

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034022

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.19

(51) Int. Cl. C07K 14/59 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791724

(22) Дата подачи заявки
2016.04.22

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГОНАДОТРОПИНА

(31) 15164965.4

(56) WO-A1-2011042688
WO-A2-2013151666
WO-A2-2011084145

(32) 2015.04.24

(33) EP

(43) 2018.04.30

(86) PCT/EP2016/059006

(87) WO 2016/170113 2016.10.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФЕРРИНГ Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Плаксин Даниель, Гринхют Айелет
(NL)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)

(57) Клетка-хозяин, отличающаяся тем, что она содержит интегрированную в ее геном последовательность, кодирующую α -цепь хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), и применение клетки-хозяина для получения рекомбинантного ХГЧ.

B1

034022

034022

B1

Изобретение относится к гонадотропинам для применения в лечении бесплодия. В частности, оно относится к хорионическому гонадотропину человека (ХГЧ).

Гонадотропины представляют собой группу гетеродимерных гликопротеиновых гормонов, которые регулируют гонадную функцию у мужчин и женщин. Они включают фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ) и хорионический гонадотропин (ХГ).

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) выделяется главным образом человеческой плацентой во время беременности и обеспечивает сохранение желтого тела. ХГЧ содержит альфа-субъединицу (α -цепь) из 92 аминокислот, также свойственную другим гликопротеиновым гормонам ЛГ и ФСГ, и бета-субъединицу (β -цепь) из 145 аминокислот, присущую только ХГЧ, которая определяет специфичность гормона. Каждая субъединица подвергается посттрансляционной модификации путем добавления сложных углеводных остатков. Альфа-субъединица содержит сайты 2-N-связанного гликозилирования на аминокислотах 52 и 78, и бета-субъединица содержит сайты 2-N-связанного гликозилирования на аминокислотах 13 и 30 и четыре сайта О-связанного гликозилирования на аминокислотах 121, 127, 132 и 138.

ХГЧ, экстрагированный из мочи беременных женщин [Choragon (Ferring)], использовали в течение многих лет в лечении бесплодия. Получение ХГЧ, экстрагированного из мочи, включает сбор и переработку больших количеств мочи. Для применения в лечении бесплодия также доступен Ovitrelle (Serono), представляющий собой рекомбинантный вариант ХГЧ. Этот рекомбинантный продукт экспрессируется в клетках яичника китайского хомячка (СНО) и имеет фармакокинетический профиль, отличный от ХГЧ, полученного из мочи человека.

Наблюдается значительная гетерогенность, связанная с препаратами ХГЧ, которая имеет отношение к различиям в количествах различных присутствующих изоформ. Отдельные изоформы ХГЧ демонстрируют идентичные аминокислотные последовательности, но различаются по степени посттрансляционной модификации; конкретные изоформы отличаются гетерогенностью структур углеводных ветвей и включением отличающихся количеств сиаловой кислоты (концевой сахар), то и другое оказывает влияние на удельную биоактивность изоформы.

Гликозилирование препаратов рекомбинантного ХГЧ ("рХГЧ") отражает диапазон гликозилтрансфераз, имеющихся в клеточной линии хозяина. Современный препарат рХГЧ, Ovitrelle, продуцируется сконструированными клетками яичника китайского хомячка (клеток СНО). Диапазон модификаций гликана у рХГЧ, полученного из клеток СНО, более ограничен, чем диапазон, обнаруженный в натуральных продуктах, полученных из мочи. Примеры пониженной гетерогенности гликана, обнаруженной у рХГЧ, полученного из СНО, включают недостаток глюкозамина в точках ветвления и пониженное содержание фукозилирования ядра и ацетиллактозаминовых удлинений. Кроме того, клетки СНО способны присоединять сиаловую кислоту, используя только α 2,3-сцепление (Kagawa et al., 1988, Takeuchi et al., 1988, Svensson et al., 1990).

ХГЧ из мочи человека (т.е. ХГЧ, экстрагированный из мочи беременных женщин), который до сих пор использовался в лечении бесплодия, представляет собой, в действительности, плацентарный ХГЧ; ХГЧ, продуцированный в (человеческой) плаценте и затем выделенный в мочу. Этот ХГЧ экстрагируют из мочи для применения в качестве фармацевтического продукта. Bousfield et al. (Rev. Endocr. Metab. Disord. (2011) 12:289-302) констатируют, что "в то время как гипофизарные гонадотропины имеют как α 2,3-, так и α 2,6-связанную сиаловую кислоту, плацентарный ХГЧ и рекомбинантный гонадотропин, продуцированные в клетках яичника китайского хомячка, имеют только α 2,3-связанную сиаловую кислоту". Таким образом, ХГЧ из мочи человека (который продуцируется в плаценте) включает только α 2,3-сиалирование (подобно рекомбинантным продуктам, произведенным клеточной линией СНО). Таким образом, известные фармацевтические композиции, которые включают ХГЧ, включают только α 2,3-связанную сиаловую кислоты, но не включают α 2,6-связанную сиаловую кислоту.

Было продемонстрировано, что препарат рекомбинантного ФСГ (Organon) отличается количествами ФСГ с изоэлектрической точкой (pI) ниже 4 (рассматриваются кислые изоформы) при сравнении с гипофизарным, сывороточным ФСГ или ФСГ из мочи женщины в постменопаузе (Ulloa-Aguirre et al. 1995). Количество кислых изоформ в препаратах ФСГ из мочи было значительно больше по сравнению с рекомбинантными препаратами, Gonalf (Serono) и Puregon (Organon) (Andersen et al. 2004). Это должно отражать более низкое молярное содержание сиаловой кислоты в rFSH, так как содержание отрицательно заряженного гликана, модифицированного сульфатом, является низким в ФСГ. Более низкое содержание сиаловой кислоты по сравнению с природным ФСГ является особенностью обоих препаратов ФСГ, имеющихся в продаже, и по этой причине должно отражать ограничение в процессе изготовления (Bassett and Dribergen, 2005). Время существования ФСГ в кровеносной системе было подтверждено документально для веществ из различных источников. Некоторые из этих веществ были разделены на фракции на основе суммарного заряда молекулы, который характеризуется ее pI, в котором большая кислотность приравнивается к более высокому отрицательному заряду. Основной вклад в суммарный заряд молекулы вносит общее содержание сиаловых кислот каждой молекулы ФСГ. Например, rFSH (Organon) имеет содержание сиаловой кислоты в размере около 8 моль/моль, тогда как полученный из мочи ФСГ

имеет более высокое содержание сиаловой кислоты (de Leeuw et al., 1996). Соответствующие скорости выведения из плазмы у крысы равняются 0,34 и 0,14 мл/мин (Ulloa-Aguirre et al., 2003). В другом примере, когда образец рекомбинантного ФСГ разделяли на фракции с высоким и низким pI, *in vivo* активность фракции с высоким pI (более низкое содержание сиаловой кислоты) снижалась, и она имела более короткий период полувыведения из плазмы (D'Antonio et al., 1999). Авторы изобретения обнаружили, что, как и в случае с ФСГ, известный препарат рекомбинантного ХГЧ, полученный из СНО (например Ovitrelle), также имеет более низкое количество ХГЧ с изоэлектрической точкой (pI) ниже 4 (рассматриваются кислые изоформы), чем ХГЧ, полученный из мочи, что также отражает более низкое содержание сиаловой кислоты известного препарата рХГЧ по сравнению с ХГЧ из мочи.

Авторы изобретения разработали полученный из человеческих клеток рекомбинантный ХГЧ (т.е. рекомбинантный ХГЧ, который продуцируется или экспрессируется в человеческой клеточной линии, например изготовленной путем конструирования человеческой клеточной линии), который имеет более кислый профиль, чем препарат рХГЧ, полученный из клеточной линии СНО, Ovitrelle, и который имеет более высокое содержание сиаловой кислоты. Этот рХГЧ является объектом международной заявки на патент № РСТ/GB2010/001854, опубликованной как WO 2011/042688. Рекомбинантный ХГЧ со смесью $\alpha 2,3$ и $\alpha 2,6$ -связанной сиаловой кислоты получали путем конструирования человеческой клеточной линии для экспрессии как рХГЧ, так и $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазы. Экспрессированный продукт является очень кислым и имеет содержание сиаловой кислоты [выраженное в виде отношения молей сиаловой кислоты к молям белка], например, 19,1 моль/моль и содержит смесь как $\alpha 2,3$ -, так и $\alpha 2,6$ -связанных сиаловых кислот; причем последняя обеспечивается действием эндогенной сиалилтрансферазы. В исследовании авторов изобретения указано, что тип сцепления сиаловой кислоты, $\alpha 2,3$ - или $\alpha 2,6$ -, может иметь очень сильное влияние на биологическое выведение ХГЧ. Человеческие клеточные линии, в отличие от клеточных линий СНО, могут экспрессировать рекомбинантный ХГЧ с сиаловыми кислотами, присоединенными посредством как $\alpha 2,3$, так и $\alpha 2,6$ сцеплений.

Клеточная линия согласно WO 2011/042688 хорошо экспрессирует полученный из человеческих клеток рекомбинантный ХГЧ. Однако эта клеточная линия также экспрессирует относительно высокий уровень свободной β -цепи (свободной бета-субъединицы), и требовалась очистка (для удаления этой свободной β -цепи из продукта ХГЧ).

В настоящее время авторы изобретения разработали новую клеточную линию, которая экспрессирует рХГЧ и $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазу и продуцирует рХГЧ с пониженным количеством свободной β -цепи, тем самым улучшая выход и снижая уровень требуемой очистки продукта (см. фиг. 7).

Согласно настоящему изобретению предложена клетка (например клетка-хозяин), отличающаяся тем, что она содержит интегрированную в ее геном последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующую α -цепь ХГЧ, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 1; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 96,5% с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 96,5% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1); последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (например, гомологию по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (например, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 1); последовательности SEQ ID NO: 4; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 96,5% с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 96,5% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4); и последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (например, гомологию по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (например, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 4). Предпочтительно последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующая α -цепь ХГЧ, не является последовательностью, которая внесена в банк данных в виде AN007338 (т.е. предпочтительно последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующая α -цепь ХГЧ, не является последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 5). Клетка может дополнительно содержать интегрированную в ее геном кДНК, кодирующую α -2,3-сиалилтрансферазу, например последовательность SEQ ID NO: 3. Клетка может дополнительно содержать интегрированную в ее геном последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующую β -цепь ХГЧ, например последовательность SEQ ID NO: 2.

Клетка-хозяин может представлять собой, например, клетку PER.C6®, клетку HT1080, клетку GT-5s и так далее. Предпочтительно клетка представляет собой клетку PER.C6®, такую как клетка PER.C6®, депонированная под № 96022940 в ECACC (Европейской коллекции клеточных культур животных).

