol/L'lik bir AMH seviyesine sahip bir hastaya, Örnek 6'daki usule göre imal edilmiş yaklaşık 4-7 µg FE 999049, bir insandan elde edilen rekombinant FSH ürünü formunda 120 IU FSH uygulanacaktır. Eğer AMH seviyesi mevcut değilse hastaya Örnek 6'daki usule göre imal edilmiş yaklaşık 6-11 µg FE 999049, bir insandan elde edilen rekombinant FSH ürünü formunda 120-180 IU FSH uygulanacaktır.

AMH seviyesi	**Başlangıç Dozu FSH**	**µg olarak yaklaşık eşdeğer**
<5 pmol/l	210 IU	10-15 µg
5-14.9 pmol/l	180 IU	8-11 µg
>15-29.9 pmol/l	150 IU	6-9 µg
>30-44.9 pmol/l	120 IU	4-7 µg
>45 pmol/l	90 IU	2-5 µg
Mevcut değil	120-180 IU	6-11 µg

Referanslar

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

Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A ve 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.

Baenziger JU ve 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.

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

Damián-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sánchez-Hernández C, Timossi C ve Ulloa-Aguirre A. (1999). Oestrogens regulate pituitary alpha2,3-sialyl transferase messenger ribonucleic asit levels in the female rat. J Mol Endocrinol. 23(2), 153-165.

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

Dalpathado DS, Irungu J, Go EP, Butnev VY, Norton K, Bousfield GR ve Desaire H. (2006). Comparative glycomics of the glycoprotein follicle stimulating hormone: glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. Biochemistry. 45(28), 8665-8673. Kopya mevcut değil.

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

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

Flack, M.R., Bennet, A.P., Froehlich, J. Anasti, JN ve Nisula, B. (1994). Increased biological activity due to basic isoforms in rekombinant human follicle-stimulating hormone produced in a human cell line. J. Clin. Endocrinol. Metab., 79, 756-760

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

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-sialyl transferase 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 rekombinant beta-trace protein. Eur J Biochem. 232(3), 718-25.

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

Grundmann,U., Nerlich,C., Rein,T. ve Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human beta-galaktoside alpha-2,6-sialyl transferase. G Nucleic Asits Res. 18(3), 667

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

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

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

Kitagawa,H. ve Paulson,J.C (1994) Cloning of a novel alpha 2,3-sialyl transferase that sialylates glycoprotein and glycolipide carbohydrate groups. J. Biol. Chem. 269(2), 1394-1401.

Lee EU, Roth J ve Paulson JC (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galaktoside alpha 2,6-sialyl transferase. J Biol Chem. 264(23), 13848-13855.

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

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 ve Satgunasingam N. (1976) Purification of anterior pituitary and hypothalamic hormones Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol). 7, 16-21.

Olivennes F, Howles CM, Borini A, Germond M, Trew G, Wikland M, Zegers-Hochschild F, Saunders H (2009) Individualizing FSH dose for assisted reproduction using a novel algorithm: the CONSORT study. Reprod Biomed Online. 2009 Feb;18(2):195-204.

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

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

Rathnam P ve Saxena BB. (1975). Primary amino asit sequence of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. I. alfa subunit. J Biol Chem.;250(17):6735-6746.

Regoeczi E, Debanne MT, Hatton MC ve 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.

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

Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO ve Vutyavanich T. (1987). Structure-function relationships of gonadotropins. Recent Prog Horm Res.;43,:383-429.

Saxena BB ve Rathnam P. (1976) Amino asit sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. J Biol Chem. 251(4), 993-1005

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

Steer CJ ve 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.

Svensson EC, Soreghan B ve Paulson JC. (1990) Organization of the beta-galaktosid alfa 2,6-sialyl transferase 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 ve Kobata A (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of rekombinant Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem. 263(8), 3657-3663.

Timossi CM, Barrios de Tomasi J, Zambrano E, González 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.

Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, González-Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM ve Ulloa-Aguirre A. (2000). Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. J Endocrinol. 165(2), 193-205.

Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damian-Matsumura, P. ve Chappel, S.C. (1988) Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. Hum. Reprod. 3, 491-501.

Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damiàn-Matsumura, P. Jimenez, M, Zambrano, E ve Diaz-Sanchez, V. (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle stimulating hormone. Hum. Reprod. 7, 23-30.

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

Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P, ve Timossi C (2001). Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. Arch Med Res. 32(6), 520-532.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, ve 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.

Van Lenten L, ve 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.

Wide, L. ve 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.

Wide, L. ve 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.

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

Zambrano E, Zariñán T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, ve 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.

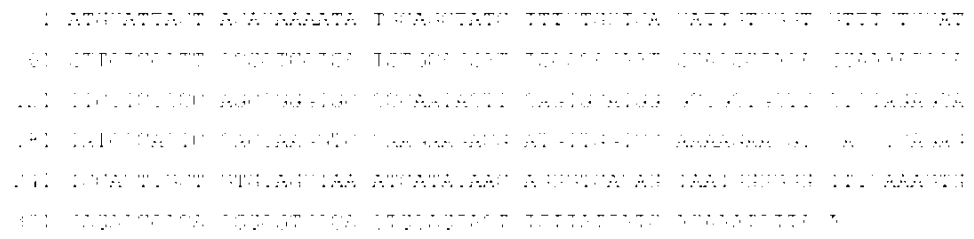
Zhang X, Lok SH, ve Kon OL (1998) Stable expression of human alpha-2,6-sialyl transferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. Biochim Biophys Acta. 1425(3), 441-452.

