

Галузь, до якої належить винахід

Цей винахід має відношення до галузі гонадотропінів і, зокрема, до їх застосування у методиках допоміжної репродукції (ART), індукції овуляції (OI), внутрішньоматкового запліднення (IUI) та лікування безплідних пацієнтів-чоловіків.

Передумови створення винаходу

Гонадотропіни являють собою групу гетеродимерних глікопротеїнів, до якої належать фолікулостимулювальний гормон (FSH), лютеїнізуючий гормон (LH) та хоріонічний гонадотропін (CG). Ці гормони регулюють функцію статевих залоз чоловіка та жінки.

Кожен із цих гормонів складається з двох нековалентно зв'язаних субодиниць: α -субодиниці, яка є спільною для FSH, LH та hCG, і β -субодиниці, яка є інакшою для кожного з них і яка наділяє кожен із цих гормонів біологічною специфічністю.

Кожна субодиниця усіх гонадотропінів має зв'язані з аспарагіном (N-зв'язані) бічні олігосахаридні ланцюги. У однакової α -субодиниці згаданих людських гормонів згадані бічні олігосахаридні ланцюги приєднані у положеннях 52 та 78. У людських FSH та CG два N-зв'язані бічні олігосахаридні ланцюги приєднані до β -субодиниці у положеннях 7 та 24 у FSH та у положеннях 13 та 30 у hCG. У людського LH один олігосахарид є приєднаним до β -субодиниці у положенні 30. hCG додатково має чотири зв'язані із серином (O-зв'язані) бічні олігосахаридні ланцюги, які знаходяться на карбоксильній кінцевій ділянці (СТР).

Як і в усіх глікопротеїнів, у гонадотропінів також відбуваються зміни у структурі олігосахаридів, наслідком чого є сукупність ізоформ, що знаходяться у гіпофізі та у системі кровообігу. Крім того, можливі різні ступені "покриття" (блокування) кінцевого вуглеводу сіловою кислотою. Ізоформи можуть розрізнятися виходячи з їхнього заряду, що значною мірою визначається кількістю та розподілом сіалілованих N-зв'язаних олігосахаридів. Високосіаліловані форми будуть мати більш кислу, ніж середня, рІ, і їх називають "кислими". Менш сіаліловані форми мають порівняно вищі рІ, і їх називають "основними".

Як наслідок їхніх структурних відмінностей, ізоформи гонадотропінів різняться за їхньою здатністю до зв'язування з рецепторами клітин-мішеней. Ступінь сіалілування впливає на їхню здатність до виживання у системі кровообігу. У разі FSH, декілька груп дослідників продемонстрували, що ізоформи високого ступеня кислотності/сіалілування мають значно довші періоди напіввиведення з плазми у тваринних моделях, наприклад, мишей та пацюків [1].

Відомо, що профіль ізоформ ендogenous FSH у людей змінюється. Кислі ізоформи з тривалими періодами напіввиведення *in vivo* та відносно низькою біологічною активністю *in vitro* переважають у сироватці дітей передпубертатного віку, пацієнтів, хворих на гіпогонадізм, та у жінок на фолікулярній стадії. У протилежність до цього, менш сіаліловані, більш основні ізоформи з короткими періодами напіввиведення *in vivo* та порівняно високою біологічною активністю *in vitro* виявляються у період статевого дозрівання, лікування із застосуванням GnRH (гонадотропін-вивільнювального гормону) та приблизно на середині циклу секреції гонадотропіну у жінок [2].

Ізоформи FSH, що мають більший вміст сілової кислоти, циркулюють у системі кровообігу впродовж довгих періодів часу, оскільки кінцеві залишки сілової кислоти "покривають" (блокують) залишки галактози, завдяки чому запобігається взаємодія з асіало-глікопротеїновими рецепторами печінки та видалення з кровообігу [3].

Олігосахаридні (гліканові) складові, приєднані до білків, є розгалуженими, і кожен кінцевий залишок цукру називають антеною. Параметр зарядове число Z" є критерієм того, яка частка антен вуглеводних складових глікопротеїну несе заряджені залишки, наприклад, сілову кислоту. Число Z десіалілованого FSH дорівнює 0. Число Z повністю сіалілованого FSH може знаходитись у межах від приблизно 230 до 280.

Активність препаратів FSH визначають *in vitro* за допомогою аналізу Стілмена-Полі (Steelman-Pohley) шляхом порівняння, за визначених умов, здатності препарату до збільшення маси яєчників нестатевозрілих пацюків зі здатністю міжнародного стандартного/еталонного препарату, відкаліброваного у Міжнародних Одиницях (IU) [4].

Багато груп досліджували роль глікозилювання та сіалілування щодо впливу на біологічний профіль FSH.

Д'Антоніо (D'Antonio) та інші визначали у пацюків-самиць швидкість метаболічного очищення (MCR) кислих (рІ<4,8) та основних (рІ>4,8) ізоформ rhFSH (рекомбінантний людський фолікуло-стимулювальний гормон), які були одержані шляхом хроматофокусування. Як і очікувалось, було встановлено, що основні ізоформи мають більш високу швидкість очищення, ніж кислі ізоформи ($t_{1/2}$ =0,4год для основних, 0,9год для кислих). Під час порівняння кислих та основних форм (на масовій основі) у аналізі Стілмена-Полі було встановлено, що основна ізоформа є значно менш активною, ніж кисла ізоформа (ED_{50} =0,9 мкг/пацюка для основної, 0,3 мкг/пацюка для кислої). У разі порівняння ізоформ на основі IU, різниці між двома ізоформами виявлено не було [5].

Вітт (Vitt) та інші провели *in vitro* дослідження, у якому чотири препарати рекомбінантного людського FSH з різними рІ порівнювали за їхньою здатністю до спричинення збільшення розміру та підвищення продукування естрадіолу (E_2) ізольованими мишачими фолікулами. Було встановлено, що основний FSH (рІ 5,0-5,6) викликав швидший ріст фолікулів, наслідком чого був їхній найбільший максимальний розмір; слідом за ним йшов нефракціонований рекомбінантний FSH. Препарати FSH із середнім значенням ізоелектричної точки (рІ 4,5-5,0) та кислі (рІ 3,6-4,6) залишались позаду як за швидкістю росту, так і за максимальним розміром фолікулів. Було показано, що основний FSH індукував секрецію E_2 раніше та у меншій дозі, ніж інші ізоформи. Фолікули, культивовані з кислим FSH, незалежно від концентрації, секретували концентрації E_2 , що піддавались визначенню, лише після тривалого інкубування [6].

Тімоссі (Timossi) та інші застосовували хроматофокусування для розподілу людського гіпофізарного FSH на сім різних фракцій різного ступеня глікозилювання/кислотності. Одержані фракції перевіряли на їхню здатність до спричинення активації експресії ароматази (необхідної для продукування естрадіолу) та тканинного активатора плазміногену (tPA) *in vitro* у зернистих клітинах яєчника пацюків. Було встановлено, що відношення біоактивності до імунореактивності (B/I) зменшувалось зі зниженням значення рН елюйованих

ізоформ. Автори дійшли висновку, що основні ізоформи демонстрували більшу здатність до індукування експресії мРНК як ароматази, так і tPA, та білків, аніж кислі варіанти [7].

Замбрано (Zambrano) та інші фракціонували людський гіпофізарний FSH на 9 фракцій з різними рІ за допомогою хроматофокусування і випробували клітинні та основні ізоформи за допомогою трьох імуноаналізів та двох аналізів *in vitro*: продукування естрадіолу зернистими клітинами яєчника пацієнтів та продукування цАМФ лінією клітин людського зародка, що експресує рецептор FSH. Відношення активності у біоаналізах до імунореактивності (B/I) зменшувалось зі зниженням рІ ізоформ в усіх біоаналізах [8].

Під час проведення додаткового дослідження Замбрано (Zambrano) та інші порівнювали спорідненість семи різних фракцій кислих та основних ізоформ людського гіпофізарного FSH до зв'язування з гетерологічною рецепторною системою (зернисті клітини яєчника пацієнта) та гомологічною рецепторною системою (лінія людських рекомбінантних клітин HEK-293 (культура клітин нирки людського ембріона), що експресує рецептор людського FSH). Гетерологічний рецептор продемонстрував підвищення спорідненості до зв'язування у разі зростання рІ ізоформ, у той час як у гомологічного рецептора подібного не спостерігалось. Продукування цАМФ клітинами HEK-293 також зростало при підвищенні рІ ізоформ [9].

Дослідження показали, що кисліші форми FSH демонструють найвищу біоактивність *in vivo* (на масовій основі) у разі її визначення за допомогою класичних тестів на зростання маси яєчників [10-11]. Тімоссі (Timossi) та інші висунули припущення, яке полягає у тому, що основні форми можуть бути більш активними *in vivo*, однак із причини коротшого періоду напіввиведення цей ефект не може спостерігатись на прирості маси яєчників пацієнтів. Вони досліджували ефект двох препаратів на системі швидкого реагування: позитивна регуляція активності tPA [12]. Автори дійшли висновку, що rhFSH, який має менш кислий профіль розподілу зарядів, демонструє вищу біоактивність *in vitro*, більшу швидкість плазмового кліренсу і індукує активність ферменту tPA швидше, аніж препарат FSH високого рівня кислотності.

Гонадотропіни відіграють вирішальну роль у репродуктивному циклі, і їх застосування є незамінним у разі методик допоміжної репродукції (ART), наприклад, запліднення *in vitro* (IVF), IVF у поєднанні з інтрацитоплазматичним введенням сперми (IVF/ICSI) та трансплантацією ембріона (ET), а також для індукції овуляції (OI) у ановуляторних пацієнтів, що піддаються заплідненню *in vivo* природним шляхом або шляхом внутрішньоматкового запліднення (IUI).

ART, за типовим варіантом, здійснюють із застосуванням регульованої гіперстимуляції яєчників (COH) для збільшення кількості жіночих гамет [13]. Стандартні режими [14] COH включають фазу регуляції за типом негативного зворотного зв'язку, впродовж якої секреція ендогенних гонадотропінів пригнічується шляхом введення агоніста гонадотропін-вивільнювального гормону (GnRH) з подальшою стимулювальною фазою, під час якої розвиток фолікулів (фолікулогенез) індукується щоденним введенням фолікулостимулювального гормону (FSH), як правило, у дозі приблизно 150-225 МОд на добу. За альтернативним варіантом стимулювання розпочинають після спонтанної або індукованої менструації із запобіганням явища несвоєчасного викиду LH шляхом введення антагоніста GnRH (із започаткуванням, як правило, приблизно на шостий день стимулювальної фази). У разі утворення щонайменше 3 фолікулів >16мм (одного 18мм), вводять одноразову ударну дозу hCG (людського хоріонічного гонадотропіну) (5-10000 МОд) для імітування викиду природного LH та індукування овуляції. Виділення овоцитів здійснюють через 36-38год після ін'єкції hCG.

Індукцію овуляції (OI), за типовим варіантом, здійснюють шляхом щоденного введення FSH у дозі приблизно 75-150 МОд на добу. Може застосовуватись регуляція за типом негативного зворотного зв'язку за допомогою агоністів або антагоністів GnRH, хоча і з меншою частотою, аніж у тому разі, коли показаною є методика допоміжної репродукції (ART). hCG вводять для імітування викиду LH перед заплідненням *in vivo*, яке досягається шляхом звичайного статевого акту або шляхом внутрішньоматкового запліднення (IUI).