Согласно настоящему изобретению предложена клетка PER.C6®, такая как клетка PER.C6®, депонированная под № 96022940 в ECACC, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит интегрированную в ее геном последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующую α -цепь ХГЧ. Последова-

тельность (нуклеиновой кислоты), кодирующая α -цепь ХГЧ, может быть выбрана из последовательности согласно SEQ ID NO: 1; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 90% с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1); последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (например, гомологию по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (например, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 1); последовательности SEQ ID NO: 4; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 90% с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4); и последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (например, гомологию по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (например, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 4). Предпочтительно последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующая α -цепь ХГЧ, не является последовательностью, которая внесена в банк данных в виде AN007338. Клетка может дополнительно содержать интегрированную в ее геном кДНК, кодирующую α -2,3-сиалилтрансферазу, например последовательность согласно SEQ ID NO: 3. Клетка может дополнительно содержать интегрированную в ее геном последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующую β -цепь ХГЧ, например последовательность согласно SEQ ID NO: 2.

Следует понимать, что термин "последовательность, кодирующая α -цепь ХГЧ" или "последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующая α -цепь ХГЧ", используемый в этом документе, также относится к последовательности, кодирующей α -цепь ФСГ (или к последовательности, кодирующей α -цепь ЛГ), так как α -цепь ХГЧ является точно такой же, как и α -цепь для ФСГ (и ЛГ).

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты" в этом документе относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептиды, такие как пептиды, белки и так далее. Эти молекулы нуклеиновых кислот могут быть образованы ДНК, РНК или их аналогами. Однако молекулы нуклеиновой кислоты, которые образованы ДНК, являются предпочтительными.

Специалист в данной области техники понимает, что модификация исходной нуклеотидной последовательности описывает процесс оптимизации в отношении частоты использования кодона. Включенные замены можно легко идентифицировать путем сравнения модифицированной последовательности и исходной последовательности. Кроме того, обе последовательности (т.е. исходная последовательность и оптимизированная последовательность) будут кодировать одну и ту же аминокислотную последовательность.

Аминокислотная последовательность α -цепи человеческого ХГЧ раскрыта в WO 2011/042688 (в этом документе называется SEQ ID NO: 1) и описана у Fiddes and Goodman 1979. Она внесена в банк данных под № AN007388 и показана в виде SEQ ID NO: 5 ниже. Аминокислотная последовательность β -цепи человеческого ХГЧ отображена в SEQ ID NO: 2 и внесена в банк данных в виде NP_000728. Эти аминокислотные последовательности соответствуют аминокислотным последовательностям дикого типа α - и β -цепи человеческого ХГЧ. Термины "последовательность нуклеиновой кислоты дикого типа" или "исходная последовательность нуклеиновой кислоты" для целей настоящего изобретения относятся к последовательности нуклеиновой кислоты, которая предназначена для использования для (сверх)экспрессии в клетке-хозяине и которая не была адаптирована к частоте использования кодона в клетке-хозяине, но представляет собой действительную последовательность нуклеиновой кислоты дикого типа, кодирующую белок. Термин "оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты" для целей настоящего изобретения относится к последовательности, которая была модифицирована для экспрессии в клетке-хозяине путем адаптации последовательности к немодифицированной/исходной последовательности нуклеиновой кислоты. Оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок, имеющий такую же аминокислотную последовательность как белок, кодируемый немодифицированной последовательностью. Заявители разработали оптимизированную последовательность, которая кодирует α -цепь ХГЧ (см., например, SEQ ID NO: 1 и 4, фиг. 1).

Согласно настоящему изобретению в еще одном аспекте предложена полинуклеотидная последовательность (например, полинуклеотидная последовательность, кодирующая α -цепь ХГЧ), содержащая последовательность, выбранную из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1; последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4; последовательности нуклеиновой кислоты с гомологией по меньшей мере 97% (например, с гомологией по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с нуклеиновой кислотой SEQ ID NO: 1 (например, последовательности нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 97% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности) нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1); и последовательности нуклеиновой кислоты с гомологией по меньшей мере 97% (например, с гомологией по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с нуклеиновой кислотой SEQ ID NO: 4 (например, последовательности

нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 97% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности) нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4).

Согласно настоящему изобретению в еще одном аспекте предложен способ получения рекомбинантного ХГЧ в клетке, включающий культивирование клетки в подходящей среде и выделение рекомбинантного белка (ХГЧ) из указанной клетки и/или указанной среды (например, выделение рекомбинантного ХГЧ из супернатанта клеточной культуры), где клетка (клетка-хозяин) содержит интегрированную в ее геном последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующую α -цепь ХГЧ, выбранную из: последовательности SEQ ID NO: 1; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 90% с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1); последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 1); последовательности SEQ ID NO: 4; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 90% с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4); и последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 4). Предпочтительно последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующая α -цепь ХГЧ, не представляет собой последовательность, которая внесена в банк данных в виде AN007338. Клетка может дополнительно содержать интегрированную в ее геном кДНК, кодирующую альфа-2,3-сиалилтрансферазу, например последовательность согласно SEQ ID NO: 3. Клетка может дополнительно содержать интегрированную в ее геном последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующую β -цепь ХГЧ, например последовательность согласно SEQ ID NO: 2. Способ может включать дополнительную стадию или стадии очистки рекомбинантного ХГЧ, полученного из указанной клетки и/или указанной среды (например, очистку рекомбинантного ХГЧ от супернатанта клеточной культуры).

Клетка (хозяин) может представлять собой, например, клетку PER.C6®, клетку HT1080, клетку GT-5s и т.д. Предпочтительно клетка представляет собой клетку PER.C6®, такую как клетка PER.C6®, депонированная под № 96022940 в ECACC.

Согласно настоящему изобретению в еще одном аспекте предложен способ получения рекомбинантного ХГЧ в клетке, включающий культивирование клетки в подходящей среде и выделение рекомбинантного белка (ХГЧ) из указанной клетки и/или указанной среды (включает получение рекомбинантного ХГЧ из супернатанта клеточной культуры), где клетка представляет собой клетку PER.C6® (такую как клетка PER.C6®, депонированная под № 96022940 в ECACC), содержащую интегрированную в ее геном последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующую α -цепь ХГЧ. Последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующая α -цепь ХГЧ, может быть выбрана из: последовательности SEQ ID NO: 1; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 90% с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1); последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 1); последовательности SEQ ID NO: 4; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 90% с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4); и последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 4). Предпочтительно последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующая α -цепь ХГЧ, не представляет собой последовательность, которая внесена в банк данных как AN007338. Клетка может дополнительно содержать интегрированную в ее геном кДНК, кодирующую α -2,3-сиалилтрансферазу, например последовательность согласно SEQ ID NO: 3. Клетка может дополнительно содержать интегрированную в ее геном последовательность (нуклеиновой кислоты), кодирующую β -цепь ХГЧ, например последовательность согласно SEQ ID NO: 2. Способ может включать дополнительную стадию или стадии очистки рекомбинантного ХГЧ, полученного из указанной клетки и/или указанной среды (например, очистку рекомбинантного ХГЧ от супернатанта клеточной культуры).

Термин "клетка-хозяин" для целей настоящего изобретения относится к любой клетке, которую обычно используют для экспрессии, т.е. транскрипции и трансляции последовательностей нуклеиновой кислоты, для продуцирования, например, полипептидов. В частности, термин "клетка-хозяин" или "орга-

низм" относится к клеткам прокариот, низших эукариот, растений, насекомых или к системам культивирования клеток млекопитающих. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, более предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку человека, еще более предпочтительно клетку PERC6®.

Предполагается, что термин "рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты" в понимании настоящего изобретения содержит все виды молекул нуклеиновых кислот, которые могут быть введены в клетку-хозяина и могут осуществлять экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержится в рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты. Термин включает, например, плазмидные векторы и вирусные векторы (например, аденовирусные, лентивирусные и ретровирусные векторы), которые хорошо известны в данной области техники.

Согласно настоящему изобретению в еще одном аспекте предложена рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая (первую) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую α -цепь ХГЧ, которая (первая) последовательность нуклеиновой кислоты выбрана из последовательности SEQ ID NO: 1; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 96,5% с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 96,5% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1); последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 1); последовательности SEQ ID NO: 4; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 96,5% с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 96,5% идентичность последовательности SEQ ID NO: 14; и последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 4). Предпочтительно рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты этого аспекта настоящего изобретения содержит как оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую α -цепь человеческого ХГЧ, так и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую β -цепь ХГЧ. Предпочтительно (первая) последовательность нуклеиновой кислоты находится под контролем промотора, который действует в клетке-хозяине. Предпочтительно рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую β -цепь ХГЧ. Вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую β -цепь ХГЧ, может представлять собой последовательность согласно SEQ ID No. 2.

Вторая последовательность нуклеиновой кислоты может находиться под контролем отдельного промотора, который действует в клетке-хозяине. Первая последовательность нуклеиновой кислоты и/или вторая последовательность нуклеиновой кислоты могут находиться под контролем вирусного промотора (т.е. например CMV (цитомегаловирусного) промотора).

Согласно настоящему изобретению в еще одном аспекте предложена клетка-хозяин, содержащая или включающая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, как изложено выше (содержит клетку-хозяина, содержащую рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую (первую) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую α -цепь ХГЧ, которая (первая) последовательность нуклеиновой кислоты выбрана из последовательности SEQ ID NO: 1; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 96,5% с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 96,5% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1); последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 1 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 1); последовательности SEQ ID NO: 4; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 96,5% с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 96,5% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4); и последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) с последовательностью SEQ ID NO: 4 (например, последовательности, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности (по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности) SEQ ID NO: 4).

Авторы изобретения обнаружили, что клетки (клетки-хозяева), клеточные линии, включающие эти клетки-хозяева, рекомбинантные молекулы нуклеиновых кислот, полинуклеотиды и способы по изобретению могут продуцировать рекомбинантный ХГЧ с высоким выходом и чистотой (например, с небольшим количеством свободной β -цепи).

Согласно настоящему изобретению в еще одном аспекте предложен рекомбинантный ХГЧ ("рХГЧ" или "рекХГЧ"), который включает α 2,3- и α 2,6-сиалирование, где рекомбинантный ХГЧ получен в клетке, как описано и заявлено в настоящем изобретении. Рекомбинантный ХГЧ может иметь содержание

сиаловой кислоты [выраженное в виде отношения молей сиаловой кислоты к молям белка] от 12 до 20 моль/моль, например от 12 до 15,5 моль/моль, например от 12 до 14,9 моль/моль. рХГЧ (или препарат рХГЧ) может иметь содержание сиаловой кислоты от 12,5 до 14,5 моль/моль, например содержание сиаловой кислоты от 12,8 до 13,2 моль/моль. рХГЧ (или препарат рХГЧ) согласно изобретению может иметь содержание сиаловой кислоты 13 моль/моль.