DİZİ İD NO: 1

Folikül uyarıcı hormon alfa polipeptit

Erişim numarası AH007338

FSH alfanın nükleotid dizisi



FSH alfanın protein dizisi (DİZİ İD NO: 5)

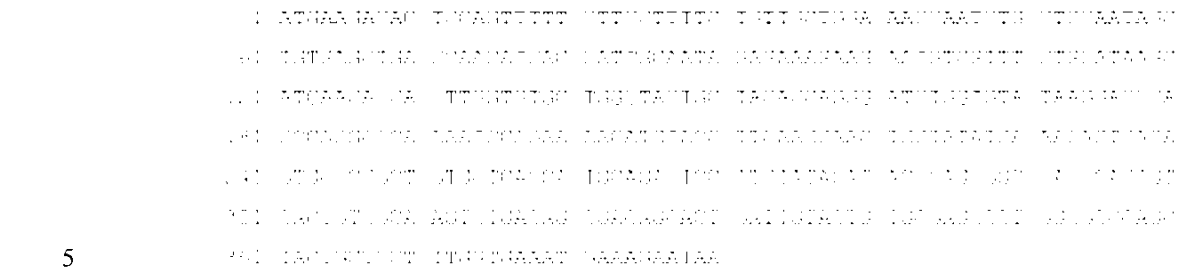


DİZİ İD NO: 2

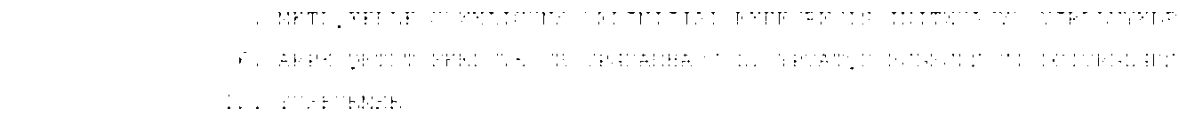
Folikül uyarıcı hormon beta polipeptit

Erişim numarası NM_000510

FSH betanın nükleotid dizisi



FSH betanın protein dizisi (DİZİ İD NO: 6)

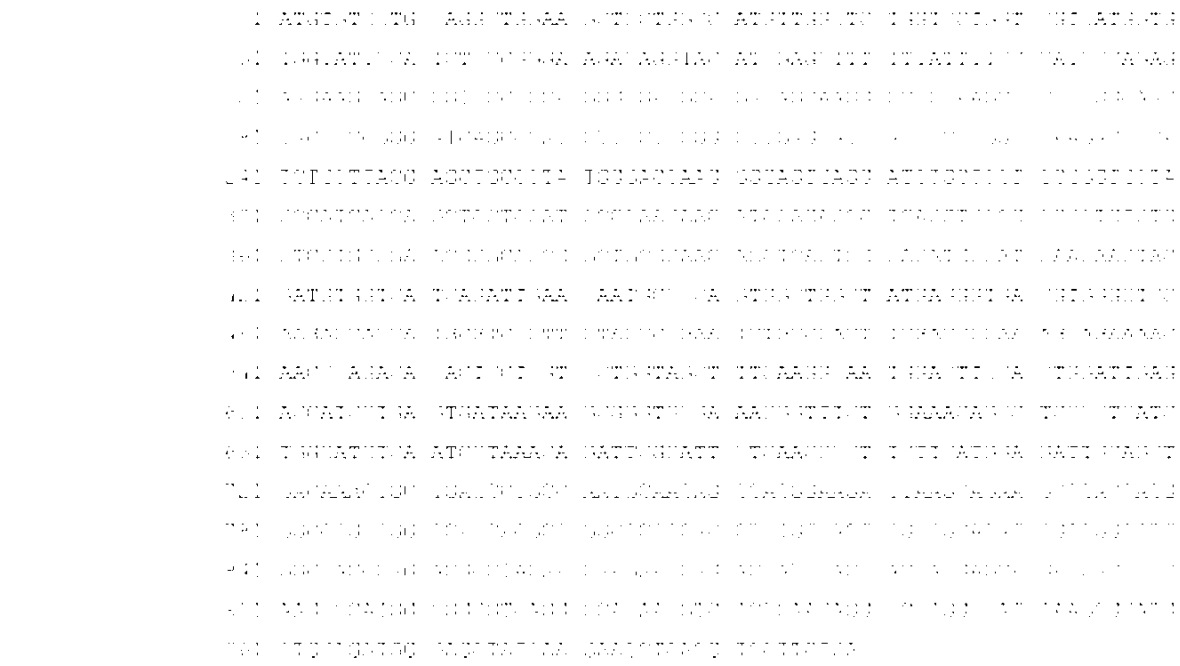


DİZİ İD NO: 3

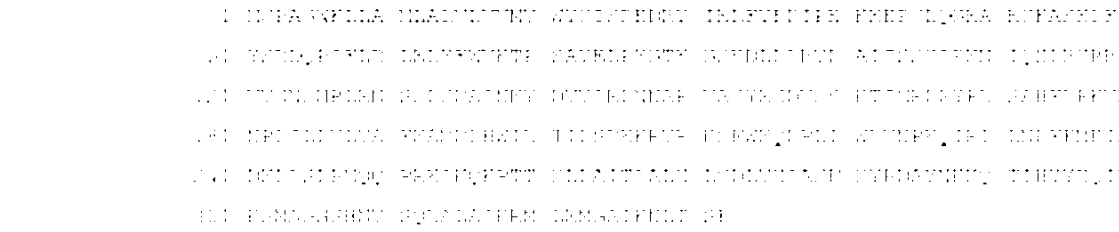
Beta-galaktosid alfa-2,3-sialil transferaz 4