Типові режими ART та OI, опис яких було наведено вище, вимагають щоденних ін'єкцій гонадотропінів впродовж тривалого періоду часу, тобто у середньому впродовж 10 днів, а у деяких пацієнтів до 21 дня. Розробка препаратів FSH підвищеної ефективності надала б можливість зниження щоденної дози та/або забезпечила б можливість скорочення періоду лікування (тобто здійснення меншої кількості ін'єкцій) та/або дозволила б робити ін'єкції не так часто. Завдяки цьому режими ART та OI стали б зручнішими та більш прийнятними для пацієнтів.

Крім того, ART із застосуванням запліднення *in vitro* пов'язуються із можливими невдачами. Наприклад, не кожен фолікул дасть життєздатний овоцит, не кожен життєздатний овоцит буде успішно заплідненим і деякі ембріони можуть виявитись нежиттєздатними. Більше того, після завершення відбирання життєздатних ембріонів, невдалими можуть бути перенесення до матки та імплантація. З метою підвищення до максимального рівня шансів народження живої дитини, бажано було б стимулювати ріст та визрівання декількох фолікулів для забезпечення можливості збирання численних овоцитів.

У протилежність до цього, у разі, коли показаною є OI, ціль полягає у одержанні не більше трьох, і за варіантом, якому віддають перевагу, одного основного фолікула (для запобігання багатоплідній вагітності).

Деякі пацієнти, що піддаються ART та OI, у разі лікування стандартними препаратами FSH дають зменшену кількість фолікулів, що ростуть. Це обмежувальний фактор для досягнення успіху у разі здійснення ART, оскільки він обмежує кількість ембріонів, доступних для перенесення та/або кріоконсервування. Це може бути також обмежувальним фактором для досягнення успіху у пацієнтів, що піддаються IUI, де важливим моментом є одержання більше одного фолікула. До пацієнтів, що демонструють реакцію такого типу, належать пацієнти віком понад 33-35 років, пацієнти з підвищеним вихідним рівнем FSH, підвищеним вихідним рівнем естрадіолу або зниженим вихідним рівнем інгібіну b.

У чоловіків сперматогенез залежить від стимулювання клітин Сертолі FSH. Наслідком недостатності FSH є олігоспермія і, звідси, безплідність.

Лікування чоловічої безплідності стандартними препаратами FSH вимагає ін'єкцій FSH тричі на тиждень впродовж періоду часу до 18 місяців.

Розробка препаратів FSH із підвищеною здатністю до стимулювання фолікулогенезу є нагальною необхідністю. Існує також потреба у нових препаратах FSH для лікування пацієнтів зі зниженою реакцією на

FSH. Бажаними є також препарати FSH підвищеної ефективності, що надають можливість скорочення тривалості лікування та/або зниження сумарних доз та/або більш рідкого введення доз у разі ART, OI або чоловічої безплідності.

Короткий виклад суті винаходу

Ціль цього винаходу полягає у наданні гонадотропінового препарату для застосування у індукції овуляції та COH, зокрема, у поєднанні із ART.

За першим аспектом, цей винахід пропонує препарат FSH, де число Z згаданого препарату дорівнює щонайменше або приблизно 200.

За другим аспектом, цей винахід пропонує препарат FSH, де середнє значення PI згаданого препарату дорівнює щонайбільше або приблизно 3,4.

За третім аспектом, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, що містить FSH, де число Z FSH дорівнює щонайменше або приблизно 200.

За четвертим аспектом, цей винахід пропонує застосування FSH для стимулювання фолікулогенезу, де число Z FSH дорівнює щонайменше або приблизно 200.

За п'ятим аспектом, цей винахід пропонує застосування FSH для одержання лікарського засобу для застосування з метою стимулювання фолікулогенезу, де число Z FSH дорівнює щонайменше або приблизно 200.

За шостим аспектом, цей винахід пропонує спосіб індукування фолікулогенезу у пацієнта-людини, де згаданий спосіб включає введення FSH пацієнту, де число Z FSH дорівнює щонайменше або приблизно 200.

За сьомим аспектом, цей винахід пропонує спосіб одержання препарату FSH, число Z якого дорівнює щонайменше або приблизно 200, де згаданий спосіб включає стадію, вибрану з наведених нижче:

- реагування FSH із донором сіалової кислоти у присутності 2,3-сіалілтрансферази;
- вибір клітини відповідного типу для експресії рекомбінантного FSH;
- культивування клітини, за варіантом, якому віддають перевагу, рекомбінантної, що експресує FSH, за умов, що сприяють високим рівням сіалілування; та
- виділення ізоформ FSH, що мають високе число Z, за допомогою хроматографічних методів.

За восьмим аспектом, цей винахід пропонує застосування FSH для лікування чоловічої безплідності, де число Z FSH дорівнює щонайменше або приблизно 200.

За дев'ятим аспектом, цей винахід пропонує застосування FSH для одержання лікарського засобу для застосування з метою лікування чоловічої безплідності, де число Z FSH дорівнює щонайменше або приблизно 200.

За десятим аспектом, цей винахід пропонує спосіб лікування чоловічої безплідності у пацієнта-людини, де згаданий спосіб включає введення FSH пацієнту, де число Z FSH дорівнює щонайменше або приблизно 200.

Короткий опис фігур

На Фіг.1 показана хроматограма елюювання гліканів, вивільнених із rFSH, через колонку GlycoSep® C; колонка 4,6мм×100мм, заповнена дивінілбензолною смолою, покритою полімером (5м), із рухомою фазою ацетонітрил:вода (20:80), з лінійним градієнтом (0,25%/хв) ацетату амонію (500мМ) з 5хв до 21хв із подальшим застосуванням лінійного градієнта (0,525%/хв) ацетату амонію (500мМ) з 21хв до 61хв. На осі X показано час утримання у хвиликах, на осі Y показано інтенсивність сигналу у мВ.

На Фіг.2 показана кількість фолікулів на розмірну категорію на 8 день (по осі Y) у пацієнтів, що одержують кислоту та основну ізоформи FSH до дня 7. Хвилясті лінії зображають результат із кислотними ізоформами, навискісні лінії зображають результат з основними ізоформами.

На Фіг.3 показана кількість фолікулів на розмірну категорію на 10 день (по осі Y) у пацієнтів, що одержують кислоту та основну ізоформи FSH до дня 7. Хвилясті лінії зображають результат з кислотними ізоформами, навискісні лінії зображають результат з основними ізоформами.

На Фіг.4 показані середні сироваткові рівні FSH у пацієнтів після останньої дози кислоти та основної ізоформ FSH. По осі X представлено час у годинах з моменту здійснення першої ін'єкції FSH, по осі Y представлено сироваткову концентрацію у імунореактивних міжнародних одиницях/л (IU/L). Квадратами (■) позначено сироваткову концентрацію після ін'єкції кислотних ізоформ; ромбами (◆) позначено сироваткову концентрацію після ін'єкції основних ізоформ FSH. Сироваткові концентрації визначали імунаналізом, наприклад, радіоімунаналізом, із застосуванням набору, який постачається фірмою Daiichi Isotope Laboratory (Японія).

На Фіг.5 показана амінокислотна послідовність альфа-субодиниці зрілого людського FSH.

На Фіг.6 показана амінокислотна послідовність бета-субодиниці зрілого людського FSH.

Докладний опис винаходу

Винахідники несподівано виявили, що ізоформи FSH із високим рівнем сіалілування мають більшу ефективність щодо індукування фолікулогенезу у пацієнтів-людей, ніж менш сіалізовані ізоформи. Застосування препарату FSH за цим винаходом надає можливість застосування менших сумарних доз FSH для досягнення такого самого або кращого клінічного результату.

Винахідники встановили, що у разі лікування пацієнтів однаковими кількостями (вимірними в міжнародних одиницях (IU)) кислотного FSH та основного FSH, за результатами стандартного аналізу виявляється, що кількість фолікулів, що ростуть, у пацієнтів, яких лікують кислотним FSH, є значно більшою.

Коли пацієнтів лікують однаковими кількостями (вимірними як маса) кислотного FSH та основного FSH, кількість фолікулів у пацієнтів, яких лікують кислотним FSH, також є значно більшою.

Деякі пацієнти дають зменшену кількість фолікулів, що ростуть, у разі лікування стандартними препаратами FSH. Це обмежувальний фактор для успіху, у разі застосування методик допоміжної репродукції (ART). До пацієнтів, що демонструють реакцію такого типу, належать пацієнти віком понад 33-35 років, пацієнти з підвищеним вихідним рівнем FSH, підвищеним вихідним рівнем естрадіолу або зниженим вихідним рівнем інгібіну b. Препарат FSH за цим винаходом може впорскуватись один раз на добу або через день для одержання кращої реакції яєчників, ніж зі стандартними препаратами. Це підвищує шанси запліднення

яйцеклітини у цих пацієнтів.

Винахідники також несподіано виявили, що препарати FSH, які мають більшу ефективність, уможлижуючи рідше введення дози, можуть бути одержані при використанні FSH, що має число Z, яке дорівнює щонайменше або приблизно 200, за варіантом, якому віддають перевагу, дорівнює або приблизно дорівнює 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280 та 290 із порядком переваги, що зростає зі збільшенням числа Z (числа Z, які знаходяться між цими значеннями, входять, звичайно, до обсягу цього винаходу). Для індукування фолікулогенезу звичайні препарати FSH, взагалі, вводять кожного дня у дозі приблизно 75-600 МОД на добу. У більшості пацієнтів така сама сумарна доза звичайного препарату FSH може вводиться через два дні із досягненням такого самого клінічного результату, який забезпечується щоденними ін'єкціями [15]. Вираз "рідше введення дози" у відношенні препаратів FSH означає, що вони можуть вводиться рідше, ніж через два дні, із досягненням такого самого клінічного результату, з точки зору загального фолікулярного об'єму, який забезпечується звичайними препаратами, що вводяться кожного дня або через два дні.

Терміни "кислий" та "основний" широко застосовуються у відношенні препаратів FSH, які мають різні ступені сіалілування. Оскільки сіалова кислота є кислотою, молекули більш високого ступеня сіалілування будуть мати нижчі рН. За допомогою ізоелектричного фокусування, хроматофокусування або інших способів розподілу, наприклад, іонообмінної хроматографії, рідинної хроматографії швидкого розділення (FPLC) та високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) [16], суміш ізоформ може бути розділена на фракції, які можуть бути віднесені до кислих або основних, за варіантом, якому віддають перевагу, на основі числа Z.

Термін "сіалова кислота" означає будь-який член сімейства карбоксилізованих цукрів із дев'ятьма атомами вуглецю. Найвідомішим членом сімейства сіалових кислот є N-ацетилнейрамінова кислота (2-кето-5-ацетамідо-3,5-дидезокси-D-гліцеро-D-галактононулопіраноз-1-онова кислота, назва якої часто скорочується, як Neu5Ac, NeuAc або NANA). Другим членом сімейства є N-гліколілейрамінова кислота (Neu5Gc або NeuGc), де N-ацетильна група NeuAc є гідроксильованою. Третім членом сімейства сіалових кислот є 2-кето-3-дезоксинулонозова кислота (KDN) [17]. До цього сімейства входять також 9-заміщені сіалові кислоти, наприклад, 9-O-C₁-C₆-ацил-Neu5Ac, наприклад, 9-O-лактил-Neu5Ac або 9-O-ацетил-Neu5Ac, 9-дезоксид-9-фтор-Neu5Ac та 9-азидо-9-дезоксид-Neu5Ac. Огляд сімейства сіалових кислот дивись, наприклад, у Varki (Varki); Glycobiology 2 1992; 25-40; Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)).