В примерах изобретения рХГЧ может содержаться в виде одной изоформы или в виде смеси изоформ.

Рекомбинантный ХГЧ (или препарат рХГЧ), полученный посредством способов и клеток по изобретению, включает α 2,3- и α 2,6-сиалирование. Под сиалированием подразумевается количество остатков сиаловой кислоты, имеющихся в углеводных структурах ХГЧ. α 2,3-сиалирование означает сиалирование в 2,3-положении (которое хорошо известно в данной области техники); и α 2,6-сиалирование означает сиалирование в 2,6-положении (также хорошо известное в данной области техники). Таким образом, в этом документе формулировка "% общего сиалирования может представлять собой α 2,3-сиалирование" относится к % общего количества остатков сиаловой кислоты, имеющихся в ХГЧ, которые сиалированы в 2,3-положении. Термин "% общего сиалирования, представляющего собой α 2,6-сиалирование" относится к % общего количества остатков сиаловой кислоты, имеющихся в ХГЧ, которые сиалированы в 2,6-положении. Термин "% общего сиалирования, представляющего собой α 2,8-сиалирование" относится к % общего количества остатков сиаловой кислоты, имеющихся в ХГЧ, которые сиалированы в 2,8-положении.

рХГЧ (или препарат рХГЧ), полученный посредством способов и клеток согласно изобретению, может иметь от 1 до 99% общего сиалирования, представляющего собой α 2,3-сиалирование. рХГЧ (или препарат рХГЧ), полученный посредством способов и клеток согласно изобретению, может иметь от 1% до 90% общего сиалирования, представляющего собой α 2,3-сиалирование. рХГЧ (или препарат рХГЧ) согласно изобретению может иметь 10% или более общего сиалирования, представляющего собой α 2,3-сиалирование, например от 10 до 90% общего сиалирования может представлять собой α 2,3-сиалирование. Например, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 или 90% или более общего сиалирования может представлять собой α 2,3-сиалирование. От 45 до 80% общего сиалирования может представлять собой α 2,3-сиалирование, например от 50 до 70% общего сиалирования может представлять собой α 2,3-сиалирование, например от 55 до 65% общего сиалирования может представлять собой α 2,3-сиалирование. рХГЧ (или препарат рХГЧ) может включать α 2,3-сиалирование в количестве, которое составляет от 65 до 95% общего сиалирования, например от 70 до 90% общего сиалирования, например от 85 до 90% общего сиалирования.

рХГЧ (или препарат рХГЧ), полученный посредством способов и клеток по изобретению, может иметь 1-99% общего сиалирования, представляющего собой α 2,6-сиалирование. рХГЧ (или препарат рХГЧ) по изобретению может иметь от 5 до 50% общего сиалирования, представляющего собой α 2,6-сиалирование. Например, от 5 до 45%, например, от 6 до 40%, например, от 7 до 30%, например, от 8 до 20% общего сиалирования может представлять собой α 2,6-сиалирование. рХГЧ (или препарат рХГЧ) может включать α 2,6-сиалирование в количестве, которое составляет от 20 до 75% общего сиалирования, например 30-60% общего сиалирования, например 35-45% общего сиалирования. рХГЧ (или препарат рХГЧ) может включать α 2,6-сиалирование в количестве, которое составляет от 5 до 35% общего сиалирования, например от 10 до 20% общего сиалирования. Например, 11-55% общего сиалирования может представлять собой α 2,6-сиалирование.

рХГЧ или препарат рХГЧ, полученный посредством способов и клеток по изобретению, может возможно дополнительно включать α 2,8-сиалирование. рХГЧ (или препарат рХГЧ) по изобретению может иметь 5% или менее общего сиалирования, представляющего собой α 2,8-сиалирование, например от 0 до 4%, например 0,1-4% общего сиалирования может представлять собой α 2,8-сиалирование. рХГЧ (или препарат рХГЧ) по изобретению может не иметь α 2,8-сиалирование.

рХГЧ (или препарат рХГЧ), полученный посредством способов и клеток согласно изобретению, может иметь содержание сиаловой кислоты (количество сиалирования на молекулу ХГЧ) (на основе массы белка, а не масс белка плюс углеводов) 6% или более (например, от 6 до 15%, например от 7 до 13%, например от 8 до 12%, например от 11 до 15%, например от 12 до 14%) по массе.

рХГЧ (или препарат рХГЧ) может продуцироваться или экспрессироваться в клеточной линии человека, например клеточной линии PER.C6®, клеточной линии HT1080 и так далее. рХГЧ (или препарат рХГЧ) может продуцироваться или экспрессироваться в полученной из человеческих клеток клеточной линии или в модифицированной клеточной линии человека, например, полученной из клеточной линии PER.C6®, или модифицированной клеточной линии PER.C6®, модифицированной клеточной линии HT1080 или из клеточной линии, полученной из HT1080, и так далее. В предпочтительном примере рХГЧ продуцируется или экспрессируется в клеточной линии PER.C6®, полученной из PER.C6® клеточной линии или модифицированной клеточной линии PER.C6®. рХГЧ, который продуцируется или экспрессируется в клеточной линии человека (например, клеточной линии PER.C6®, клеточной линии

HT1080, клеточной линии GT-5s), будет включать некоторые $\alpha 2,6$ -связанные сиаловые кислоты ($\alpha 2,6$ -сиалирование), обеспечиваемые действием эндогенной сиалилтрансферазы [клеточной линии], и будет включать некоторые $\alpha 2,3$ -связанные сиаловые кислоты ($\alpha 2,3$ -сиалирование), обеспечиваемые действием эндогенной сиалилтрансферазы [клеточной линии]. Клеточная линия может быть модифицирована с использованием $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазы. Альтернативно или дополнительно, клеточная линия может быть модифицирована с использованием $\alpha 2,6$ -сиалилтрансферазы. Это делает более простым (и более эффективным) способ производства, так как манипуляция и контроль, например, среды для выращивания клеток для сохранения сиалирования, могут быть менее критическими, чем у известных процессов. Способ также может быть более эффективным, так как продуцируется небольшое количество основного рХГЧ по сравнению с продуцированием известных продуктов рХГЧ; продуцируется более кислый рХГЧ, и отделение/удаление основного ХГЧ является менее проблематичным.

рХГЧ может быть получен с использованием $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазы, например продуцирован с использованием человеческой клеточной линии, модифицированной с использованием $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазы. рХГЧ может включать $\alpha 2,6$ -связанные сиаловые кислоты ($\alpha 2,6$ -сиалирование), обеспечиваемые действием эндогенной сиалилтрансферазы. рХГЧ может быть получен с использованием $\alpha 2,3$ - и/или $\alpha 2,6$ -сиалилтрансферазы, например получен с использованием человеческой клеточной линии, модифицированной с использованием $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазы и/или $\alpha 2,6$ -сиалилтрансферазы.

Согласно настоящему изобретению в еще одном аспекте предложен рекомбинантный ХГЧ или препарат рекомбинантного ХГЧ, как описано в этом документе, который продуцируется или экспрессируется посредством способов, описанных в этом документе.

Структура рХГЧ содержит гликановые группировки. Разветвление может происходить таким образом, что гликан может иметь 1, 2, 3, 4 или более концевых остатков сахаров или "антенн", что хорошо известно в данной области техники. рХГЧ согласно аспектам изобретения может иметь гликаны с моноантенными, и/или диантенными, и/или триантенными, и/или тетраантенными гликановыми структурами. рХГЧ может включать моноантенные, и/или биантенные, и/или триантенные, и/или тетраантенные гликановые структуры, например, в относительных количествах, как изложено ниже: от 0,1 до 3% моноантенных; от 65 до 85% биантенных; от 15 до 25% триантенных и от 0,5 до 1,5% тетраантенных (например, как показано путем WAX-анализа заряженных гликанов).

Согласно настоящему изобретению в еще одном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный ХГЧ (рХГЧ), имеющий $\alpha 2,3$ -сиалирование и $\alpha 2,6$ -сиалирование, где рекомбинантный ХГЧ получен посредством способов и/или клеток, раскрытых в этом документе. рХГЧ может иметь содержание сиаловой кислоты [выраженное в виде отношения молей сиаловой кислоты к молям белка] от 12 до 15,5 моль/моль, например от 12 до 14,9 моль/моль (например, как изложено выше). рХГЧ может иметь содержание сиаловой кислоты от 12,5 до 14,5 моль/моль, например содержание сиаловой кислоты от 12,8 до 13,2 моль/моль. Предпочтительно рХГЧ согласно изобретению имеет содержание сиаловой кислоты 13 моль/моль.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать ФСГ и/или ЛГ.

ФСГ может быть получен посредством любого способа, известного в данной области техники. ФСГ при использовании в этом документе включает полученный из человеческих клеток и рекомбинантный ФСГ. Полученный из человеческих клеток ФСГ может быть очищен от любого соответствующего источника (например, мочи) посредством любого способа известного в данной области техники. ФСГ может представлять собой рекомбинантный ФСГ, например экспрессированный в человеческой клеточной линии. Способы экспрессии и очистки рекомбинантного ФСГ хорошо известны в данной области техники.

ЛГ может быть получен посредством любого способа, известного в данной области техники. ЛГ, при использовании в этом документе, включает полученный из человеческих клеток и рекомбинантный ЛГ. Полученный из человеческих клеток ЛГ может быть очищен от любого соответствующего источника (например, мочи) посредством любого способа, известного в данной области техники. Способы экспрессии и очистки рекомбинантного ЛГ известны в данной области техники.

Фармацевтическая композиция может быть предназначена для лечения или для применения в лечении, бесплодия, например для применения, например, во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ), стимуляции овуляции или внутриматочной инсеминации (ВМИ). Фармацевтическая композиция может быть предназначена для инициирования, или для применения в инициировании окончательного созревания/овуляции и лютеинизации, стимулировании развития фолликулов у женщин с серьезным дефицитом ЛГ и ФСГ, и/или в поддержании функции желтого тела (рХГЧ/рЛГ). Фармацевтическая композиция быть предназначена для индуцирования, или для применения в индуцировании, монофолликулярного роста у женщин с ановуляцией II типа по классификации ВОЗ (например, рХГЧ с рЛГ), для усиления мультифолликулярного ответа с помощью ЛГ-прайминга у пациенток, проходящих СГЯ (контролируемую гиперстимуляцию яичников) (например, рХГЧ с рЛГ), и для дополнения к СГЯ для улучшения коэффициентов имплантации/беременности (например, рХГЧ с рЛГ) и/или повышения коэффициентов беременности во вспомогательных репродуктивных технологиях. Фармацевтическая композиция быть

предназначена для предупреждения, или для применения в предупреждении выкидышей, и/или предупреждении преждевременных родов. Фармацевтическая композиция быть предназначена для лечения, или для применения в лечении, эндометриоза.