Erişim numarası L23767

ST3GAL4'ün nükleotid dizisi



ST3GAL4'ün protein dizisi (DİZİ İD NO: 7)

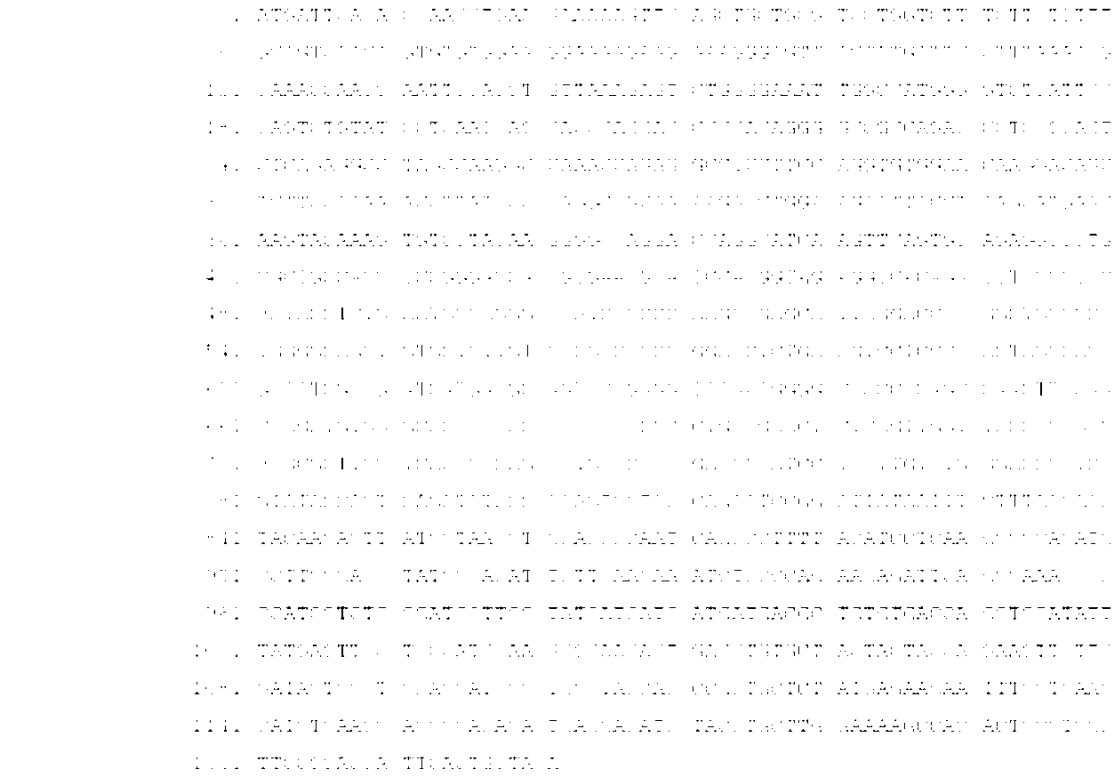


DİZİ İD NO: 4

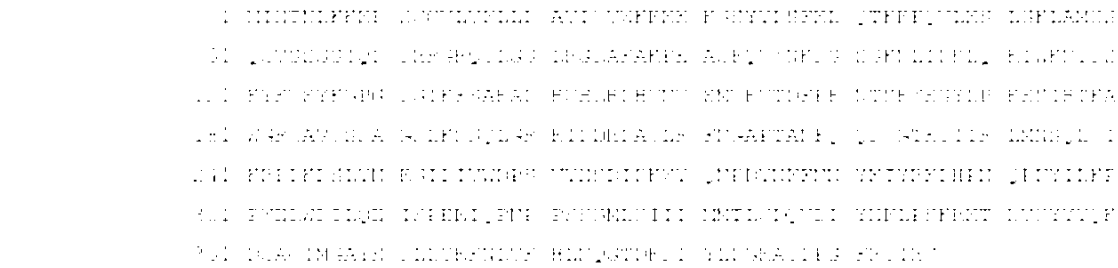
Beta-galaktosamid alfa-2,6-sialil transferaz 1

Erişim Numarası NM_003032

ST6GAL1'in nükleotid dizisi



ST6GAL1'in 0p-protein dizisi (DİZİ İD NO: 8)