Вуглеводні (за альтернативним варіантом, "гліканові") складові приєднуються до пептидного остову через простий цукор за допомогою O- або N-зв'язаного глікозидного зв'язку. У міру того як вуглеводна складова стає складнішою, може відбуватись розгалуження, унаслідок чого вуглеводна складова має один, два, три або чотири (іноді більше) кінцеві цукрові залишки або "антени". Такі вуглеводні складові називають моно-, ди-, три- або тетрарозгалуженими. Параметр "показник розгалуженості, (AI)" є критерієм ступеня розгалуженості вуглеводних залишків, а також мірилом об'ємного розміру вуглеводних залишків. Для визначення цього параметра глікопротеїн піддають хімічній обробці для вивільнення усіх вуглеводних залишків, наприклад, шляхом нагрівання з гідразином, або вуглевод може піддаватись розщепленню ферментативними засобами, наприклад, за допомогою ендоглікозидази (N-гліканази) [18]. Суміш вуглеводів виділяють. У разі потреби, суміш вуглеводів реагує з міткою, наприклад, радіоактивною міткою, хромофорною міткою (тобто, міткою, активною у разі опромінення ультрафіолетом), флуорофорною міткою, імунореактивною міткою тощо. Після цього мічена суміш вуглеводів десіалілується за допомогою ферменту сіалідази з одержанням міченої нейтральної суміші вуглеводів. (За альтернативним варіантом стадії мічення та десіалілування можуть здійснюватись у зворотному порядку). Після цього мічена нейтральна суміш вуглеводів розподіляється на складові за допомогою хроматографічного методу, який може розрізняти різні різновиди (моно-, ди-, три- та тетрарозгалужені). Хроматографування (нормальне або оберненофазове) може здійснюватись по суті за будь-яким методом, у тому числі, наприклад, товсто-або тонкошарове хроматографування або високоефективне рідинне хроматографування (HPLC). За альтернативним варіантом виділена нейтральна суміш вуглеводів може реагувати з агентом для перетворення складових на леткі, і суміш може піддаватись газофазовому хроматографуванню (GC). Візуалізація може здійснюватись за методом, відповідним до мітки та застосованого хроматографічного методу. Наприклад, якщо у ролі мітки було використано флуорофор, для детектування буде застосовуватись флуориметр; якщо у ролі мітки використовується хромофор, для детектування буде застосовуватись УФ-спектрофотометр. У разі, якщо мітка не використовувалась, для визначення піків та часу утримання можна вдаватись до мас-спектрометрії. Співвіднесення піків з моно-, ди-, три- або тетрарозгалуженими різновидами може здійснюватись за допомогою мас-спектрометрії або шляхом порівняння з відомими стандартами.

Після цього хроматограма піддається аналізу шляхом інтегрування піків, що пов'язуються з ди-, три- та тетрарозгалуженими різновидами вуглеводів. Відсоток загального вуглеводу, представлений кожним різновидом, може у подальшому використовуватись для обчислення AI за наведеним далі рівнянням:

$$AI = 2 P_{di} + 3 P_{tri} + 4 P_{tetra},$$

де AI - показник розгалуженості, P_{di}, P_{tri} та P_{tetra} - відсоток загального вуглеводу, що є ди-, три- або тетрарозгалуженим, відповідно. Можуть бути присутніми слідові кількості інших складових (наприклад, монорозгалужених), однак суттєвого внеску до значення AI вони не додають.

Високий індекс розгалуженості вказує на те, що вуглеводні складові є високорозгалуженими, з багатьма "антенами". Рекombінантний людський FSH має, як правило, AI у межах від приблизно 220 до 280 або дорівнює у середньому приблизно 255.

Параметр "число Z" є мірилом того, скільки "антен" вуглеводних складових глікопротеїну несе заряджені залишки, наприклад, сіалову кислоту. Для визначення числа Z, вуглеводні складові вивільнюють із пептиду, як вказувалось вище, і мітять, у разі потреби. Суміш після цього розділяють шляхом іонообмінного хроматографування, яке надає можливість розділення різновидів на основі заряду. Візуалізація елююваних піків може здійснюватись за допомогою мітки, як згадувалось вище, або для цього може застосовуватись якийсь інший метод, наприклад, мас-спектрометрія.

Після цього хроматограма піддається аналізу шляхом інтегрування піків, що пов'язуються з моно-, ди-, три- та тетразарядженими різновидами вуглеводів. Відсоток загального вуглеводу, представлений кожним різновидом, може у подальшому використовуватись для обчислення числа Z за наведеним далі рівнянням:

$$Z = P'_{\text{mono}} + 2 P'_{\text{di}} + 3 P'_{\text{tri}} + 4 P'_{\text{tetra}},$$

де Z - число Z, P'_{mono} , P'_{di} , P'_{tri} , P'_{tetra} - відсоток загального вуглеводу, що є моно-, ди-, три- або тетразарядженим, відповідно.

Високе число Z вказує на те, що велика кількість антен несе заряджені залишки, і що глікопротеїн, завдяки цьому, буде сильно зарядженим, а у разі залишків сіалової кислоти, кислим. Рекombінантний людський FSH має, як правило, значення числа Z у межах від приблизно 150 до приблизно 190, або дорівнює у середньому приблизно 184.

Винахідники з подивом встановили, що ізоформи FSH, число Z яких перевищує або становить приблизно 200, демонструють підвищену ефективність із точки зору кількості фолікулів, у разі порівняння (на основі IU) з "еквівалентною дозою" ізоформ FSH, числа Z яких є меншими за 200. Термін "еквівалентна доза" означає, що у разі, коли кількість FSH різних ізоформ визначається за допомогою стандартного аналізу *in vivo* шляхом порівняння, за визначених умов, їхньої здатності до збільшення маси яєчника у пацюків, доза у міжнародних одиницях (Ш) є такою самою. Іншими словами, еквівалентні дози (у міжнародних одиницях) різних ізоформ, за визначенням на пацюках, мають різну клінічну ефективність у разі введення людям.

Препарати FSH, які мають підвищені числа Z, можуть виділятися будь-якими способами. Наприклад, партія рекombінантного FSH може піддаватися ізоелектричному фокусуванню або хроматофокусуванню, як описано, наприклад, у будь-якій з робіт (Мюлдерс (Mulders) та інші [19], Замбрано (Zambrano) та інші [20], та Тімоссі (Timossi) та інші [21]). Можуть бути виділені фракції, що мають різні рІ. Препарати FSH за цим винаходом, яким віддають перевагу, мають середні значення рІ, що дорівнюють щонайбільше або приблизно 3,4, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, дорівнюють щонайбільше або приблизно 3,3, за варіантом, якому віддають особливу перевагу, дорівнюють щонайбільше або приблизно 3,2, із порядком переваги, що зростає зі зменшенням середнього значення рІ.

Параметр "число Z" відображує середній ступінь сіалілування групи різновидів FSH. Можливо, що препарат FSH, який має високе число Z, може, разом з тим, мати значну частку основних (менш сіалілованих) різновидів. Такі основні різновиди можуть відігравати роль антагоністів на рецепторі FSH і є, таким чином, небажаними. "Поширення" присутніх різновидів може визначатись шляхом ізоелектричного фокусування або хроматофокусування. Аналіз числа Z може також дати уявлення про поширення різновидів. Перевага віддається тому, щоб препарат мав менше за або приблизно 4% нейтральних різновидів вуглеводів (тобто гліканових складових, що не несуть заряду), та менше за або приблизно 16% моносіалілованих різновидів, та за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щоб препарат мав менше за або приблизно 3%, 2% або 1% нейтральних різновидів та менше за або приблизно 15%, 12%, 10%, 8% або 5% моносіалілованих різновидів, де порядок переваги зростає зі зменшенням відсотків.

До обсягу цього винаходу входять препарати FSH, що мають підвищену ефективність при фолікулогенезі, що є наслідком підвищеного ступеня сіалілування на одному або декількох додаткових сайтах глікозилювання білка. Такі сайти можуть вводитись шляхом заміни залишків у білковому остові FSH на серинові, треонінові, лізינוві або аспарагінові залишки, за допомогою, наприклад, мутагенезу. Приклад способу, який може застосовуватись для одержання таких мутантних форм FSH, наведено у Прикладі 7. Для глікозилювання *in vivo*, введені сайти повинні бути такими, щоб утворювати "сайт N-глікозилювання" такої послідовності: N-X'-S/T/C-X", де X' - будь-який амінокислотний залишок, за виключенням проліну, X" - будь-який амінокислотний залишок, який може бути/не бути ідентичним до X' і який, за варіантом, якому віддають перевагу, відрізняється від проліну, N - аспарагін та S/T/C представляє залишок, який може бути серином, треоніном або цистеїном, за варіантом, якому віддають перевагу, серином або треоніном, та за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, треоніном. Кислі ізоформи ($pI \leq 3,4$) таких молекул FSH входять до обсягу цього винаходу. Опис таких модифікованих молекул FSH, що несуть додаткові сайти глікозилювання, наведено, наприклад, у WO 01/58493 (Махуген). Особливу перевагу віддають таким мутаціям:

У β -субодиниці: E4N, A70N, L73N, V78N, G100N, Y103N, F19N/I21T, L37N/Y39T, D41N/A43T, E55N/A43T, E59N/V61T та R97N/L99T.

У α -субодиниці: E9N, F17T, F17N, R67N, V68T, E56N, H83N, та F33N/R35T; де A - аланін, D - аспарагінова кислота, E - глютамінова кислота, F - фенілаланін, G - гліцин, H - гістидин, I - ізoleyцин, L - лейцин, N - аспарагін, R - аргінін, T - треонін, V - валін, Y - тирозин і умовне позначення "E4N" представляє заміну глютамінової кислоти "E" у положенні 4 на аспарагін (N). Щодо нумерації послідовностей, амінокислотна послідовність людського FSH-альфа нумерується відповідно до зрілої послідовності, показаної на Фіг.5 або Послідовності №1. Амінокислотна послідовність людського FSH-бета нумерується відповідно до зрілої послідовності, показаної на Фіг.6 або Послідовності №2.

До обсягу цього винаходу входять також препарати FSH, що мають підвищену ефективність при фолікулогенезі, що є наслідком підвищеного ступеня сіалілування на одному або декількох додаткових сайтах глікозилювання білка, присутніх на доданому пептиді. Термін "доданий пептид" означає будь-який пептид, що включає сайт глікозилювання і який може приєднуватись до аміно- та/або карбоксикінця α - та/або β -субодиниці FSH без негативного впливу на активність FSH одержаної молекули. Наприклад, β -субодиниця hCG є значно більшою, ніж β -субодиниці інших гонадотропінів завдяки приблизно 34 додатковим амінокислотам на C-кінці, які у цьому описі називають карбоксильною кінцевою ділянкою (CTP). CTP сечового hCG містить чотири муциноподібні О-зв'язані олігосахариди. Ця CTP може бути зв'язаною з β -субодиницею FSH, за варіантом, якому віддають перевагу, на карбоксикінці β -субодиниці FSH, унаслідок чого утворюється молекула, що має активність FSH та чотири додаткові сайти глікозилювання. Кислі ізоформи ($pI \leq 4,4$) таких молекул FSH входять до обсягу цього винаходу. Такі молекули розкриті у WO 93/06844 (Washington University), а також у Бойм (Boime) та інших [22]. Інші молекули FSH, що мають модифіковані сайти глікозилювання, розкриті у WO 90/09800 (Washington University).