Фармацевтическую композицию можно использовать, например, при медицинских показаниях, когда используют известные препараты ХГЧ. В настоящем изобретении также предложено применение рХГЧ и/или препарата рХГЧ, описанного здесь (согласно аспектам изобретения), для изготовления, или в изготовлении, лекарственного средства для лечения бесплодия.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде хорошо известных композиций для любого пути введения лекарственного средства, например перорального, ректального, парентерального, трансдермального (например, методика с пластырями), внутривенного, внутримышечного, подкожного, интрацестерального, интравагинального, внутрибрюшинного, местного (порошки, мази или капли) или в виде буккального или назального спрея. Обычная композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, такой как водный раствор, нетоксичные эксципиенты, включая соли и консерванты, буферы и тому подобные, как описано в пятнадцатом издании Remington's Pharmaceutical Sciences (Matt Publishing Company, 1975), на стр. 1405-1412 и 1461-87 и в 14-м издании Национального формуляра XIV (American Pharmaceutical Association, 1975), среди прочего. Примеры подходящих водных и неводных фармацевтических носителей, разбавителей, растворителей или средств доставки включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и подобные), карбоксиметилцеллюлозу и их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Композиции по настоящему изобретению также могут содержать добавки, такие как, без ограничения, консерванты, увлажняющие средства, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Антибактериальные и противогрибковые агенты могут быть включены для предупреждения роста микробов и включают, например, м-крезол, бензиловый спирт, парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту и тому подобные. Кроме того, может быть желательно включать изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобные.

В некоторых случаях для осуществления пролонгированного действия желательно замедлять поглощение ХГЧ (и других активных ингредиентов, если имеются) после подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно осуществить путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного вещества с плохой растворимостью в воде. Скорость поглощения ХГЧ тогда зависит от его скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. Альтернативно, отсроченное поглощение парентерально введенной комбинированной формы ХГЧ достигается путем растворения или суспендирования комбинации ХГЧ в средстве доставки в виде масла. Инъецируемые формы депо могут быть изготовлены путем образования матриц микроинкапсулирования ХГЧ (и других агентов, если имеются) в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от отношения ХГЧ к полимеру и от природы конкретного используемого полимера скорость высвобождения ХГЧ можно регулировать. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поливинилпирролидон, поли(ортоэфиры), поли(ангидриды) и так далее. Инъецируемые депо-композиции также готовят путем включения ХГЧ в липосомы или микроэмульсии, которые являются совместимыми с тканями организма. Инъецируемые композиции можно стерилизовать, например, посредством фильтрации через задерживающий бактерии фильтр или путем включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной инъецируемой среде непосредственно перед применением. Инъецируемые композиции могут поставляться в любом подходящем контейнере, например флаконе, предварительно заполненном шприце, картриджах для инъекций и т.п.

Препараты (например, инъецируемый препарат) могут поставляться в виде продукта, имеющего фармацевтические композиции, содержащие ХГЧ (возможно с ФСГ, ЛГ и т.д.). Если имеет место более чем один активный ингредиент (т.е. ХГЧ и, например, ФСГ или ЛГ), они могут быть подходящими для введения раздельно или вместе. При введении раздельно введение может быть последовательным. Продукт может поставляться в любой подходящей упаковке. Например, продукт может содержать ряд предварительно заполненных шприцев или флаконов, содержащих либо ХГЧ, ФСГ, либо комбинацию и ФСГ и ХГЧ. Шприцы или флаконы могут быть упакованы в блистерную упаковку или другие средства для сохранения стерильности. Продукт может возможно содержать инструкции для применения композиций ХГЧ и ФСГ.

рН и точную концентрацию различных компонентов фармацевтической композиции регулируют в соответствии с обычной практикой в этой области. См. GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7th ed. В предпочтительном воплощении композиции по изобретению поставляются в виде композиций для парентерального введения. Обычные способы получения парентеральных композиций являются известными в данной области техники и описаны в REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, *supra*, at pages 780-820. Парентеральные композиции могут поставляться в жидком препарате или в виде твердого вещества, которое будут смешивать со стерильной инъецируемой средой непосредственно перед введением. В одном воплощении парентеральные композиции поставляются в форме единицы дозирования для облегчения введения и

однородности единиц дозирования.

Подробное описание изобретения

Ниже следует более подробное описание изобретения со ссылкой на следующие примеры и на прилагаемые графические материалы, в которых

на фиг. 1 показаны последовательность нуклеиновой кислоты и последовательность с дериватизированными аминокислотами оптимизированной α -последовательности ХГЧ;

на фиг. 2 - последовательность нуклеиновой кислоты и последовательность с дериватизированными аминокислотами β -последовательности ХГЧ;

на фиг. 3 - последовательность нуклеиновой кислоты и последовательность с дериватизированными аминокислотами ST3GAL4;

на фиг. 4 - плазмидная карта для вектора экспрессии α/β пХГЧ (phCG);

на фиг. 5 - вектор экспрессии α 2,3-сиалилтрансферазы (ST3GAL4);

на фиг. 6 - детекция изоформ рХГЧ, окрашенных Кумасси синим, посредством IEF (изоэлектрического фокусирования) в композициях по изобретению (дорожки 4, 5, 6 и 7, 15 мкг на дорожку); в произведенной в СНО композиции известного уровня техники, Ovitrelle (дорожка 2, 15 мкг); и в человеческом продукте, полученном из мочи беременных женщин Novarel (дорожка 3, 15 мкг); маркер ИЭФ (дорожка 1 (pI сверху: 7,0, 6,8, 6,5, 6,0, 5,1 и 4,75 соответственно)); и

на фиг. 7 сопоставляется концентрация ХГЧ ("альфа- β ХГЧ") и свободной β -цепи ("бета ХГЧ"), продуцированной с применением клеток по изобретению, включая "оптимизированную" нуклеиновую последовательность альфа-субъединицы, в сравнении с концентрацией ХГЧ ("альфа-бета ХГЧ") и свободной β -цепи ("бета ХГЧ"), продуцированной в клетках сравнительного примера, включая альфа-субъединицу ДТ (дикого типа).

Примеры 1-7.

Обзор процесса создания клеточной линии.

Отдельную плазмиду, несущую α - и β -цепи ХГЧ, где каждая управляется отдельным промотором CMVie, трансфицировали в клетки PER.C6® путем электропорации.

Эта плазида несла устойчивую к неомицину генную кассету (фиг. 4), позволяющую осуществлять селекцию трансфектантов, используя G418 (Geneticin). Пулы трансфектантов выращивали и затем подвергали клонированию методом серийных разведений в 96-луночных планшетах при селекции с G418. Клональные линии выращивали и колонии с высокой экспрессией идентифицировали на основе титра ХГЧ в супернатанте клеточной культуры.

Выбирали пять основных клонов, основываясь на высокой продуктивности, и затем каждый трансфицировали второй плазмидой, экспрессирующей ген α 2,3-сиалилтрансферазы ST3GAL4, а также с селективным маркером гигромицина (фиг. 5). Каждый из пяти трансфекционных пулов выращивали и супернатанты клеточных культур оценивали на концентрацию ХГЧ и *in vivo* фармакокинетику (ФК).

Перспективные пулы затем подвергали новому циклу клонирования методом серийных разведений. Полученные клоны выращивали и супернатанты клеточных культур оценивали на концентрацию ХГЧ и экспонированную галактозу на белке ХГЧ (путем ИФА с использованием лектина). Клоны с низким уровнем экспонированной галактозы подвергали дополнительным анализам, включая *in vivo* ФК. Клоны, которые продуцировали ХГЧ с оптимальными фармакокинетическими (ФК) профилями, имеющие низкий уровень экспонированной галактозы и экспрессирующие белок с высокими уровнями, оценивали и выбирали по продуктивности и характеристикам роста.

Пример 1. Селекция последовательностей и плазмидные векторы.

Кодирующая область гена альфа-полипептида ХГЧ показана на фиг. 1. Кодирующая область гена альфа-полипептидной последовательности ХГЧ называется в этом документе SEQ ID NO: 1.

Кодирующую область гена бета-полипептида ХГЧ использовали согласно Fiddes and Goodman (1980). Последовательность внесена в банк данных как NP_000728 и согласуется с белковыми последовательностями CGbeta3, CGbeta5 и CGbeta7. Последовательность называется в этом документе SEQ ID NO: 2.

Кодирующую область гена бета-галактозид-альфа-2,3-сиалилтрансферазы 4 (α 2,3-сиалилтрансфераза, ST3GAL4) использовали согласно Kitagawa and Paulson (1994). Последовательность внесена в банк данных как L23767 и называется в этом документе SEQ ID NO: 3.

Использовали две плазмиды: первая, phCG, соэкспрессирует α - и β -цепи ХГЧ; и вторая экспрессирует ген сиалилтрансферазы ST3GAL4.

Пример 2а. Конструирование вектора экспрессии ХГЧ.

рХГЧ представляет собой синтетическую α -цепь ХГЧ, оптимизированную для частоты использования кодона в клетках млекопитающих, включающую нативный сигнальный пептид альфа ХГЧ. Она может быть сконструирована посредством способов, хорошо известных в данной области техники.

Кодирующую последовательность альфа-полипептида ХГЧ (SEQ ID NO: 1) и бета-полипептид ХГЧ (NP_000728, SEQ ID NO: 2) амплифицировали путем ПЦР, используя способы, хорошо известные в данной области техники (см., например, международную заявку на патент, опубликованную как

WO 2011/042688). ДНК альфа рХГЧ расщепляли с помощью BamHI и NheI и вставляли в сайты BamHI и NheI на управляемом CMV векторе экспрессии млекопитающих (вектор pcDNA3002Neo, Crucell). Это располагает ген в правильной ориентации для экспрессии, управляемой промотором CMVie с сигналом полиА (полиаденилирования) гормона роста крупного рогатого скота (BGH) в прямом направлении. Нативный ген бета ХГЧ, включающий нативный сигнальный пептид, расщепляли с помощью рестриктаз AscI и HpaI и вставляли в сайты AscI и HpaI так, чтобы экспрессия могла управляться вторым промотором CMVie с дополнительным сигналом полиА BGH в прямом направлении. Каркас вектора также включал маркер устойчивости к неомицину, а также элементы, требующиеся для селекции и репликации в прокариотических клетках. Вектор амплифицировали и секвенировали, используя общепринятые способы, известные в данной области техники. Последовательности оптимизированной α -цепи ХГЧ и нативной (дикого типа) β -цепи изображены на фиг. 1 и 2 соответственно.