DİZİ LİSTESİ

<110> Ferring BV

<120> Kontrollü Over Stimülasyonuna Yönelik Bileşim

<130> P/66643.EP01

<150> EP 11176803.2

<151> 2011-08-08

<160> 16

<170> PatentIn sürüm 3.5

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggtca cattgtcggt gtttctgcat 60

gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca 120

ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcatgg gctgctgctt ctctagagca 180

tatcccactc cactaaggtc caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag 240

tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagtg 300

gagaaccaca cggcgtgcca ctgcagtact tgttattatc acaaatctta a 351

<210> 2

<211> 390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgaagacac tccagttttt cttccttttc tgttgctgga aagcaatctg ctgcaatagc 60

tgtgagctga ccaacatcac cattgcaata gagaaagaag aatgtcgttt ctgcataagc 120

atcaacacca cttggtgtgc tggctactgc tacaccaggg atctggtgta taaggaccca 180

gccaggccca aaatccagaa aacatgtacc ttcaaggaac tggtatatga aacagtgaga 240

gtgcccggct gtgctcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc cacccagtgt 300

cactgtggca agtgtgacag cgacagcact gattgtactg tgcgaggcct ggggcccagc 360

tactgctcct ttggtgaaat gaaagaataa 390

<210> 3

<211> 999

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgtgtcctg caggctggaa gctcctggcc atgttggctc tggtcctggt cgtcatggtg 60

tggtattcca tctcccggga agacaggtac atcgagcttt tttatttttcc catcccagag 120

aagaaggagc cgtgcctcca gggtgaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggcaac 180

tactcccggg atcagcccat cttcctgcgg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca 240

tctgcttacg agctgcccta tgggaccaag gggagtgagg atctgctcct ccgggtgcta 300

gccatcacca gctcctccat ccccaagaac atccagagcc tcaggtgccg ccgctgtgtg 360

gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgccat caacaagtac 420

gatgtggtca tcagattgaa caatgcccca gtggctggct atgagggtga cgtgggctcc 480

aagaccacca tgcgtctctt ctaccctgaa tctgcccact tcgaccccaa agtagaaaac 540

aacccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag 600

accatcctga gtgataagaa gcgggtgcga aagggtttct ggaaacagcc tcccctcatc 660

tgggatgtca atcctaaaca gattcggatt ctcaaccccc tcttcatgga gattgcagct 720

gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gcccaccacg 780

ggcctgttgg ccatcacgct ggccctccac ctctgtgact tggtgcacat tgccggcttt 840

ggctacccag acgcctacaa caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc 900

aagtccatgg cggggtcagg ccataatgtc tcccaagagg ccctggccat taagcggatg 960

ctggagatgg gagctatcaa gaacctcacg tccttctga 999

<210> 4

<211> 1221

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```
atgattcaca ccaacctgaa gaaaaagttc agctgctgcg tcctggtctt tcttctgttt      60
gcagtcatct gtgtgtggaa ggaaaagaag aaagggagtt actatgattc ctttaaattg     120
caaaccaagg aattccaggt gttaaagagt ctggggaaat tggccatggg gtctgattcc     180
cagtctgtat cctcaagcag cacccaggac ccccacaggg gccgccagac cctcggcagt     240
ctcagaggcc tagccaaggc caaaccagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc     300
tcttccaaaa accttatccc taggctgcaa aagatctgga agaattacct aagcatgaac     360
aagtacaaag tgtcctacaa ggggccagga ccaggcatca agttcagtgc agaggccctg     420
cgctgccacc tccgggacca tgtgaatgta tccatggtag aggtcacaga ttttcccttc     480
aatacctctg aatgggaggg ttatctgccc aaggagagca ttaggaccaa ggctgggcct     540
tggggcaggt gtgctgttgt gtcgtcagcg ggatctctga agtcctccca actaggcaga     600
gaaatcgatg atcatgacgc agtcctgagg tttaatgggg cacccacagc caacttccaa     660
caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctcagttggt taccacagag     720

aagcgcttcc tcaaagacag tttgtacaat gaaggaatcc taattgtatg ggacccatct     780
gtataccact cagatatccc aaagtggtac cagaatccgg attataattt ctttaacaac     840
tacaagactt atcgtaagct gcaccccaat cagccctttt acatcctcaa gccccagatg     900
ccttgggagc tatgggacat tcttcaagaa atctccccag aagagattca gccaaacccc     960
ccatcctctg ggatgcttgg tatcatcatc atgatgacgc tgtgtgacca ggtggatatt    1020
tatgagttcc tcccatccaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc    1080
gatagtgcct gcacgatggg tgcctaccac ccgctgctct atgagaagaa tttggtgaag    1140
catctcaacc agggcacaga tgaggacatc tacctgcttg gaaaagccac actgcctggc    1200
ttccggacca ttcactgcta a                                              1221
```

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