Для цілей цього опису, препарати FSH, що мають додаткові сайти глікозилювання, будуть позначатись FSH^{gly+}. У разі додання додаткових сайтів глікозилювання, параметр "число Z" більше не може застосовуватись для порівняння з "нормальними" препаратами FSH (тобто препаратами, що мають чотири сайти глікозилювання), оскільки цей параметр є нормалізованим (це сума відсотків). Коли препарат FSH^{gly+} піддається аналізу на гліканові різновиди, параметр "число Z⁺" може обчислюватись у спосіб, аналогічний обчисленню числа Z. Препарати FSH^{gly+} за цим винаходом мають числа Z⁺ більші за або приблизно рівні 200, за варіантом, якому віддають перевагу, більші за або приблизно рівні 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, із порядком переваги, що зростає із зростанням числа Z⁺.

Препарати FSH^{gly+} за цим винаходом мають значно нижчі профілі рІ, ніж нормальний FSH. Особлива перевага, завдяки їх підвищеній ефективності, віддається тим препаратам FSH^{gly+}, середнє значення рІ яких дорівнює щонайбільше або приблизно 4,4, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, тим препаратам, середнє значення рІ дорівнює щонайбільше або приблизно 4,2, 4,0, 3,8, 3,6, 3,4, 3,3 та 3,2, із порядком переваги, що зростає зі зниженням середнього значення рІ.

За всіма варіантами втілення цього винаходу, перевага віддається рекомбінантному FSH. Для лікування пацієнтів-людей, перевага віддається людському рекомбінантному FSH. Препарати за цим винаходом можуть виділятися із традиційного рекомбінантного FSH або вони можуть виділятися із препаратів FSH^{gly+}.

Аспектом цього винаходу є також надання способу збагачення вмісту сіалової кислоти за допомогою способу, який винахідники називають "підсиленням сіалілування". Препарати рекомбінантного FSH (за варіантом, якому віддається перевага) або рекомбінантного FSH^{gly+} (також за варіантом, якому віддається перевага) чи сечового FSH можуть піддаватись підсиленню сіалілування шляхом обробки ферментом, наприклад, глікозилтрансферазою, зокрема, сіалілтрансферазою, у присутності донора сіалової кислоти, наприклад, CMP-сіалової кислоти (цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейрамінової кислоти), за описом, який наведено у WO 98/31826 (Cytel Corporation). Приклади рекомбінантних сіалілтрансфераз, а також способів одержання рекомбінантних сіалілтрансфераз, наведені, наприклад, у патенті США №5,541,083 (University of California; Amgen). Задokumentовано щонайменше 15 різних сіалілтрансфераз ссавців і кДНК тринадцяти з них були клоновані. Ці кДНК можуть застосовуватись для рекомбінантного продукування сіалілтрансфераз, які у подальшому можуть застосовуватись у способах за цим винаходом.

Сіалілтрансферази, що застосовуються, будуть здатними до перенесення сіалової кислоти до послідовностей Ga1 β 1, 4G1cNAc, що є найпоширенішими передостанніми складовими, які знаходяться під кінцевою сіаловою кислотою на сіалілованих глікопротеїнах. Прикладом сіалілтрансферази, що може застосовуватись, є ST3Ga1 III, яку також називають (2,3)-сіалілтрансферазою (EC (європейська колекція) 2.4.99.6). Цей фермент каталізує перенесення сіалової кислоти до Ga1 з Ga1- β -1,3-глікозилNac або Ga1- β -1,4-глікозилNac глікозиду [23]. Сіалова кислота зв'язується із залишком галактозиду (Ga1) з утворенням α -зв'язку між двома сахаридами. Зв'язок сахаридів знаходиться між 2 положенням NeuAc та 3 положенням Ga1. Цей конкретний фермент може виділятися із печінки пацюків [24]; відомими є послідовності людської кДНК [25] та геномної [26] ДНК, що полегшує продукування цього ферменту шляхом рекомбінантної експресії. За варіантом втілення, якому віддають перевагу, у способах сіалілування застосовують ST3Ga1 III (за варіантом, якому віддають перевагу, від пацюків), ST3Ga1 IV, ST3Ga1 I, ST6Ga1 I, ST3Ga1 V, ST6Ga1 II, ST6Ga1NAc I або ST6Ga1NAc II, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, ST3Ga1 III, ST6Ga1 I, ST3Ga1 IV, ST6Ga1 II або ST3Ga1 V, за варіантом, якому віддають більшу особливо перевагу, ST3Ga1 III від пацюків.

Кількість сіалілтрансферази буде, за варіантом, якому віддають перевагу, дорівнювати або приблизно дорівнювати 50 мОд на мг FSH або менше, за варіантом, якому віддають перевагу, буде дорівнювати або приблизно дорівнювати 5-25 мОд на мг FSH. За умов, яким віддають перевагу, концентрація сіалілтрансферази буде дорівнювати або приблизно дорівнювати 10-50 мОд/мл, а концентрація FSH буде дорівнювати або приблизно дорівнювати 2мг/мл.

FSH, збагачений кислими ізоформами, можна одержувати також шляхом трансфікування клітини, рекомбінантної або іншої, що експресує FSH, геном, що кодує сіалілтрансферазу, де згаданий ген експресується клітиною. Цей ген може включати геномні кодувальні послідовності (тобто з інтронами) або він може включати кДНК кодувальні послідовності. За альтернативним варіантом, якщо геном клітини включає ендегенні послідовності, що кодують сіалілтрансферазу, до геному клітини може вставлятися генно-інженерна конструкція, що спричинює експресію FSH. Експресія сіалілтрансферази може підсилюватись шляхом введення неназивних регуляторних послідовностей, активних у клітині, у функціональному зв'язку з ендегенними послідовностями, що кодують сіалілтрансферазу. Можна також вставляти ген, що піддається ампліфікації, у функціональному зв'язку до послідовностей, що кодують сіалілтрансферазу, щоб викликати ампліфікацію геном них послідовностей, що кодують сіалілтрансферазу. Ці маніпуляції можуть здійснюватись шляхом гомологічної рекомбінації, наприклад, як описано у EP 0505500 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.).

Ступінь сіалілування препарату FSH може також підвищуватись шляхом відбору клітини для експресії рекомбінантного FSH, що сприяє сіалілуванню. До таких клітин належать вибрані гіпофізарні клітини та клітини яєчника китайського хом'ячка, що експресують високі рівні сіалілтрансфераз. Препарат FSH, одержаний у такій клітині, може додатково піддаватись способу виділення, як згадується у цьому описі, для виділення ізоформ, що мають високий ступінь сіалілування.

Ступінь сіалілування препарату FSH може підвищуватись також шляхом культивування клітини, що експресує FSH, за варіантом, якому віддають перевагу, рекомбінантний FSH, за умов, що сприяють високому рівню сіалілування. Сіалілуванню може сприяти доповнення культуральних середовищ інгібіторами нейрамінідази та/або безпосередніх внутрішньоклітинних попередників синтезу сіалової кислоти, наприклад, ацетилманозаміну. Препарати FSH, одержані за таких умов культивування, можуть додатково піддаватись способу виділення, як згадується у цьому описі, для виділення ізоформ, що мають високий ступінь сіалілування.

У разі застосування способу підсилення сіалілування, бажано, щоб перед ферментативним сіалілуванням

препарат FSH мав високий AI, щоб надати багато антен для приєднання залишків сіалової кислоти. За варіантом, якому віддають перевагу, FSH повинен мати AI, що щонайменше або приблизно дорівнює 220, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, він повинен мати AI, що дорівнює щонайменше або приблизно 240, і за варіантом, якому віддають особливо більшу перевагу, він повинен мати AI, що дорівнює щонайменше або приблизно 270. FSH, що має підвищені AI, може виділятися, наприклад, за допомогою афінної хроматографії на сефарозі, дериватизованій конканаваліном-A (Con-A), з елюванням градієнтом метилглюкози, або препаративної HPLC.

Спосіб підсилення сіалілування за цим винаходом може переважно застосовуватись до препаратів FSH, що були модифіковані для введення одного або декількох додаткових сайтів глікозилювання (препарати FSH^{gly+}).

Такі препарати FSH^{gly+} можуть розділятися на фракції, що мають високий AI, перед застосуванням способу підсилення сіалілування.

Цей винахід охоплює препарати FSH, одержані шляхом експресії FSH у клітинах, які є нездатним до сіалілування, з подальшим підданням FSH підсиленню сіалілування. Наприклад, у WO 99/13081 (Akzo Nobel N.V.) описують експресію FSH дикого типу та мутеїнів у одноклітинному еукаріотному організмі *Dictyostelium*, де, зокрема, мутеїни мають додаткові сайти глікозилювання. *Dictyostelium* є нездатним до сіалілування гліканів. Цей винахід включає препарати FSH, одержані шляхом піддання FSH дикого типу або мутеїнів, експресованих *Dictyostelium*, підсиленню сіалілування.

Після підсилення сіалілування, препарати FSH, що мають бажаний ступінь сіалілування, можуть виділятися за допомогою іонообмінного хроматографування, ізоелектричного фокусування, хроматофокусування або хроматографування на конканаваліні-A (Con-A).

Число Z FSH за цим винаходом дорівнює щонайменше або приблизно 200, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, дорівнює щонайменше або приблизно 210, за варіантом, якому віддають особливу перевагу, щонайменше становить приблизно 220, за варіантом, якому віддають особливо більшу перевагу, становить щонайменше приблизно 230, 240, 250, 260 або 270, зі ступенем переваги, що зростає зі збільшенням числа Z. Число Z повністю сіалілованого FSH дорівнює від щонайменше або приблизно 230 до щонайменше або приблизно 280, у залежності від показника розгалуженості. Число Z препаратів FSH, яким віддають більшу перевагу, за цим винаходом дорівнює від приблизно 230 до приблизно 280.

Препарати FSH за цим винаходом одержують таким чином, щоб вони послідовно мали число Z, яке дорівнює щонайменше або приблизно 200, або згадані вище числа Z, яким віддають перевагу. FSH за цим винаходом може виділятися із суміші ізоформ за допомогою цілого ряду способів, відомих фахівцю у цій галузі. Для розділення ізоформ на основі pI може застосовуватись, наприклад, ізоелектричне фокусування, хроматофокусування або іонообмінна хроматографія. Різні фракції можуть аналізуватись на вміст сіалової кислоти і необхідні фракції вибиратись для застосування. Приклад придатних умов для іонообмінного хроматографування наведено у Прикладах. Такі способи розділення можуть застосовуватись для виділення FSH за цим винаходом із rFSH, який одержують традиційним шляхом, або сечового FSH (uFSH), або вони можуть застосовуватись для виділення необхідних ізоформ з FSH, підданого обробці сіалілтрансферазою, або іншими рекомбінантними методами, які згадувались вище.

За одним з аспектів, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, що містить FSH за цим винаходом (тобто такий, що має число Z, яке дорівнює щонайменше або приблизно 200, де значення мінімальних чисел Z, яким віддають перевагу, відповідають наведеним вище). Такі фармацевтичні композиції можуть застосовуватись для стимулювання фолікулогенезу, наприклад, у поєднанні з індукцією овуляції або методиками допоміжної репродукції (ART). Оскільки FSH за цим винаходом є особливо ефективним щодо індукування численних фолікулів для розвитку та визрівання, він є особливо придатним для застосування у ART, у яких бажано збирати численні овоцити.