Все колонии, выбранные для секвенирования, содержали правильные последовательности согласно SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. Плазмидные A+B рХГЧ селектировали для трансфекции (фиг. 4).

Пример 2б. Конструирование вектора экспрессии ST3.

Ген ST3GAL4 экспрессируется в рST3. Кодировующую последовательность бета-галактозид-альфа-2,3-сиалилтрансферазы 4 (ST3, L23767, SEQ ID NO: 3, фиг. 3) амплифицировали путем ПЦР, используя комбинацию праймеров 2,3STfw и 2,3STrev.

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCTCTGCAGGCTGGAAGC-3'

2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

Полученную амплифицированную ДНК ST3 расщепляли с помощью рестриктаз BamHI и AflIII и вставляли в сайты BamHI и AflIII на управляемом CMV векторе экспрессии млекопитающих, несущем маркер устойчивости к гигромицину (вектор pcDNA3002Neo), так, чтобы она располагалась в прямом направлении немедленно-раннего промотора CMV и в обратном направлении последовательности поли-А BGH. Каркас вектора также включал маркер устойчивости к гигромицину, а также элементы, требующиеся для селекции и репликации в прокариотических клетках. Вектор амплифицировали, как описано ранее, и секвенировали. Клон рST3#1 (фиг. 5) содержал правильную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 и был селектирован для трансфекции.

Пример 3. Трансфекция плазмиды.

Плазмидный пХГЧ (фиг. 4), который имеет один сайт PvuI, расположенный в прокариотическом гене бета-лактамазы, линеаризовали с PvuI (New England Biolabs, номер по каталогу R0150). Линеаризованную плазмидную ДНК трансфицировали в клетки PER.C6® следующим образом.

Клеточные культуры поддерживали в полной среде PERMAB (CD4PERMAB (Hyclone, номер по каталогу SH30871.01), дополненной L-глутамином до конечной концентрации 3 мМ (Invitrogen, номер в каталоге 25030-123) и Pluronic F68 в конечной концентрации 1,0 г/л (Invitrogen, номер по каталогу 24040-032), в 250 мл колбах Эрленмейера. Клетки поддерживали во встряхивателе-инкубаторе (KuhnerClimo-shaker ISF1-X), установленном на 100 об/мин, 5% CO₂ и 37°C, в течение по меньшей мере 14 суток до трансфекции. За 48 ч до трансфекции клетки переносили в свежую среду с плотностью $0,5 \times 10^6$ клеток/мл.

В сутки трансфекции клетки подсчитывали в Beckman Coulter ViCell XR, чтобы определить плотность клеток и убедиться, что жизнеспособность составляла не ниже 90%. Клетки собирали путем центрифугирования и ресуспендировали в свежей среде PERMAB перед смешиванием с линеаризованной ДНК рХГЧ. Смесь клетки/ДНК подвергали воздействию электрошока в камере электропоратора, установленном на 250 В, в течение 5 мс перед быстрым переносом в 10 мл предварительно нагретой среды PERMAB. Этот процесс повторяли всего 6 раз, и все 6 трансфекции объединяли в одной T-175 см² колбу с тканевой культурой. Колбу помещали в статичный инкубатор, установленный на 37°C, 5% CO₂. Через 48 ч клетки ресуспендировали в подходящем объеме селективной PERMAB (полная среда PERMAB + G418 (125 мкг/мл)) до получения плотности жизнеспособных клеток $0,5 \times 10^6$ /мл.

Культуру пула пассировали два раза в неделю, поддерживая клетки при плотности $0,3 \times 10^6$ клеток/мл в селективной среде до повышения жизнеспособности клеток до выше 50%. В этот момент клетки переводили в культивирование на качалке в 250 мл колбах Эрленмейера. После нескольких недель в культивировании на качалке отбирали образцы супернатанта пула и анализировали на концентрацию ХГЧ. После того как устанавливали, что пул являлся положительным в отношении экспрессии ХГЧ, клетки готовили для клонирования методом серийных разведений.

Суспензию клеток с 0,3 жизнеспособными клетками/мл готовили в среде PERMAB, дополненной G-418 в концентрации 125 мкг/мл. Суспензию клеток дозировали/распределяли в 96-луночные планшеты для тканевой культуры с плоским дном в концентрации 200 мл/луночка и инкубировали в увлажненной атмосфере при 37°C, 5% CO₂ (Binder CB150). Планшеты регулярно сканировали, используя Genetix Clone Select Imager, для отслеживания роста клеток в каждой лунке.

Через две недели идентифицировали 535 лунок, которые содержали активно растущие колонии клеток. Отбирали образцы супернатанта из этих лунок и анализировали на ХГЧ, используя имеющийся в продаже набор (DRG diagnostics HCG ELISA, номер по каталогу EIA1469). На основе результатов этих

анализов всего 162 колонии переносили в 24-луночные планшеты, содержащие 0,5 мл/лунка селективной среды PERMAB. Когда клетки в лунках стали близки к конфлюентности, отбирали образцы супернатанта из каждой из 162 лунок и анализировали на уровне ХГЧ. На основе этих результатов 91 лучше всех экспрессирующую клеточную линию выбирали для размножения в колбах Т-25. Эти клеточные линии снова выращивали до приближения к конфлюентности, момента, в который отбирали образцы супернатанта и анализировали на ХГЧ, как сказано выше. На основе этих результатов 58 лучших экспрессирующих клеточных линий выращивали в колбах Т-75. Анализ удельной скорости продуцирования (SPR) выполняли на каждой из этих 58 клеточных линий посредством способов, известных в данной области техники, и удельную продуктивность выражали в пг/клетка/сутки.

Таким образом, в этом примере плазмиду, включающую α - и β -цепи ХГЧ, трансфицировали в клетки PER.C6®, и трансфектанты селектировали, используя среду, содержащую G418. Растущие колонии клеток проверяли на концентрацию ХГЧ в супернатанте, и колонии, экспрессирующие самый высокий уровень, выращивали дальше. После дальнейших циклов размножения и проверки отбирали для исследований роста и продуктивности 20 клонов, которые экспрессировали ХГЧ. На основе результатов этих исследований 5 клонов отбирали для трансфекции со второй плазмидой, включающей ген ST3GAL4.

Пример 4. Трансфекция с ST3GAL4 плазмидой pST3.

Стабильные клоны генерировали, как описано ранее в примере 3.

Пять лучших клонов, полученных посредством способа, который описан в примере 3, отбирали для трансфекции с ST3GAL4 плазмидой pST3 (см. пример 2, фиг. 3 и 5). Трансфекцию выполняли электропорацией, используя способ, такой же, как описанный в примере 3, за исключением того, что трансформанты селектировали в полной среде PERMAB, дополненной гиграмицином в концентрации 0,5 мкг/мл вместо G418. Используя этот способ, получали пять пулов, которые экспрессировали ХГЧ.

Образцы супернатантов из трансфекционных пулов анализировали на фармакокинетической модели крыс, и на основе этих данных, наряду с данными анализа связывания лектина рецепторами RCA (измерение экспонированной галактозы на цепях ХГЧ), посредством способов, известных в данной области техники, выбирали один пул для дальнейшего клонирования методом серийных разведений.

Это клонирование методом серийных разведений позволило получить более 600 клонов, каждый из которых также проверяли на экспрессию ХГЧ и уровень экспонированной галактозы, как измерено посредством связывания лектина рецепторами RCA. Клоны с самыми низкими уровнями экспонированной галактозы выращивали в дальнейшем, и образцы подвергали *in vivo* ФК и подтверждали данные о связывании лектина. Пять клонов, полученных из одного пула, дополнительно оценивали касательно характеристик роста и продуктивности.

Выращивали каждый из этих клонов и создавали клеточный банк посевного материала, следуя стандартным процедурам криоконсервирования. Запасы клеток из клеточного банка посевного материала размораживали и обнаруживали их жизнеспособными.

Пример 5. Анализ посредством изоэлектрического фокусирования.

Электрофорез определяют как перемещение заряженных молекул в растворителе под действием электрического поля. Подвижность биологической молекулы в электрическом поле будет зависеть от напряженности электрического поля, суммарного заряда молекулы, размера и формы молекулы, ионной силы и свойств среды, через которую молекулы мигрируют.

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) представляет собой способ электрофореза для разделения белков на основе их pI . pI представляет собой pH , при котором белок не имеет суммарного заряда и не будет мигрировать в электрическом поле. Содержание сиаловой кислоты в изоформах ХГЧ незначительно изменяет точку pI для каждой изоформы, что может быть использовано при применении этого способа для визуализации изоформ ХГЧ Per.C6 из каждого клона.

Изоэлектрические точки изоформ ХГЧ, продуцированного Per.C6, анализировали, применяя изоэлектрическое фокусирование. ХГЧ Per.C6 продуцировали, как описано в примере 6.

Образцы ХГЧ Per.C6 разделяли в гелях для ИЭФ Novex®, содержащих 5% полиакриламида, в естественных условиях в градиенте pH 3,0-7,0 в растворе амфолита с pH 3,0-7,0. Белки визуализировали, применяя окрашивание Кумасси синим, используя способы, хорошо известные в данной области техники.

На фиг. 6 показана детекция посредством ИЭФ изоформ рХГЧ, окрашенных Кумасси синим, в композициях, полученных согласно изобретению, продуцированных клонированными клеточными линиями, полученными способом, изложенным в примере 6 (дорожки 4, 5, 6 и 7, 15 мкг на дорожку); в произведенной с помощью СНО композиции известного уровня техники, Ovitrelle (дорожка 2, 15 мкг); и в человеческом продукте, полученном из мочи беременных женщин Novarel (дорожка 3, 15 мкг). Полоски представляют собой изоформы ХГЧ, содержащие различные количества молекул сиаловой кислоты. На фиг. 6 показано, что полученный из человеческой клеточной линии рекомбинантный ХГЧ, сконструированный с $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазой (композиции по изобретению), является более кислым, чем Ovitrelle и ХГЧ из мочи беременных женщин.

На фиг. 7 сравнивают концентрацию ХГЧ ("альфа-бета ХГЧ") и свободной β -цепи ("бета ХГЧ"),

полученных с применением клеток по изобретению (т.е. используя клеточные линии, полученные способом, изложенным в примерах 1-4), которые включают "оптимизированную" альфа-субъединицу, по сравнению с концентрацией ХГЧ ("альфа-бета ХГЧ") и свободной β -цепи ("бета ХГЧ"), продуцированных в клетках сравнительного примера, включающих альфа-субъединицу ДТ (дикого типа). На фиг. 7 показано, что клетки по изобретению экспрессируют высокие количества ХГЧ и небольшой избыток свободной бета-субъединицы. Другими словами, выход и чистота рекомбинантного ХГЧ, продуцированного посредством клеток и способов по изобретению, заметно улучшены.