```
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> 6

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Yapay Dizi

<220>

<223> PCR primer FSHa-fw

<400> 9

ccaggatccg ccaccatgga ttactacaga aaaatatgc 39

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> PCR primer FSHa-rev

<400> 10

ggatggctag cttaagattt gtgataataa c 31

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> PCR primer FSHb-fw

<400> 11

ccaggcgcgc caccatgaag acactccagt ttttc 35

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> PCR primer FSHb-rev

<400> 12

ccgggttaac ttattattct ttcatttcac caaagg 36

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> PCR primer 2,3STfw

<400> 13

ccaggatccg ccaccatgtg tcctgcaggc tggaagc 37

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> PCR primer 2,3STrev

<400> 14

ttttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg 35

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> PCR primer 2,6STfw

<400> 15

ccaggatccg ccaccatgat tcacaccaac ctgaag 36

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

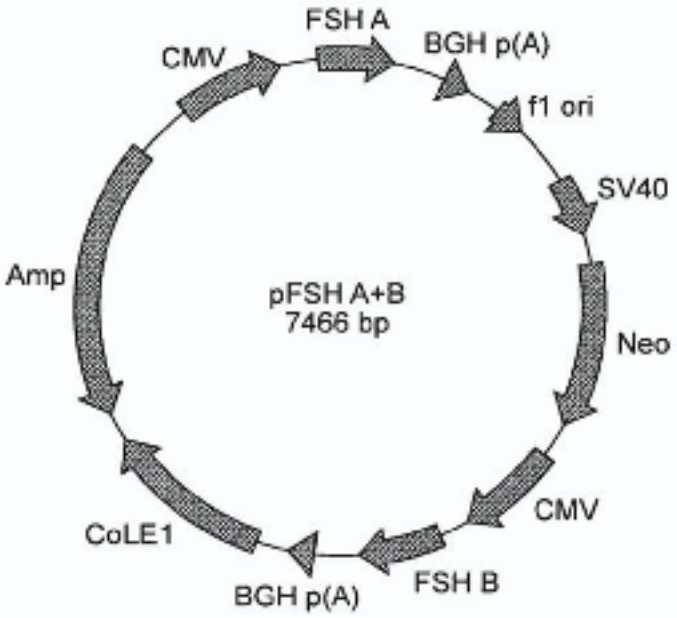
<223> PCR primer 2,6STrev

<400> 16

ttttttctt aagttagcag tgaatggtcc gg 32

Dosya No. :EP-14978
Resim Adedi:____6___
Sayfa No :____1___

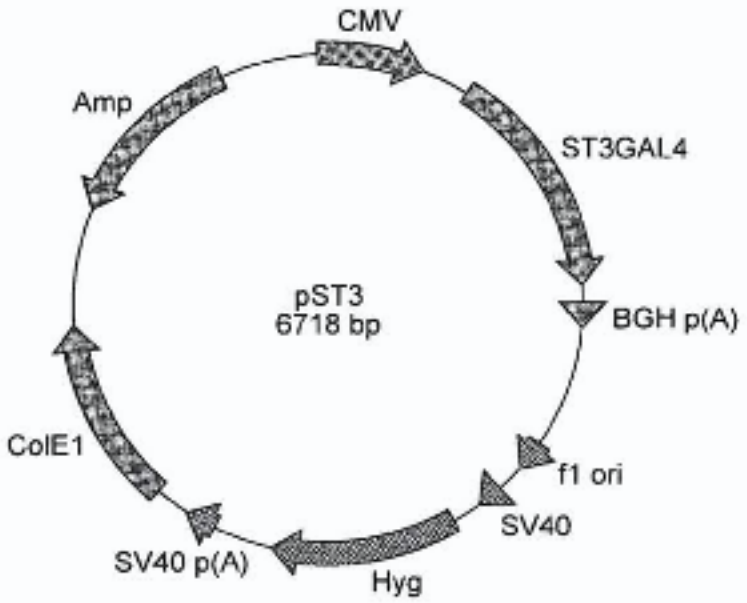
ŞEKİL 1: FSH Ekspresyon Vektörü



ŞEKİL 1

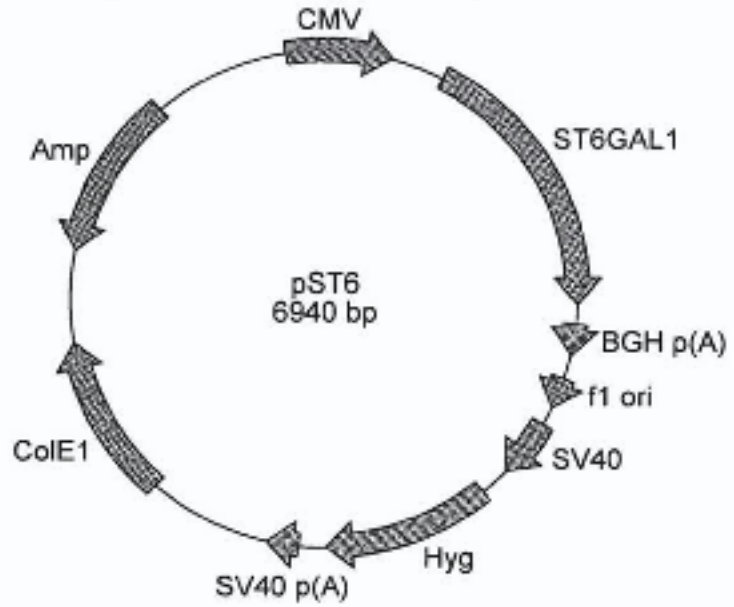
Dosya No. :EP-14978
Resim Adedi:____6___
Sayfa No :____2___