За альтернативним варіантом, у разі ретельного визначення дози, FSH за цим винаходом може застосовуватись для індукування монофолікулогенезу для індукції овуляції (OI) або нечисленного фолікулогенезу (до приблизно трьох фолікулів для IUI), для запліднення *in vivo*. Монофолікулогенез може також забезпечуватись зниженою дозою FSH або рідшим введенням дози, порівняно зі звичайними препаратами FSH. У разі індукції овуляції, препарат FSH за цим винаходом може вводиться у дозі 225-400 МОд через три дні або у менших дозах, у залежності від реакції пацієнта. Реакція пацієнта може відслідковуватись за допомогою ультразвукової ехографії.

FSH за цим винаходом буде, за типовим варіантом, вводиться до складу фармацевтичної композиції, яка, додатково, буде містити розріджувач або наповнювач. Фахівцю у цій галузі є відомим цілий ряд таких розріджувачів або наповнювачів, придатних для одержання фармацевтичної композиції.

FSH за цим винаходом може надаватись, як правило, у вигляді твердої дозованої лікарської форми, готової до розчинення з одержанням стерильного ін'єкційного розчину для внутрішньом'язового або підшкірного введення. Тверду речовину одержують, як правило, шляхом ліофілізації. До типових наповнювачів та носіїв належить цукроза, лактоза, хлорид натрію, буферні агенти, наприклад, монофосфат натрію та дифосфат натрію. Розчин можна одержати шляхом розбавлення водою для ін'єкцій безпосередньо перед застосуванням.

FSH за цим винаходом може також надаватись форма розчину для ін'єкцій, що містить будь-який з наповнювачів та буферів, наведених вище, та інші, відомі фахівцю у цій галузі.

FSH за цим винаходом може застосовуватись у режимі регульованої гіперстимуляції яєчників (COH). Стандартні режими [27] COH включають фазу регуляції за типом негативного зворотного зв'язку, впродовж якої секреція ендogenous лютеїнізуючого гормону (LH) пригнічується шляхом введення агоніста гонадотропін-вивільнювального гормону (GnRH) з подальшою стимулювальною фазою, під час якої розвиток фолікулів (фолікулогенез) індукується щоденним введенням фолікулостимулювального гормону (FSH), як правило, у дозі, що дорівнює або приблизно дорівнює 75-600 МОд на добу, за варіантом, якому віддають перевагу, у дозі, що дорівнює або приблизно дорівнює 150-225 МОд на добу. За альтернативним варіантом стимулювання

розпочинають за допомогою FSH після природної або індукованої менструації, з подальшим введенням антагоніста GnRH (із започаткуванням, як правило, приблизно на шостий день стимульованої фази). У разі утворення щонайменше 3 фолікулів >16мм (одного 18мм), вводять одноразову ударну дозу hCG (людського хоріонічного гонадотропіну) (5-10000 МОд) для імітування викиду природного LH та індукування овуляції. Ін'єкцію hCG здійснюють, як правило, у будь-який з 10 дня по 14 день, однак він може бути введеним і пізніше, у залежності від того, чи досягнуті вищезазначені параметри. Виділення овоцитів здійснюють через 36-38 год після ін'єкції hCG.

FSH за цим винаходом може також застосовуватись для ОІ та ІУІ. Наприклад, стимулювання FSH за допомогою препарату за цим винаходом розпочинають після природної або індукованої менструації у дозі 75-150 МОд на добу. Коли 1 фолікул або 3 фолікули досягають діаметра щонайменше 16мм, для індукування овуляції вводять разову ударну дозу hCG. Запліднення здійснюють in vivo шляхом звичайного статевого акту або шляхом внутрішньоматкового запліднення (ІУІ).

Оскільки FSH за цим винаходом має підвищену ефективність відносно відомих препаратів FSH, у режимах, подібних тим, опис яких наведено вище, можуть застосовуватись нижчі дози (МОд) FSH та/або ці режими можна модифікувати шляхом скорочення стимульованого періоду із застосуванням FSH із досягненням такої самої або кращої реакції з точки зору кількості та життєздатності фолікулів. Наприклад, у разі застосування препарату FSH за цим винаходом, адекватний фолікулогенез може бути досягнутим за допомогою дози, що дорівнює або приблизно дорівнює 50-150 МОд FSH, за варіантом, якому віддають перевагу, за допомогою дози, що дорівнює або приблизно дорівнює 50-100 МОд FSH, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, за допомогою дози, що дорівнює або приблизно дорівнює 50-75 МОд FSH. Введення дози FSH здійснюється, як правило, на добовій або напівдобовій основі. Період введення доз може становити щонайбільше або приблизно 14 днів, за варіантом, якому віддають перевагу, він може становити щонайбільше або приблизно 12 днів, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, він може становити щонайбільше або приблизно 11 днів або 10 днів.

Для ОІ, препарати FSH за цим винаходом можуть вводитись у дозах від 25-150 МОд FSH на добу, за варіантом, якому віддають перевагу, 50-125 МОд FSH на добу.

Для лікування чоловічої безплідності препарат FSH за цим винаходом може вводитись у дозі від 3×150 МОд на тиждень до 300 МОд на тиждень доти, доки сперматогенез не досягне рівнів, адекватних для запліднення шляхом звичайного статевого акту або за допомогою методик допоміжної репродукції.

Винахідники додатково встановили, що, завдяки підвищеній ефективності, препарати FSH, число Z яких дорівнює щонайменше або приблизно 200, можуть вводитись рідше, ніж препарати FSH, число Z яких є меншим за 200. (Для цілей цього опису, терміни FSH^{+200} , FSH^{+210} , FSH^{+220} тощо будуть застосовуватись для представлення препаратів FSH, число Z яких знаходиться у діапазоні, що дорівнює або приблизно дорівнює 200-210, 211-220, 221-230 тощо). Це означає, що пацієнти, які за нормальних умов будуть потребувати, наприклад, 150 МОд стандартного FSH кожного дня для досягнення адекватного фолікулогенезу, можуть досягти такого самого результату, наприклад, за допомогою 225 МОд FSH^{+200} через три дні або 300 МОд FSH^{+200} через чотири дні. Завдяки підвищеній ефективності FSH^{+200} , порівняно зі звичайними препаратами FSH, вищезгадані дози можуть бути зменшені у тих пацієнтів, що демонструють добру реакцію. У разі препаратів FSH за цим винаходом, число Z яких є не меншим за або становить приблизно 230, можливим є здійснення ін'єкцій через п'ять, шість або сім днів, у залежності від реакції пацієнта. Реакція може визначатись за допомогою ультразвукової ехографії та/або шляхом визначення сироваткових рівнів естрадіолу. Іншими придатними режимами є такі: 100 МОд FSH^{+210} через два дні; 200 МОд FSH^{+210} через три дні; 275 МОд або 300 МОд FSH^{+210} через чотири дні; 80-100 МОд FSH^{+220} через два дні; 180-200 МОд FSH^{+220} через три дні; 260-300 МОд FSH^{+220} через чотири дні; 75-100 МОд FSH^{+230} через два дні; 170-200 МОд FSH^{+230} через три дні; та 250-300 МОд FSH^{+230} через чотири дні; 275-400 МОд FSH^{+250} через п'ять днів; 375-450 МОд FSH^{+250} через шість днів; 450-525 МОд FSH^{+250} через сім днів.

Термін "підвищена ефективність", який застосовують у цьому описі у зв'язку з впливом на фолікулогенез, включає будь-яке поліпшення, що піддається визначенню, або збільшення кількості та/або підвищення життєздатності фолікулів у індивіда, наприклад, у разі порівняння з кількістю та/або життєздатністю фолікулів у одного або декількох пацієнтів, що піддавались лікуванню еквівалентною дозою (ІУ/ІУ), за визначенням стандартним аналізом збільшення маси яєчника у пацієнтів, FSH, що має число Z менше за 200. За варіантом, якому віддають перевагу, поліпшення або збільшення буде статистично значущим, за варіантом, якому віддають перевагу, у разі значення ймовірності <0,05. Способи визначення статистичної значущості результатів є добре відомими та задокументованими у цій галузі і застосовуватись може будь-який придатний спосіб.

Винахід буде проілюстрований наведеними нижче необмежувальними прикладами.

Приклади

Приклад 1

Визначення числа Z

Картування гліканів надає можливість визначення числа Z глікопротеїну.

Гліканові складові вивільнювали з рекомбінантного людського FSH за допомогою повністю автоматизованого приладу Oxford GlycoSciences GlycoPrep® 1000 або еквіваленту з гідрازیном при температурі 100°C впродовж 5 год.

Різновиди гліканів відокремлювали від гідразину, що не прореагував, та гідразидів амінокислот за допомогою колонки, заповненої сенсibiliзованими скляними кульками. Різновиди гліканів елюювали ацетатом натрію.

Різновиди гліканів ацетилювали оцтовим ангідридом. Надлишок реактивів видаляли за допомогою іонообмінної колонки зі змішаним шаром наповнювача. Усі невідновлені різновиди гліканів збирали до розбавленого ацетатного буферного розчину.

Різновиди гліканів збирали на 0,5м фільтрі (Oxford GlycoSciences) і ліофілізували. Ліофілізовані різновиди

гліканів мітили шляхом реагування з відновником, який містив флуорофор (наприклад, 2-амінобензамід або 2-AB) за кислих умов впродовж 120хв при температурі 65°C.

Мічені різновиди гліканів відокремлювали від надлишку реактивів за допомогою гідрофільної адсорбційної мембрани, яка затримує різновиди гліканів. Різновиди гліканів відновлювали у воді і зберігали у замороженому стані до хроматографічного розділення.

Мічені різновиди гліканів розділяли шляхом аніонообмінного хроматографування. Хроматографічну процедуру здійснюють таким чином:

- Колонка - GlycoSep® C, 4,6мм×100мм, заповнена вкритою полімером дивінілбензольною смолою (5м).

- Об'ємна швидкість потоку рухомої фази 0,4мл/хв:

Рухома фаза А: ацетонітрил (хроматографічний сорт).

Рухома фаза В: 500мМ розчин ацетату амонію, рН 4,5.

Рухома фаза С: надчиста вода.

- Детектування здійснюють за допомогою флуориметра, $\lambda_{\text{збудження}}$: 330нм та $\lambda_{\text{емісія}}$: 420нм.

- Елюювання здійснюють за таких умов елюювання:

Вихідні умови: 20% фази А, 80% фази С

Лінійний градієнт фази В (0,25%/хв) з 5хв до 21хв, 20% постійної фази А.

Лінійний градієнт фази В (0,525%/хв) з 21хв до 61хв, 20% постійної фази А.

- Температура колонки підтримується на рівні 30±2°C.

Різновиди гліканів елюють за їхнім зарядом із нейтральних, моно-, ди-, три- та тетрасіалілованих різновидів. Типова хроматограма наведена на Фіг.1.

На одержаній хроматограмі піки групувались за діапазоном часу утримання, який відповідав ступеню сіалілування, наведеному у Таблиці 1.