В табл. А показано процентное содержание свободных субъединиц β -ХГЧ в полуочищенных образцах разных партий ХГЧ, продуцированного с использованием клеток по изобретению (т.е. используя клеточные линии, полученные способом, изложенным в примерах 1-4), которые включают "оптимизированную" альфа-субъединицу ("опт. альфа ХГЧ"), по сравнению с процентным содержанием свободных субъединиц β -ХГЧ в полуочищенных образцах ХГЧ, продуцированного в клетках сравнительного примера, включающих альфа-субъединицу ДТ (дикого типа) ("альфа ХГЧ ДТ"), как определено посредством гидрофобной хроматографии на Phenyl-5PW (ВЭЖХ).

В табл. 1 показано, что клетки по изобретению экспрессируют высокие количества ХГЧ и более низкий избыток свободной бета-субъединицы (5,7-10,6%) по сравнению с клетками, включающими альфа-субъединицу ДТ (64-66%). Другими словами, выход и чистота рекомбинантного ХГЧ, продуцированного посредством клеток и способов по изобретению, заметно улучшены.

Таблица 1

Клон	% свободной β -ХГЧ (PHE – 5PW)
Альфа ХГЧ (1G2) ДТ	64,1
Альфа ХГЧ (1G2) ДТ	66,0
Опт. альфа ХГЧ (13,8)	5,7
Опт. альфа ХГЧ (29)	7,5
Опт. альфа ХГЧ (29)	6,6
Опт. альфа ХГЧ (29)	10,6

Пример 6. Обзор продуцирования и очистки.

Методику разрабатывали для получения рекомбинантного ХГЧ в клетках PER.C6, которые культивировали в суспензии в среде, не содержащей сыворотку. Методика описана ниже, и ее использовали для нескольких продуцирующих ХГЧ клеточных линий PER.C6.

Рекомбинантный ХГЧ из трансфицированного $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазой клона получали, используя способы примеров 1-4, описанные выше.

Клетки выращивали в колбах на качалке в среде 6GRO (SAFC) до достижения плотности клеток от 1×10^6 до 3×10^6 клеток/мл. Клетки переносили в 5 л стеклянный биореактор с механическим перемешиванием с плотностью около 1×10^6 клеток/мл. Биореактор работал в режиме перфузии, используя среду Proper1 (Lonza).

После этого выполняли очистку продукта рХГЧ, используя разные стадии ультрафильтрации, анионо- и катионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию и псевдоаффинную хроматографию, посредством способов, хорошо известных в данной области техники.

В продолжение всех хроматографических способов присутствие иммунореактивного рекомбинантного ХГЧ подтверждали посредством ИФА (DRG EIA 1469) и ИЭФ (пример 5).

Пример 7. Содержание сиаловой кислоты.

Сиаловая кислота представляет собой углевод, связывающий белок, который считается моносахаридом и встречается в комбинации с другими моносахаридами, подобными галактозе, маннозе, глюкозамину, галактозамину и фукозе. Общую сиаловую кислоту на очищенном рХГЧ по изобретению измеряли, используя способ, основанный на способе Stanton et. al. (J. Biochem. Biophys. Methods. 30 (1995), 37-48).

Измеряли общее содержание сиаловой кислоты в образцах рекомбинантного ХГЧ Per.C6, модифицированного $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазой (полученного посредством способов примера 4 и 6), и результаты представлены в табл. 1 ниже [выраженные в виде отношения молей сиаловой кислоты к молям белка].

Пример 8. Биоанализ ХГЧ в соответствии с USP (Фармакопеи США).

Биоанализ ХГЧ выполняли с целью определения удельной активности ХГЧ для каждого из образцов табл. 1 ниже. Активность измеряли в соответствии с USP (USP Monographs: Chorionic Gonadotropin, USPC Official 8/1/09-11/30/09), используя в качестве стандарта Ovitrelle. Ovitrelle имеет биологическую активность 26000 МЕ/мг (Curr. Med. Res. Opin. 2005 Dec; 21(12):1969-76). Допустимый предел составлял более 21000 МЕ ХГЧ/мг. Биологическая активность для образцов рекомбинантных ХГЧ, сконструированных с $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазой из ХГЧ, полученного из человеческой клеточной линии, показана в табл. 2.

Таблица 2

Образец	1	2	3	4	5	6
Содержание сиаловой кислоты (СК) (мкмоль СК/ мкмоль ХГЧ)	13	13	13	13	13	15
Активность МЕ/мг	25363	25009	24904	24623	25645	26623
% Активности (Ovitrelle 26000 МЕ/мг)	97,5	96,2	95,8	94,7	98,6	102,4
Образец	7	8	9	10	11	
Содержание сиаловой кислоты (СК) (мкмоль СК/ мкмоль ХГЧ)	14	14	13	13	13	
Активность МЕ/мг	27227	26142	26539	26181	24230	
% Активности (Ovitrelle 26000 МЕ/мг)	104,7	100,5	102	101	93,2	

Как видно из указанного выше, активность близка к активности Ovitrelle и может быть больше нее (см., например, образец 7).

Ссылки

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

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

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

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

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

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

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

Lowry, PJ, McLean, C, Jones RL and Satgunasingam N. (1976) Purification of anterior anterior pituitary and hypothalamic hormones Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol). 7, 16–21.

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

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

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

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

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

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

Оптимизированная α ХГЧ.

Нуклеотидная последовательность оптимизированной α ХГЧ (SEQ ID NO: 1):

```
1 ATGGACTACT ACCGGAAGTA CGCCGCCATC TTCCTGGTGA CCCTGAGCGT GTTCCTGCAC
61 GTGCTGCACA GCGCCCTGA CGTGCAGGAC TGCCCCGAGT GCACCTGCA GGAAACCCC
121 TTCTTCAGCC AGCCTGGCGC CCCTATCTTG CAGTGCATGG GCTGCTGCTT CAGCAGAGCC
181 TACCCACCCC CCCTGCGGAG CAAGAAACC ATGCTGGTGC AGAAAAACGT GACCAGCGAG
241 AGCACCTGCT GCGTGGCCAA GAGCTACAAC CGGGTGACCG TGATGGGCGG CTTCAAGGTG
301 GAGAACCACA CCGCCTGCCA CTGCAGCACC TGCTACTACC ACAAGTCCT
```

Последовательность белка оптимизированной альфа ХГЧ:

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

Бета-полипептид человеческого хорионического гонадотропина.

Номер доступа NP_000728.

Нуклеотидная последовательность β ХГЧ (SEQ ID NO: 2).

Нуклеотидная последовательность:

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

Последовательность белка β ХГЧ:

```
1 MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT
61 MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC
121 GGP KDHLPTC DDP RFQDSSS SKAPPSLP S RLPGPSDT PILPQ
```

β -галактозид- α -2,3-сиалилтрансфераза 4.

Номер доступа L23767.

Нуклеотидная последовательность ST3GAL4 (SEQ ID NO: 3):

```

1 ATGTGTCCTG CAGGCTGGAA GTCCTGGCC ATGTTGGCTC TGGTCCTGGT CGTCATGGTG
61 TGGTATTCCA TCTCCCGGA AGACAGGTAC ATCGAGCTTT TTTATTTTCC CATCCCAGAG
121 AAGAAGGAGC CGTGCCTCCA GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG CCTCTAAGCT CTTTGGCAAC
181 TACTCCCGGG ATCAGCCCAT CTTCTGCGG CTTGAGGATT ATTTCTGGGT CAAGACGCCA
241 TCTGCTTACG AGCTGCCCTA TGGGACCAAG GGGAGTGAGG ATCTGCTCCT CCGGGTGCTA
301 GCCATCACCA GTCCTCCAT CCCCAAGAAC ATCCAGAGCC TCAGGTGCCG CCGCTGTGTG
361 GTCGTGGGGA ACGGGCACCG GCTGCGGAAC AGCTCACTGG GAGATGCCAT CAACAAGTAC
421 GATGTGGTCA TCAGATTGAA CAATGCCCCA GTGGCTGGCT ATGAGGGTGA CGTGGGCTCC
481 AAGACCACCA TCGCTCTCTT CTACCCTGAA TCTGCCCACT TCGACCCCAA AGTAGAAAAC
541 AACCAGACA CACTCCTCGT CTTGGTAGCT TTCAAGGCAA TGGACTTCCA CTGGATTGAG
601 ACCATCCTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCGA AAGGGTTTCT GGAACAGCC TCCCCTCATC
661 TGGGATGTCA ATCCTAAACA GATTCGGATT CTCAACCCT TCTTCATGGA GATTGCAGCT
721 GACAACTGC TGAGCCTGCC AATGCAACAG CCACGGAAGA TTAAGCAGAA GCCCACCACG
781 GGCTGTGG CCATCACGCT GGCCTCCAC CTCTGTGACT TGGTGACAT TGGCGGCTTT
841 GGCTACCCAG ACGCTACAA CAAGAAGCAG ACCATTCACT ACTATGAGCA GATCACGCTC
901 AAGTCCATGG CGGGGTCAGG CCATAATGTC TCCAAGAGG CCCTGGCCAT TAAGCGGATG
961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCACG TCCTTCTGA

```

Последовательность белка ST3GAL4:

```

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

```

Оптимизированная α -цепь ХГЧ.

Нуклеотидная последовательность оптимизированной α -цепи ХГЧ (SEQ ID NO: 4):

```

1 GCCCCGACG TGCAGGACTG CCCCAGTGC ACCCTGCAGG AAAACCCCTT CTTAGCCAG
61 CCTGGCGCCC CTATCCTGCA GTGCATGGGC TGCTGCTTCA GCAGAGCCTA CCCCACCCC
121 CTGCGGAGCA AGAAAACCAT GCTGGTGAG AAAACGTGA CCAGCGAGAG CACCTGCTGC

181 GTGGCCAAGA GCTACAACCG GGTGACCGTG ATGGGCGGCT TCAAGGTGGA GAACCACACC

241 GCCTGCCACT GCAGCACCTG CTACTACCAC AAGTCCT

```

Последовательность белка оптимизированной α -цепи ХГЧ:

```

1 APDVQDCPEC TLQENPFESQ PGAPILQCMG CCFSRAYPTP LRSKKTMLVQ KNVTSSESTCC

61 VAKSYNRVTV MGGFKVENHT AHCSTCYH KS

```

α -полипептид ХГЧ.

Номер доступа AN007338.