α2,3- sialiltransferaz (ST3GAL4) ekspresyon vektörü

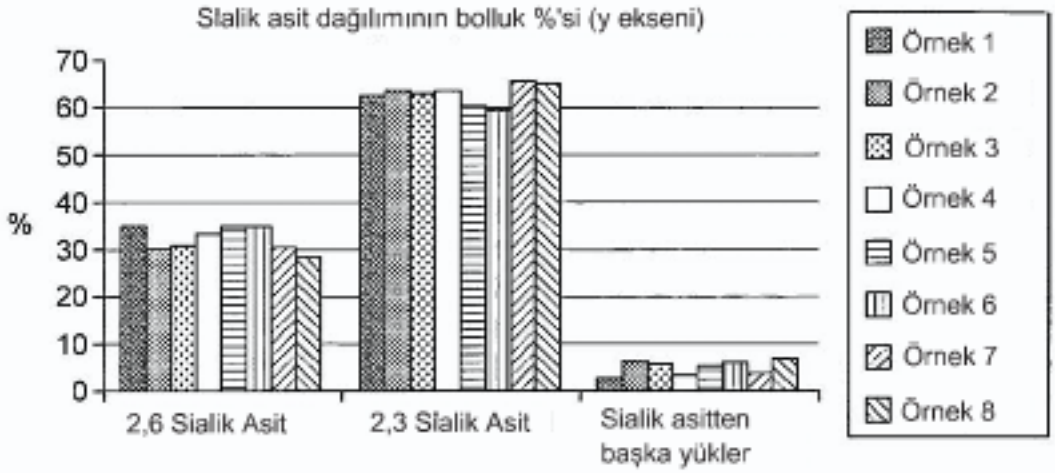


ŞEKİL 2

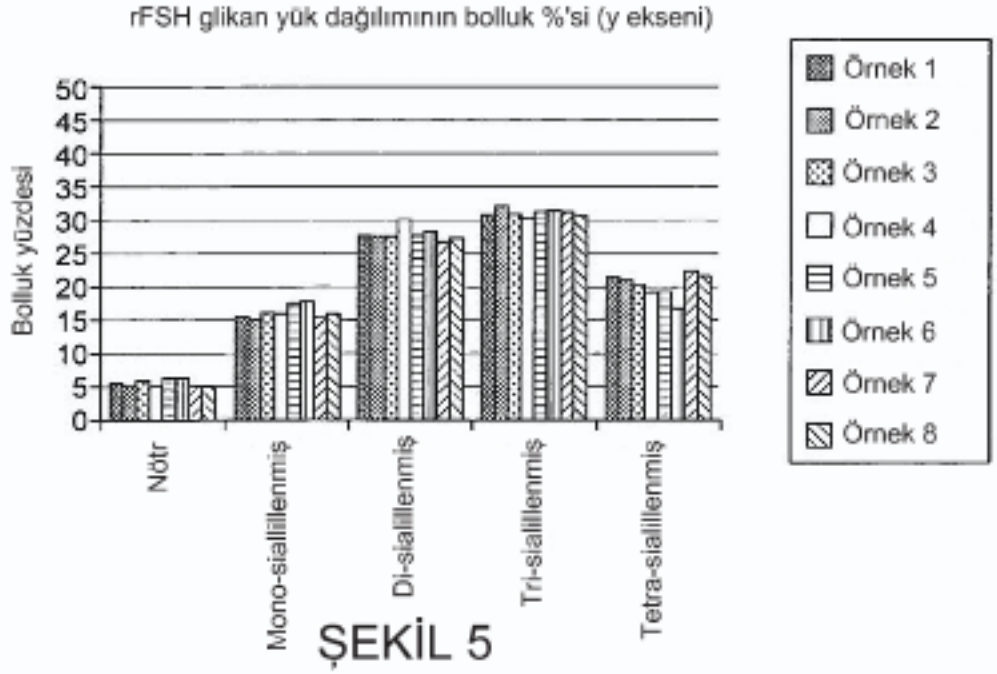
α2,6- sialiltransferaz (ST6GAL1) ekspresyon vektörü