Таблиця 1

Час утримання і число Z глікану, який було виділено з rFSH

Час утримання (хв)	Різновиди гліканів	Число Z
Від 2 до 4	Нейтральний	0
Від 15 до 21	Моносіалілований	P _{mono}
Від 21 до 35	Дисіалілований	P _{di}
Від 35 до 45	Трисіалілований	P _{tri}
Від 45 до 52	Тетрасіалілований	P _{tetra}

Результати для кожної групи гліканів виражали у вигляді відсотка від загальної площини різних груп гліканів (нейтральних, моно-, ди-, три- та тетра-) і число Z вираховували із співвідношень різних різновидів (P_{glycan}):

$$Z = P'_{\text{mono}} + 2 P'_{\text{di}} + 3 P'_{\text{tri}} + 4 P'_{\text{tetra}},$$

Приклад 2

Визначення показника розгалуженості (AI)

Глікани виділяли з пептидного остову шляхом гідразінолізу, після чого піддавали флуоресцентному міценню за допомогою 2-амінобензаміду (2-AB), як докладно наведено у Прикладі 1.

2-AB-мічені глікани піддавали ферментативному десіалілуванню за допомогою сіалідази ((Vibrio cholerae) у 250мМ розчині ацетату амонію (рН 5,5), що містив 20мМ розчин хлориду кальцію, впродовж 18год при температурі 37°C. Для гліканів використовують приблизно 0,05 МОд сіалідази з вихідної кількості 100мкг rFSH.

Десіаліловані глікани сушили під вакуумом і зберігали при температурі -20°C до розподілу шляхом препаративного вискоєфективного рідинного хроматографування (HPLC) зі зворотною фазою за таких умов:

- Колонка - GlycoSep® R;

- Об'ємна швидкість потоку рухомої фази 0,7мл/хв.

Елюент А: 50мМ розчин ацетату амонію, рН 6,0.

Елюент В: 500мМ розчин ацетату амонію, рН 6,0, що містить 8% ацетонітрилу.

- Детектування здійснювали за допомогою флуориметра, $\lambda_{\text{збудження}}$: 330нм та $\lambda_{\text{емісія}}$: 420нм.

- Температура колонки: 30°C.

Перед завантаженням до колонки, ліофілізовані зразки відновлювали за допомогою Елюенту А (200мкл): застосовували 50мкл цього розчину. Використовували такий градієнт:

t = 0 (хв) 55%А; 45%B

t = 15 (хв) 55%А; 45%B

t = 70 (хв) 0%А; 100%B

t = 75 (хв) 0%А; 100%B

t = 76(хв) 55%А; 45%B.

Піки співвідносили з ди-, три- та тетрарозгалуженням за допомогою мас-спектрометрії з елетророзпилюванням (ESMS) та мас-спектрометрії з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині з часопролітним аналізатором (MALDI-TOF MS).

Результати виражають як відносні відсотки Р дироизгалуження, трирозгалуження та тетрарозгалуження, де 100% є сумою усіх гліканів. Показник розгалуженості (AI) після цього вираховують за допомогою такого рівняння:

$$AI = 2 P'_{\text{di}} + 3 P'_{\text{tri}} + 4 P'_{\text{tetra}},$$

де AI - показник розгалуженості, P'_{di}, P'_{tri} та P'_{tetra} - відсоток загального вуглеводу, який є ди-, три- або

тетрарозгалуженим, відповідно.

Приклад 3

Розподіл FSH на фракції на основі ступеня сіалілування

Рекомбінантний FSH розподіляли на кислі та основні фракції шляхом аніонообмінного хроматографування на DEAE ((діетиламіно)етилцелюлоза)-сефарозі FF.

- Для лабораторного очищення використовували колонку XK Pharmacia ($\varnothing 1,6\text{см} \times 20\text{см}$) або еквівалент (приблизно, 60мг білка), для очищення у більших масштабах використовували колонку Vantadge Amicon ($\varnothing 3,4\text{см} \times 40\text{см}$) або еквівалент), заповнені DEAE-сефарозою FF.

- Об'ємна швидкість потоку рухомої фази 150-250см/год.

Урівноважувальний буфер 1: 2М розчин трис-HCl, pH 7,0 \pm 1;

Урівноважувальний буфер 2: 25мМ розчин трис-HCl, pH 7,0 \pm 1, електропровідність 2,15 \pm 1,5мС/см.

Елюювальний буфер 1: 25мМ розчин трис, pH 7,0 \pm 0,1, 35мМ розчин NaCl, електропровідність 5,8 \pm 0,4мС/см (цим буфером елюють більш основні ізоформи);

Елюювальний буфер 2: 25мМ розчин трис, pH 7,0 \pm 0,1, 150мМ розчин NaCl, електропровідність 18,3 \pm 0,5мС/см (цим буфером елюють більш кислі ізоформи);

Регенераційний розчин: 0,5М NaOH, 1М розчин NaCl

Розчин для зберігання: 10мМ розчин NaOH

- Температура колонки: 23 \pm 3°C або 5 \pm 3°C.

FSH готували для завантаження до колонки таким чином:

Заморожений rhFSH відтаювали при температурі 5 \pm 3°C. Після завершення відтаювання розчин (3-4мг rhFSH, за визначенням оптичної густини при 276,4нм, на мл смоли) розбавляли 2М розчином трис-HCl, pH 7,0 \pm 0,1 у такому відношенні: 1 частина буферного розчину і 79 частин rhFSH. Кінцева концентрація трис-HCl дорівнювала 25мМ. pH доводили до рівня 7,0 \pm 0,1 за допомогою 1М розчину HCl.

Колонку готували шляхом промивання спочатку 3 об'ємами шару (BV) 0,5М розчину NaOH, потім 6 BV води. Урівноважування здійснювали шляхом промивання 4-5 BV урівноважувального буфера 1 з доведенням pH до приблизно 7. Після цього промивання продовжували 7-8 BV урівноважувального буфера 2.

Зразок rhFSH, одержаний, як вказано вище, завантажували до колонки. Після завершення внесення, колонку промивали 3 BV урівноважувального буфера 1.

Після цього розпочинали елювання елюювальним буфером 1; до збирання основної фракції приступали тоді, коли починала зростати оптична густина (276,4нм), і продовжували до 20 \pm 1 BV. Після цього елюент замінювали на елюювальний буфер 2, і збирання кислої фракції розпочинали після того як починала зростати оптична густина (276,4нм), і продовжували до 3 \pm 1 BV.

Після цього фракції піддавали ультрафільтрації для того, щоб їх сконцентрувати за допомогою ультрафільтрувального елемента типу 8400 (Amicon або еквівалент), спорядженого мембраною YM3 для основної фракції і мембраною YM10 для кислої фракції. Усі операції здійснювали при температурі 5 \pm 3°C.

Приклад 4

Клінічне дослідження з порівнянням ізоформ FSH

Порівняльну ефективність двох експериментальних партій rhFSH визначали на волонтерах.

Два препарати FSH одержали шляхом розділення rhFSH на дві фракції шляхом іонообмінного хроматографування, як описувалось вище, у прикладі 3. Партію А вважали "кислою", і вона мала число Z 220 (тобто кисла фракція з Прикладу 3), у той час як Партію В вважали "основною", і вона мала число Z 160 (тобто основна фракція з Прикладу 3).

За допомогою стандартного аналізу зростання маси яєчника пацієнтів ампули партії А та партії В були заповнені таким чином, що кожна з них містила приблизно 150 МОд FSH.

Характеристики двох партій наведені у Таблиці 2. Слід звернути увагу на те, що, оскільки ампули заповнювали на основі МОд, фактична кількість FSH у ампулах основної Партії В становила приблизно 250% кількості кислої Партії А (приблизно 24мкг проти приблизно 9мкг).

Таблиця 2

Характеристики партій FSH, які використовували під час проведення клінічного дослідження

	Партія А "кисла"	Партія В "основна"
Вміст FSH/ампулу	8,7мкг/ампулу	23,8мкг/ампулу
Питома біоактивність	19753 МОд/мг	7386 МОд/мг
Число Z	220	160
Показник розгалуженості (AI)	274	237

Питома біоактивність обчислюється шляхом ділення активності у МОд на масу білка.

Групу пацієнтів складали 32 жінки-волонтерки передклімактеричного віку. Гіпофізарну секрецію пацієнток регулювали за типом негативного зворотного зв'язку шляхом щоденних ін'єкцій декапептилу (0,1мг). Через 14 днів провели ультразвукове ехографічне обстеження і, за відсутності кіст, розпочали стимулювання за допомогою rFSH (150 МОд на добу) Партії А або Партії В. За допомогою ультразвукової ехографії щоденно визначали фолікулярний ріст і сироваткові концентрації E₂.

Впродовж періоду стимулювання за допомогою FSH фолікули будуть розвиватись і зростати у діаметрі. Фолікули кожної пацієнти вимірювали і підраховували на 8 день та 10 день стимулювання; реєстрували кількість фолікулів, яка припадала на розмірні категорії 0-10мм, 11-15мм та 16-25мм. На Фіг.2 середня кількість фолікулів на пацієнта, що припадала на кожну категорію, показана для груп пацієнток, які піддавались обробці кислими та основними ізоформами, на 8 день. На Фіг.3 показана та сама крива для 10

дня.

Результати дослідження показали, що у той час як в основній групі розмір фолікулів постійно зростав з часом, у кислій групі виникла друга когорта фолікулів, яка дещо запізнилась відносно першої, з подальшим значним зростанням утворення фолікулів, яке приблизно вдвічі перевищувало відповідний показник основної групи. Розмір другої когорти збільшився з 8 дня до 10 дня. Унаслідок цього, група пацієнток, яка одержувала "кислий" FSH, на 10 день мала в загальній кількості у середньому 18 фолікулів, більших за 11мм, у той час як у групі, що одержувала "основну" ізоформу, середня кількість фолікулів, більших за 11мм, на 10 день становила лише 11.

Середня загальна кількість фолікулів на 10 день у "кислій" групі становила 28, у той час як у "основній" групі їх було 19.

Середній загальний фолікулярний об'єм (TFV) на пацієнтку визначали за допомогою ультразвукової ехографії. TFV у групі, що одержувала "кислий" FSH, був приблизно на 30% вищим, аніж у групі, що одержувала "основний" FSH.

Сироваткові рівні FSH у пацієнток, що визначались за допомогою радіоімунаналізу, були вищими у основної групи, як очікувалось із впорскутої маси білка; різниця, однак, становили лише біля 30% (дивись Фіг.4), порівняно з 250% різницею введення, разом із більш високою метаболічною стійкістю кислих форм.

Приклад 5

Розділення FSH на фракції на основі показника розгалуженості (AI)

Препарати FSH, що мають вищі за нормальні показники розгалуженості, можуть виділятися за допомогою HPLC або афінної хроматографії на сефарозі, дериватизованій конканаваліном А (Con-A).

Приклад 6

"Підсилення сіалілування" за допомогою сіалілтрансферази

Рекомбінантний людський FSH ("вихідний матеріал"; 10мг) розчиняли у буфері (0,1М гепес-буфер, pH 7,5) з концентрацією 4,3мг/мл. До цього розчину додавали рекомбінантну сіалілтрансферазу пацюків (ST3Ga1III) до концентрації 100 мОд/мл та цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейрамінову кислоту (CMP-NeuAc) як донор сіалової кислоти з концентрацією 20мМ. За альтернативним варіантом донор сіалової кислоти може одержуватись *in situ* із застосуванням 20мМ розчину NeuAc та 2мМ розчину CMP у присутності CMP-сіаловокислотної синтетази. Реакційну суміш інкубували при температурі 37°C впродовж 24год. Фракції, збагачені сіаловою кислотою, виділяли за методиками, опис яких наведено у Прикладі 3.