Нуклеотидная последовательность α ХГЧ (SEQ ID NO: 5):

```

1 ATGGATTACT ACAGAAAATA TGCAGTATC TTTCTGGTCA CATTGTCGGT GTTTCTGCAT
61 GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGAGGAT TGCCAGAAAT GCACGCTACA GGAACCCCA
121 TTCTTCTCCC AGCCGGGTGC CCCAATACTT CAGTGCATGG GCTGCTGCTT CTCTAGAGCA
181 TATCCCACTC CACTAAGGTC CAAGAAGACG ATGTTGGTCC AAAAGAACGT CACCTCAGAG
241 TCCACTTGCT GTGTAGCTAA ATCATATAAC AGGGTCACAG TAATGGGGGG TTTCAAAGTG
301 GAGAACCACA CGGCGTGCCA CTGCAGTACT TGTATTATC ACAAATCTTA A

```

Последовательность белка α ХГЧ

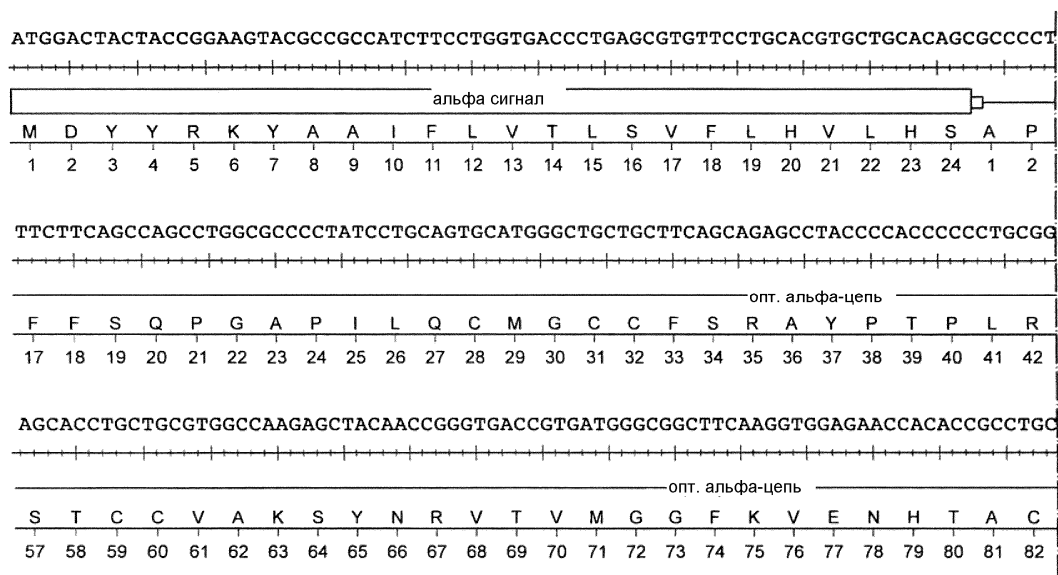
```

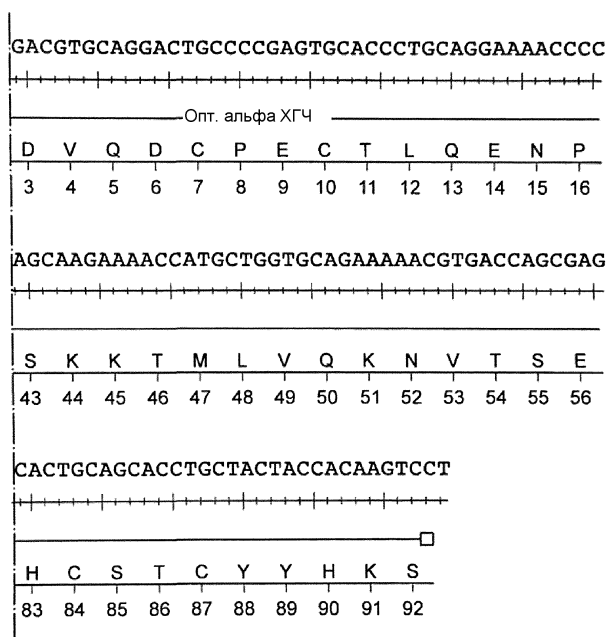
1 MDYYRKYAAI FLVTLVSVFLH VLHSAAPDVQD CPECTLQENP FFSQPGAPIL QCMGCCFSRA
61 YPTPLRSKKT MLVQKNVTSE STCCVAKSYN RVTVMGGFKV ENHTACHCST CYHYHS

```

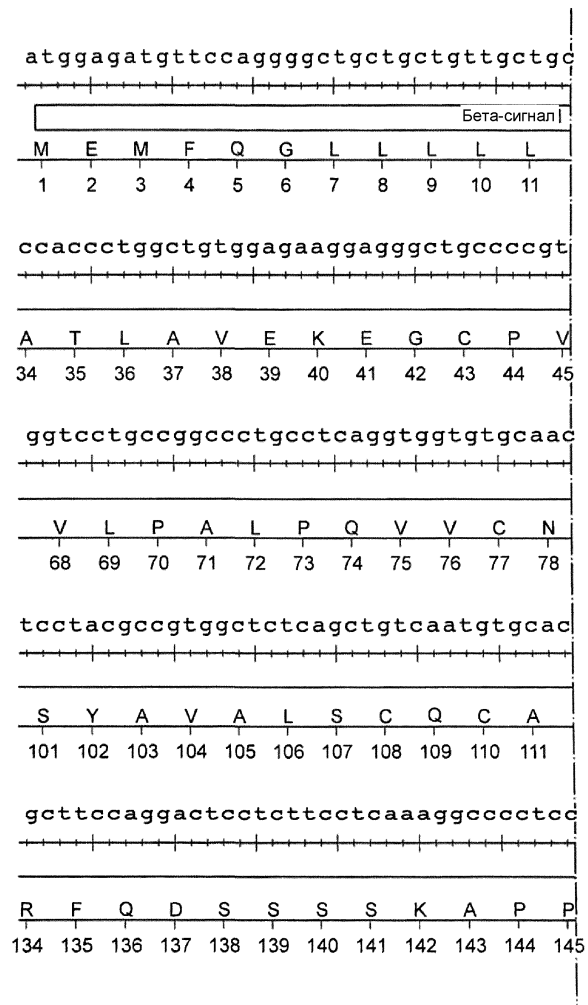
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

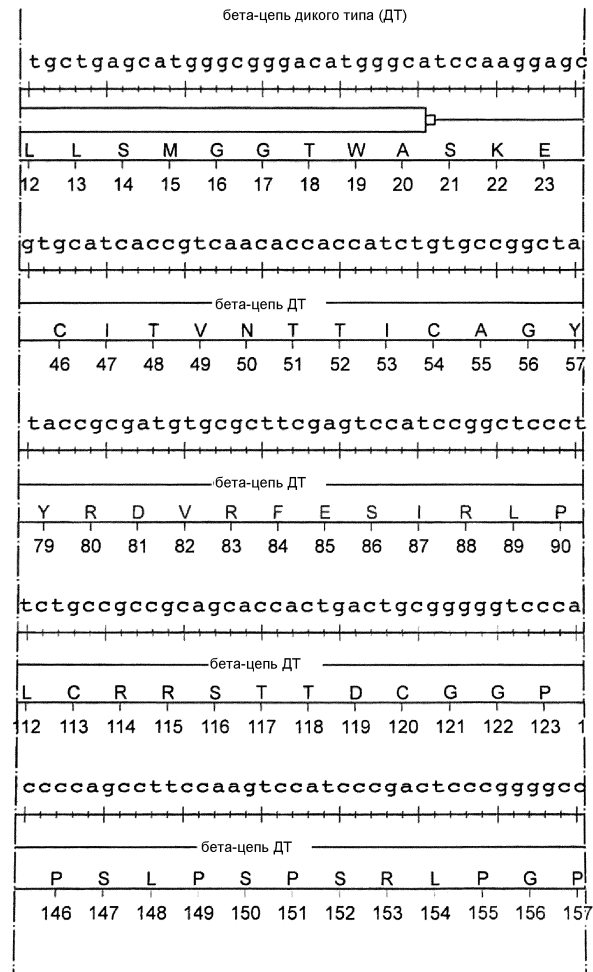
1. Нуклеиновая кислота, кодирующая α -цепь ХГЧ (хорионический гонадотропин человека), включающая последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1.
2. Нуклеиновая кислота, кодирующая α -цепь ХГЧ (хорионический гонадотропин человека), включающая последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 4.
3. Нуклеиновая кислота, кодирующая α -цепь ХГЧ (хорионический гонадотропин человека), включающая последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 97% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1.
4. Нуклеиновая кислота, кодирующая α -цепь ХГЧ (хорионический гонадотропин человека), включающая последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 97% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4.
5. Клетка, отличающаяся тем, что она содержит интегрированную в ее геном последовательность, кодирующую α -цепь ХГЧ (хорионический гонадотропин человека), выбранную из последовательности согласно SEQ ID NO: 1; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 96,5% с последовательностью SEQ ID NO: 1; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% с последовательностью SEQ ID NO: 1; последовательности SEQ ID NO: 4; последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 96,5% с последовательностью SEQ ID NO: 4; и последовательности, которая имеет гомологию по меньшей мере 97% с последовательностью SEQ ID NO: 4.
6. Клетка по п.5, представляющая собой клетку PER.C6®, такую как клетка PER.C6®, депонированная под № 96022940 в ECACC (Европейской коллекции клеточных культур животных).
7. Клетка APER.C6®, такая как клетка PER.C6®, депонированная под № 96022940 в ECACC, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит интегрированную в ее геном последовательность, кодирующую α -цепь ХГЧ.
8. Клетка по любому из пп.5-7, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит интегрированную в ее геном кДНК, кодирующую α -2,3-сиалилтрансферазу.
9. Клетка по любому из пп.5-8, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит интегрированную в ее геном последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую β -цепь ХГЧ.
10. Способ получения рекомбинантного белка в клетке, включающий культивирование клетки по любому из пп.5-9 в подходящей среде и выделение рекомбинантного белка из указанной клетки и/или указанной среды.
11. Способ получения рекомбинантного ХГЧ в клетке, включающий культивирование клетки в подходящей среде и выделение рекомбинантного белка (ХГЧ) из указанной клетки и/или указанной среды, где клетка представляет собой клетку PER.C6®, содержащую интегрированную в ее геном последовательность, кодирующую α -цепь ХГЧ.