ŞEKİL 3

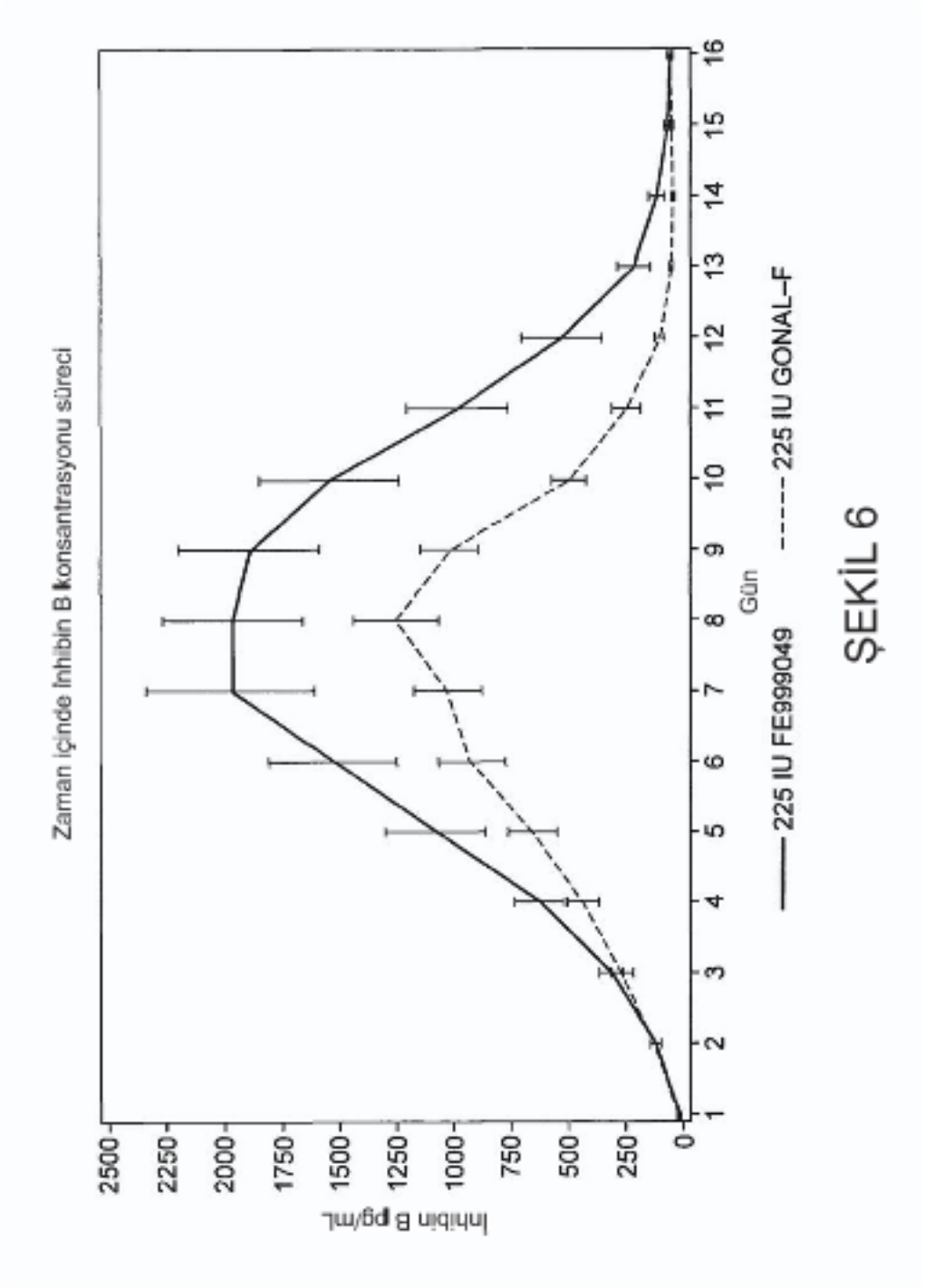


ŞEKİL 4

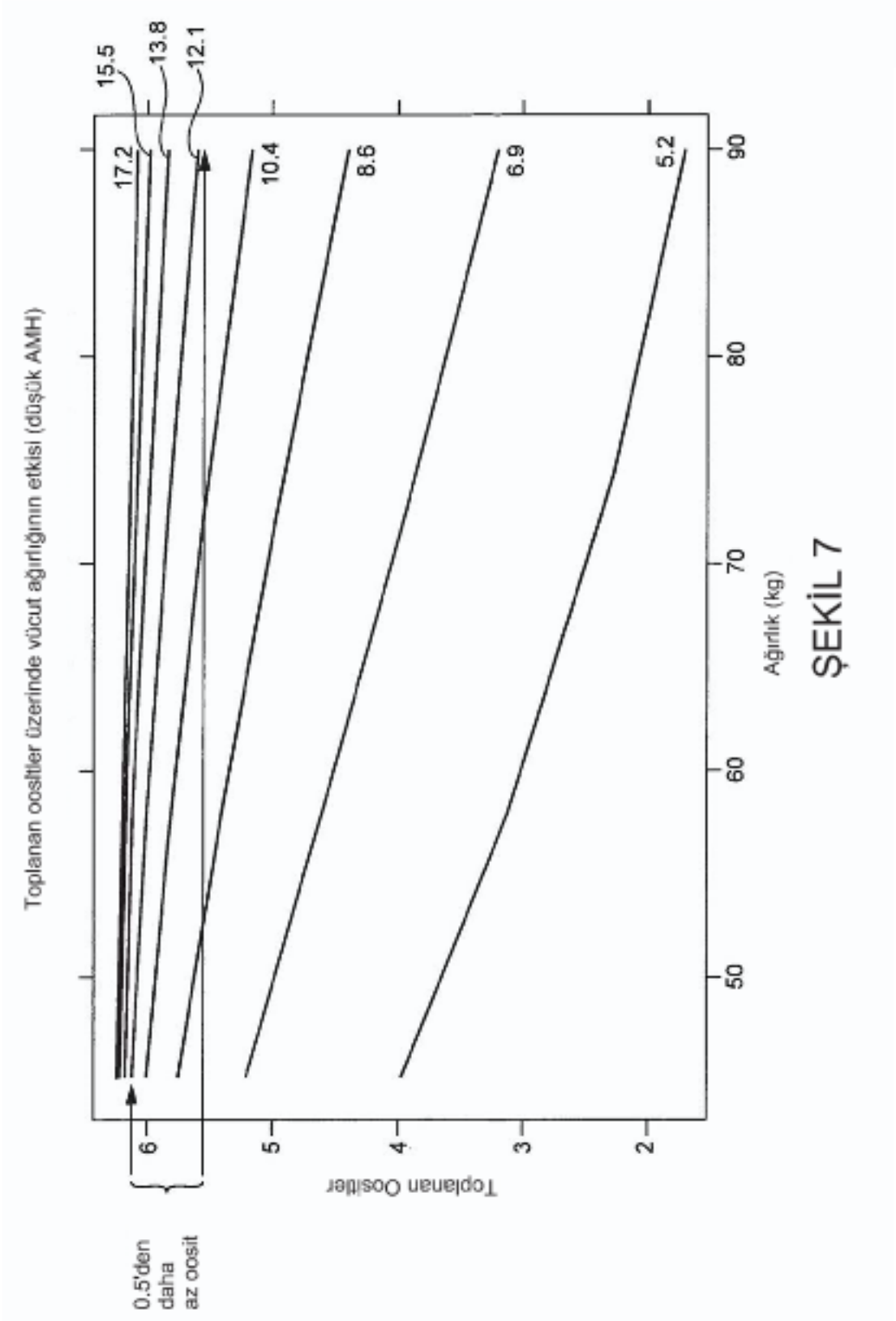


ŞEKİL 5

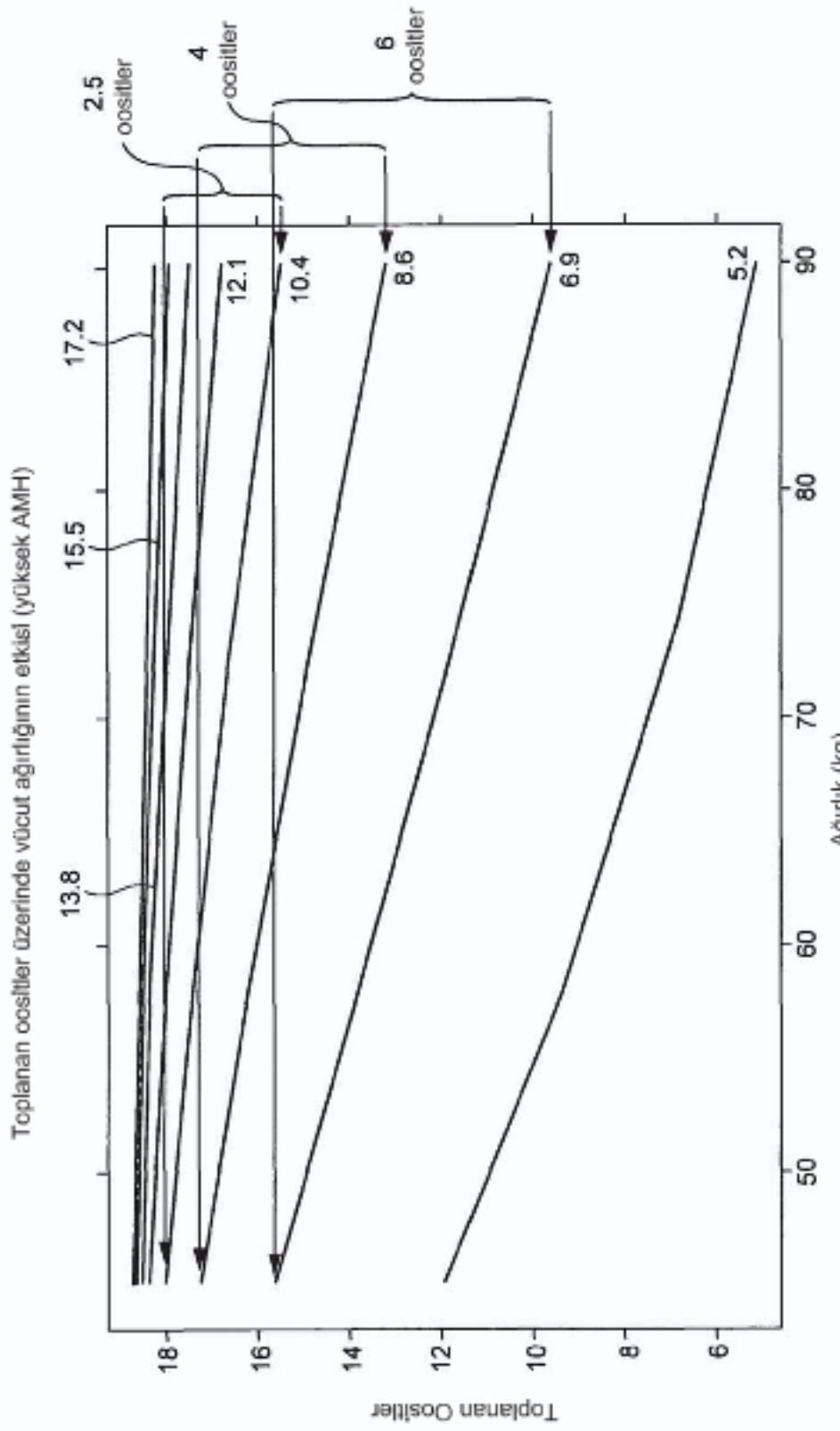
Dosya No. :EP-14978
Resim Adedi:____6___
Sayfa No :____4___



ŞEKİL 6


Toplanan oositler üzerinde vücut ağırlığının etkisi (düşük AMH)
Toplanan Oositler
Ağırlık (kg)
15.5
13.8
12.1
17.2
10.4
8.6
6.9
5.2
0.5'den daha az oosit

ŞEKİL 7


2.5 oositler
4 oositler
6 oositler
17.2
15.5
13.8
12.1
10.4
8.6
6.9
5.2
Toplanan ocsitler üzerinde vücut ağırlığının etkisi (yüksek AMH)
Toplanan Oositler
Ağırlık (kg)
18
16
14
12
10
8
6
50
60
70
80
90

ŞEKİL 8