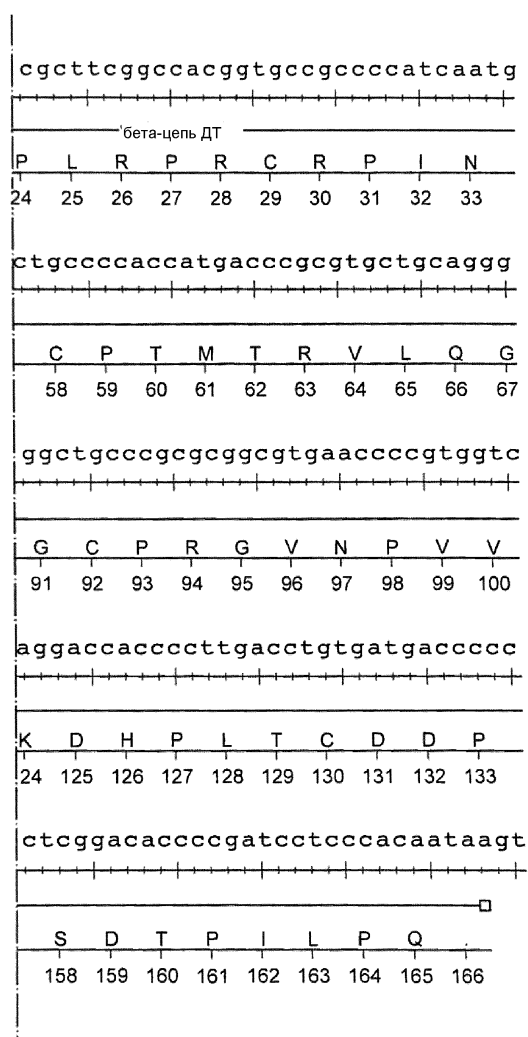




Фиг. 1







Фиг. 2

gctagcggttatctgcagaattccaccacactggactagt

atctcccgggaagacaggtacatcgagcttttttatttt

I S R E D R Y I E L F Y F

24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
gatcagcccatcttctcgcggttgaggattatttctgg

D Q P I F L R L E D Y F W

64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76
agctcctccatccccaagaacatccagagcctcaggtgc

S S S I P K N I Q S L R C

104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116
atcagattgaacaatgccccagtggttggtatgaggggt

I R L N N A P V A G Y E G

144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156
aactcctcgtcctggtagctttcaaggcaatggacttc

T L L V L V A F K A M D F

184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196
aatcctaacaagattcggattctcaacccttcttcatg

N P K Q I R I L N P F F M

224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236
gccatcacgctggccctccacctctgtgacttggtgcac

A I T L A L H L C D L V H

264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276
gcggggtcaggccataatgtctcccaagaggccctggcc

A G S G H N V S Q E A L A

304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316

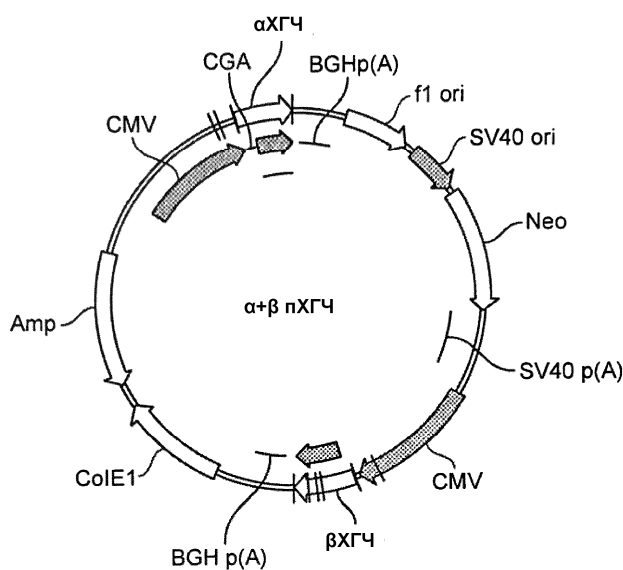
ggatccgccaccatgtgtcctgcaggtggaagctcctggcc																													
M C P A G W K L L A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10																													
cccatcccagagaagaagagccgtgcctccagggtagggca																													
ST3 дикого типа																													
P I P E K I E P C L Q G E A 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50																													
gtcaagacgccatctgtctacgagctggcctatgggaccaag																													
ST3 дикого типа																													
V K T P S A Y E L P Y G T K 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90																													
cgccgctgtgtggtcgtggggaacgggcaccggctgcggaac																													
ST3 дикого типа																													
R R C V V V G N G H R L R N 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130																													
gacgtgggctccaagaccaccatgcgtctcttctaccctgaa																													
ST3 дикого типа																													
D V G S K T T M R L F Y P E 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170																													
cactggattgagaccatcctgagtataagaagcgggtgcga																													
ST3 дикого типа																													
H W I E T I L S D K K R V R 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210																													
gagattgcagctgacaaactgctgagcctgccaatgcaacag																													
ST3 дикого типа																													
E I A A D K L L S L P M Q Q 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250																													
attgccggctttggctaccagacgcctacaacaagaagcag																													
ST3 дикого типа																													
I A G F G Y P D A Y N K K Q 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290																													
attaagcggatgctggagatgggagctatcaagaacctcacg																													
ST3 дикого типа																													
I K R M L E M G A I K N L T 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330																													

```

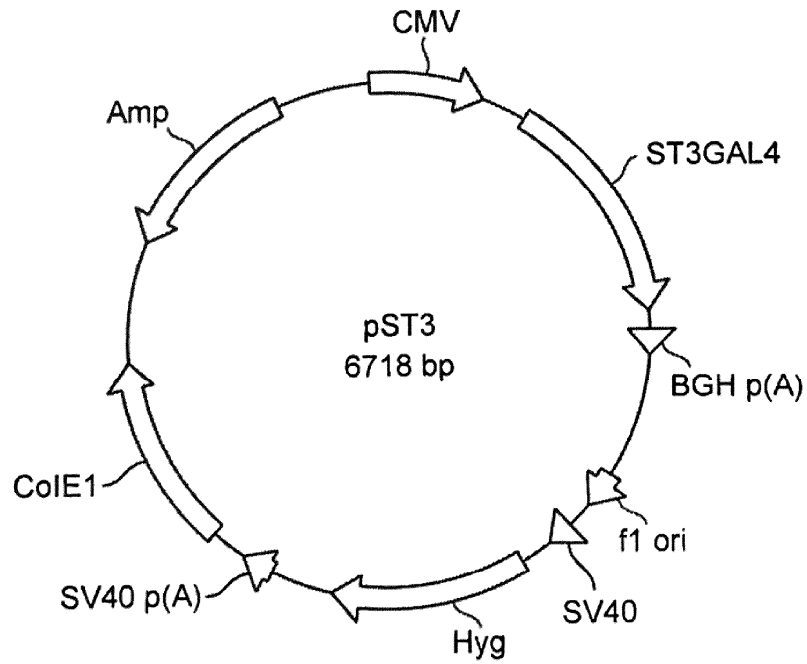
atgttggtctctggctcctggctcgatcgtggtgtggtattcc 1320
ST3 дикого типа
M L A L V L V V M V W Y S
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
gagagcaaggcctctaagctctttggcaactactcccgg 1440
E S K A S K L F G N Y S R
51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63
gggagtgaggatctgctcctccgggtgctagccatcacc 1560
G S E D L L L R V L A I T
91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103
agctcactgggagatgccatcaacaagtacgatgtggtc 1680
S S L G D A I N K Y D V V
131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143
tctgccacttcgaccccaaagtagaaaacaaccagac 1800
S A H F D P K V E N N P D
171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183
aagggtttctggaaacagcctcccctcatctgggatgtc 1920
K G F W K Q P P L I W D V
211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223
ccacggaagattaagcagaagcccaccacgggcctgttg 2040
P R K I K Q K P T T G L L
251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263
accattcactactatgagcagatcacgctcaagtccatg 2160
T I H Y Y E Q I T L K S M
291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303
tccttctgacttaagtttaaacgctgatcagcctcgac 2280
S F
331 332 333
ПолиА BGH

```

Фиг. 3

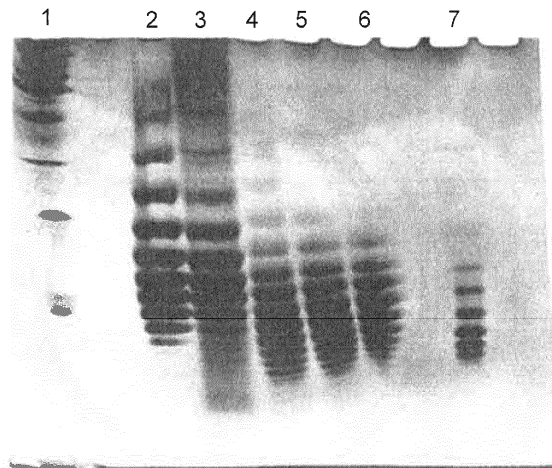


Фиг. 4

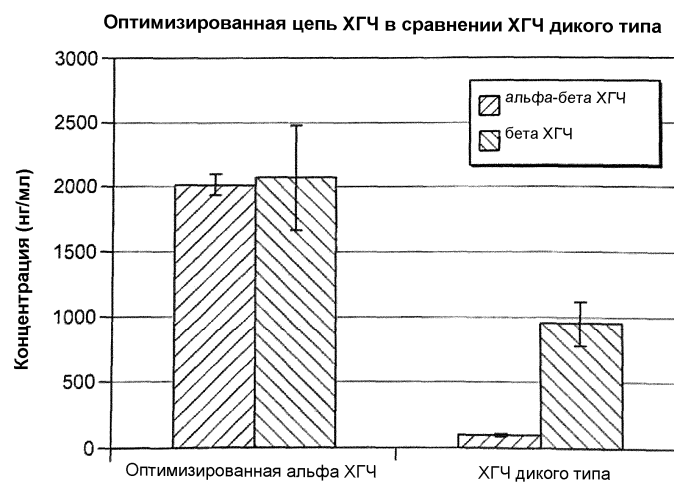


Фиг. 4 и 5: Плазмидные карты векторов экспрессии альфа/бета пХГЧ. CMV= цитомегаловирусный промотор, BGHp(A)= последовательность полиА (полиаденилирования) гормона роста крупного рогатого скота, f1 ori = начало репликации f1, SV40= промотор вакуолизирующего обезьяньего вируса ОВ40, Neo= маркер устойчивости к неомицину, Hyg= маркер устойчивости к гигромицину, SV40 p(A)= последовательность полиаденилирования ОВ40, α ХГЧ= альфа-полипептид хорионического гонадотропина человека, β ХГЧ= бета-полипептид хорионического гонадотропина человека, ST3GAL4= α 2,3-сиалилтрансфераза, ST6GAL1= α 2,6-сиалилтрансфераза, ColE1= начало репликации ColE1, Amp= маркер устойчивости к ампициллину.

Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2