Підсилення сіалілування може здійснюватись також із застосуванням вихідного матеріалу, що містить FSH, який має підвищений показник розгалуженості і який одержали за Прикладом 5.

За альтернативним варіантом, підсилення сіалілування може здійснюватись із вихідним матеріалом FSH, що вже має підвищене число Z, порівняно зі стандартним рекомбінантним FSH. Такий вихідний матеріал може виділятися за методиками Прикладу 3.

Приклад 7

Одержання мутантів FSH

кДНК α - та β -субодиниць людського FSH субклонували до вектора pDONR (Invitrogen). N-зв'язані сайти глікозилювання до α - та β -субодиниць FSH вводили за допомогою набору для сайт-спрямованого мутагенезу QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Система QuikChange™ використовує два синтетичні олігонуклеотидні праймери, що містять необхідну мутацію(-і). Для введення N-зв'язаних сайтів глікозилювання були застосовані наведені далі пари олігонуклеотидів: CC TTG TAT ACA TAC CCA AAC GCC ACC CAG TGT CAC та GTG ACA CTG GGT GGC GTT TGG GTA TGT ATA CAA GG для V78N, GC TGT GCT CAC CAT AAC GAT TCC TTG TAT ACA TAC C та GGT ATG TAT ACA AGG AAT CGT TAT GGT GAG CAC AGC для A70N, GAT CTG GTG TAT AAG AAC CCA ACT AGG CCC AAA ATC CA та TGG ATT TTG GGC CTA GTT GGG TTC TTA TAC ACC AGA TC для D41N/A43T, TGT ACT GTG CGA GGC CTG AAC CCC AGC TAC TGC TCC та GGA GCA GTA GCT GGG GTT GAC GCC TCG CAC AGT ACA для G100N, G AAC GTC ACC TCA AAC TCC ACT TGC TG та CA GCA AGT GGA GTT TGA GGT GAC GTT C для E56N, i CAG GAA AAC CCA ACC TTC TCC CAG CC та GG CTG GGA GAA GGT TGG GTT TTC CTG для F17T. Послідовності ДНК мутантних кДНК були підтверджені за допомогою набору ABI PRISM BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit з подальшим аналізом, який здійснювали за допомогою генетичного аналізатора ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Вектор експресії pCl ссавців (Promega) перетворили на вектор цілеспрямованої доставки GATEWAY за допомогою системи перетворення векторів GATEWAY Vector Conversion System (Invitrogen). α - та β -мутанти разом із субодиницями дикого типу субклонували до вектора експресії pCl за допомогою технології клонування Gateway™ Cloning Technology (Invitrogen). Вектор експресії pCl містить людський цитомегаловірусний негайний-ранній енхансер/промотор для регулювання експресії вставленого гена, інтрон, що знаходиться у зворотному напрямку відносно згаданого гена, для стимулювання експресії, та пізній сигнал поліаденілування вірусу мавп 40 (SV40), що знаходиться у прямому напрямку відносно згаданого вставленого гена, для закінчення транскрипції. Альфа-мутанти E56N та F17T у pCl котрансфікували β -субодиницю FSH дикого типу у pCl, у той час як β -мутанти A70N, G100N, V78N та D41N/A43T у pCl були котрансфіковані α -субодиницею дикого типу у pCl. Для контролю були трансфіковані β -субодиниця FSH дикого типу у pCl та α -субодиниця у pCl. Плазміді тимчасово трансфікувались до клітин HEK293 (культура клітин нирки людського ембріона) (ATTC (Американська колекція тканинних культур), CRL-10852) за кальційфосфатним методом (як описано, наприклад, у WO 96/07750). За альтернативним варіантом, плазміді pCl, що містила β -субодиницю дикого типу або β -мутант V78N, котрансфікувалась α -субодиницею дикого типу у pCl. Плазміді можуть також тимчасово або постійно трансфікуватись до клітин CHO (клітини яєчника китайського хом'ячка). Через день після трансфекції живильне середовище замінювали на DMEM (модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла)/F12 (Invitrogen, 11320-033), що містило 1мкг/мл інсуліну (Invitrogen, 18140-020), 6,8нг/мл селеніту натрію (Sigma, S5261) та 12,2нг/мл цитрату заліза (Sigma, F3388). Через день після заміни живильного середовища кондиціоноване середовище збирали і центрифугували впродовж 5хв при приблизно 800gх при температурі 4°C для видалення будь-якого клітинного дебрису. Супернатант видаляли і

центрифугували при 16000xg на центрифугі Biofuge fresco (Heraeus Instruments) впродовж 5хв, після чого середовище додатково прояснювали шляхом фільтрування через 0,45мкм фільтр Acrodisc (Gelman Sciences, 4184). До проясненого клітинного екстракту додавали 1М розчин трис-буфера (pH 7,4) до одержання 50мМ кінцевої концентрації трис-буфера та Твін 20 до одержання 0,1% кінцевої концентрації Твін 20.

Мутанти FSH очищали з клітинного екстракту шляхом імуноафінного хроматографування на сефарозі, дериватизованій анти-FSH моноклональними антитілами, імобілізованими за допомогою дивінілсульфону (ImmunoGresin anti-FSH-McAb-DVS-Sepharose). Такі смоли можна одержати за методами, відомими досвідченому фахівцю, наприклад, як розкрито у WO 88/10270.

Смолу урівнювали урівноважувальним буфером, що містив 0,1М розчин трис-HCl, 0,3М буферний розчин NaCl (pH=7,5), при температурі 4°C. Колонку завантажували кількістю FSH (МОД, визначені за допомогою радіоімуноаналізу, RIA), яка відповідала 80-90% здатності колонки до зв'язування загального FSH.

Незв'язані білки елюювали урівноважувальним буфером (як вказувалось вище) доти, доки OD₂₈₀ елюату не стала нижчою за 0,02.

Абсорбований мутантний FSH елюювали з імуносмоли 1М розчином аміаку при температурі 4°C. Елюати, у об'ємі, що дорівнював 4 об'ємам імуносмоли, об'єднували, pH, за допомогою льодяної оцтової кислоти при температурі 4°C, доводили до рівня 9,0 як можна скоріше після збирання, розчин піддавали ультрафільтрації на апараті Amicon (смуга пропускання фільтра 10000 Да) і концентрували до невеликого об'єму.

Після цього концентрований розчин мутантного FSH піддавали HPLC зі зворотною фазою на рідинному хроматографі Waters Prep LC 500A, спорядженому УФ-детектором та генератором для одержання препаративного градієнтного розчину. Перед завантаженням до колонки, pH розчину доводили до приблизно 5,6. Розчин завантажували до колонки зі зворотною фазою C₁₈ (Prepak 500 C₁₈ cartridges Waters), яка попередньо була урівноважена 0,05М буферним розчином ацетату амонію (pH=5,6) при кімнатній температурі. Об'ємна швидкість потоку становила 100мл/хв, елюат контролювали при 280нм.

Мутантний FSH елюювали градієнтом ізопропанолу до 50% рухомої фази. Фракції перевіряли засобами аналітичної газфазової хроматографії (GPC) та радіоімуноаналізу (RIA). Органічний розчинник видаляли шляхом вакуумної перегонки при температурі нижче за 40°C, розчин заморожували та ліофілізували.

Препарати мутантного FSH, експресовані у клітинах CHO, піддавали іонообмінному хроматографуванню, як описано у Прикладі 3, для виділення фракцій, що мають числа Z⁺ більші за 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 і вище.

Препарати мутантного FSH, експресовані у клітинах CHO або HEK294, піддавали обробці за способом підсилення сіалілування, як описано у прикладі 6. Після підсилення сіалілування, мутантний FSH піддавали іонообмінному хроматографуванню, як описано у Прикладі 3, для виділення фракцій, що мають числа Z⁺ більші за 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 і вище.

Посилання

1. Wide, L.; The regulation of metabolic clearance of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone; *Acta Endocrinologica* 112 1986; 336-344.
2. Chappel et al; *Endocr. Rev.* 4 1983; 179-211; Padmanabhan et al; *J. Clin. Endocrinol Met.* 67 1988; 465-473; Wide et al; *J. Clin. Endocrinol. Met.* 70 1990, 271-276; Anobile et al. Glycoform composition of serum gonadotropins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state; *Mol. Human Reproduct.* 4 1998; 631-639.
3. Morell et al; *J. Biol Chem.* 246 1971; 1461-1467; Ashwell et al.; *Annu. Rev. Biochem.* 51 1982, 531-554.
4. Steelman & Pohley; Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin; *Endocrinology* 53 1953; 604-616.
5. D'Antonio et al; Biological characterisation of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms; *Human Reproduction* 14 1999; 1160-1167.
6. Vitt et al; Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *In Vitro; Biol Reproduct.* 59 1998; 854-861.
7. Timossi et al; Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone; *J. Endocrinol.* 165 2000, 193-205.
8. Zambrano et al; Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone; *Mol Hum. Reprod.* 2 1996; 563-71.
9. Zambrano et al; 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 1999; 113-121.
10. Wide et al; Influence of the assay method used on the selection of the most active forms of FSH from the human pituitary; *Acta Endocrinol (Copenhagen)* 113 1986; 17-22.
11. Mulders et al; Prediction of the in vivo biological activity of human recombinant follicle stimulating hormone using quantitative isoelectric focussing, *Biologicals* 25 1997; 269-281.
12. Timossi et al; A less acidic human follicle-stimulating hormone preparation induces tissue-type plasminogen activator enzyme activity earlier than a predominantly acidic analogue in Phenobarbital-blocked pro-oestrous rats; *Mol Human Reproduct.* 4 1998; 1032-1038.
13. Healy et al.; *Lancet* 343 1994; 1539-1544.
14. наприклад, методика, розкрита в EP 0 170 502 (Serono Laboratories, Inc.).
15. Buckler et al; Ovulation induction with low dose alternate day recombinant follicle stimulating hormone; *Hum. Reprod.* 14 1999; 2969-73.
16. Herd et al.; Isolation and structure determination of the intact sialylation N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells; *Eur. J. Biochem.* 193 1990, 263-271.
17. Nadano et al; *J. Biol Chem.* 261 1986; 11550-11557; Kanamori et al; *J. Biol Chem.* 265 1990, 21811-21819.
18. Swedlow et al; Deglycosylation of gonadotropins with an endoglycosidase; *Proc. Soc. Experiment. Biol & Med.* 181 1986; 432-437.
19. Mulders et al; *Biologicals* 25 1997; 269-281.

20. Zambrano et al; Mol Hum. Reprod. 2 1996; 563-571.
21. Timossi et al; Neuroendocrinology 67 1998; 153-163.
22. Boime et al; Glycoprotein hormone structure-junction and analog design; Recent Prog. Horn. Res. 54 1999; 271-88.
23. Wen et al; J. Biol Chem. 267 1992; 21011; Van den Eijnden et al Enzymatic amplification involving glycosyltransferases forms the basis for the increased size of asparagine-linked glycans at the surface of NIH 3T3 cells expressing the N-ras proto-oncogene; J. Biol Chem. 266 1991; 21674.
24. Weinstein et al. J. Biol Chem. 257 1982, 13845.
25. Sasaki et al J. Biol Chem. 268 1993; 22782-22787; Kitagawa & Paulson; J. Biol Chem. 269 1994; 1394-1401.
26. Kitagawa et al; J. Biol. Chem. 271 1996; 931-938.
27. наприклад, загальноприйнята методика, розкрита в EP 0 170 502 (Serono Laboratories, Inc.).

ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<120> Фолікулостимулювальні гормони

<130>

<160> 2

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro
1           5           10           15
Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys
           20           25           30
Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu
           35           40           45
Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser
           50           55           60
Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr
65           70           75           80
Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
           85           90
  
```

<210> 2

<211> 111

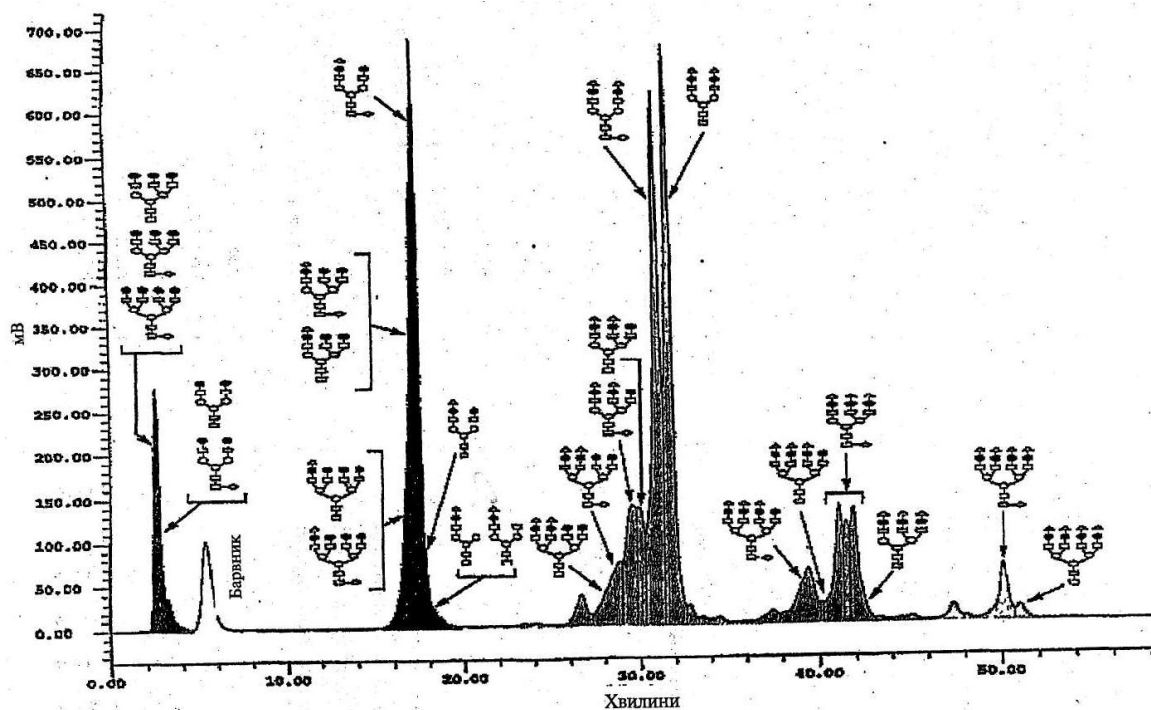
<212> PRT

<213> Homo sapiens

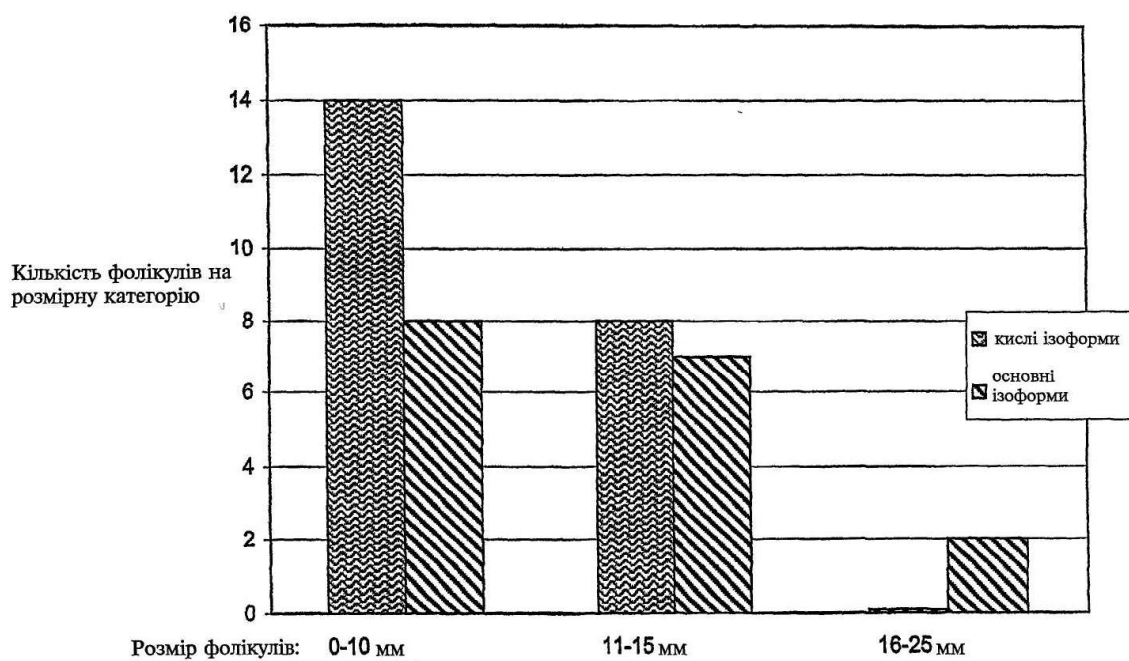
<400> 2

```

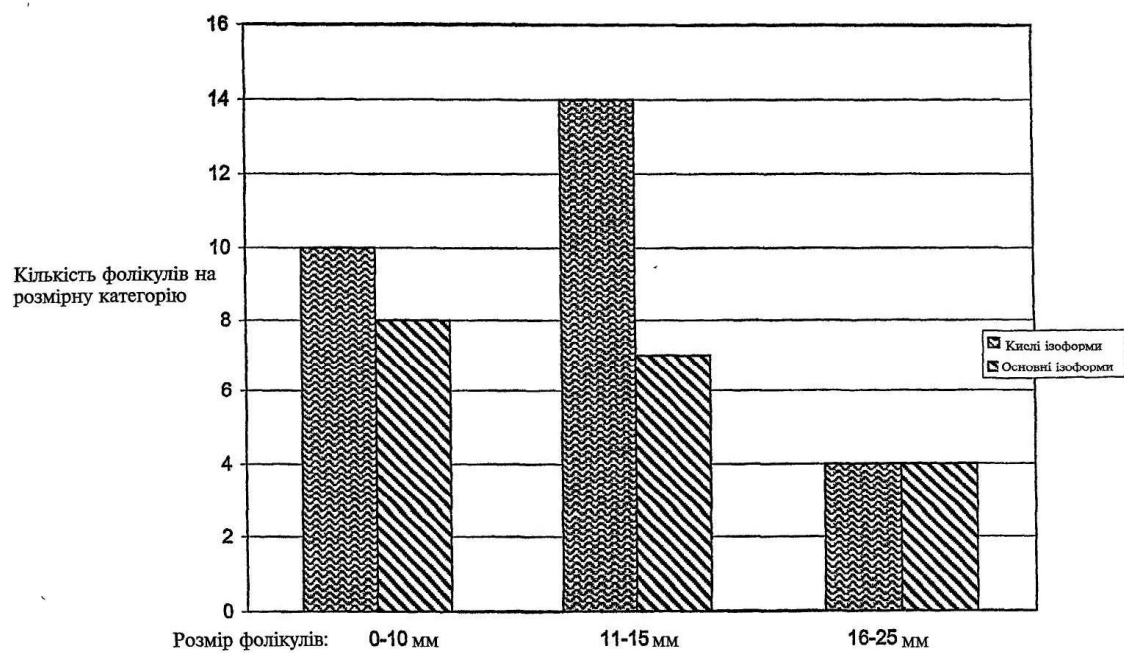
Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu
1           5           10           15
Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys
           20           25           30
Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln
           35           40           45
Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro
           50           55           60
Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr
65           70           75           80
Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val
           85           90           95
Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu
           100           105           110
  
```



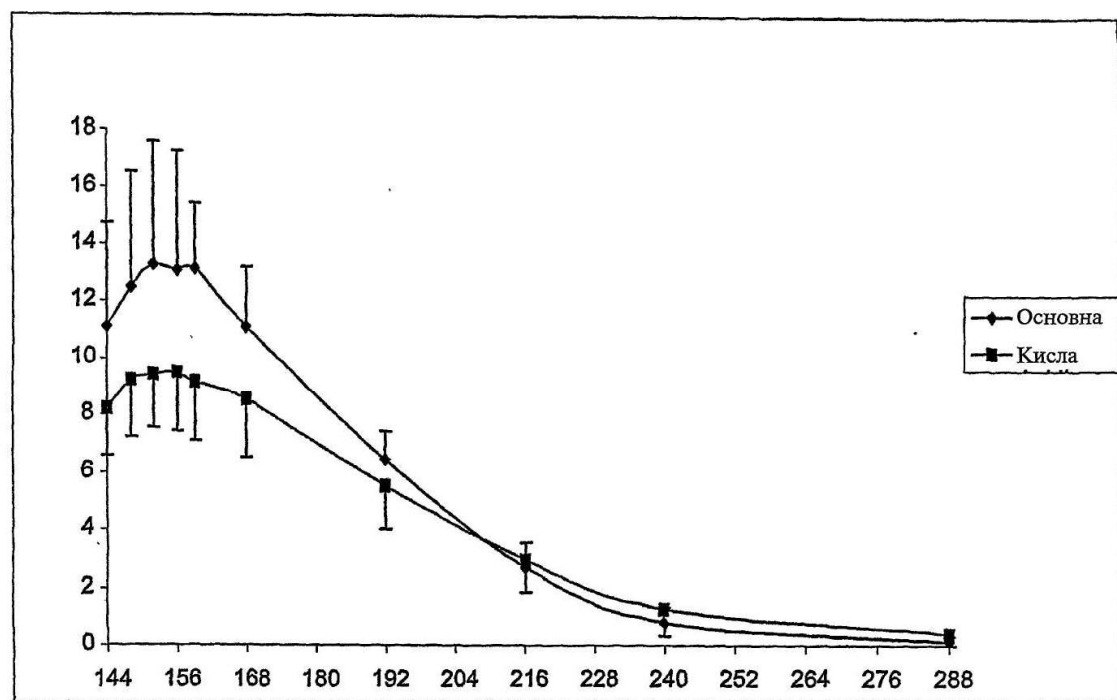
ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4

Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Pro
1				5						10				15	
Phe	Phe	Ser	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu	Gln	Cys	Met	Gly	Cys	Cys
			20					25					30		
Phe	Ser	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr	Pro	Leu	Arg	Ser	Lys	Lys	Thr	Met	Leu
		35						40					45		
Val	Gln	Lys	Asn	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Ala	Lys	Ser
		50					55					60			
Tyr	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Met	Gly	Gly	Phe	Lys	Val	Glu	Asn	His	Thr
65					70					75				80	
Ala	Cys	His	Cys	Ser	Thr	Cys	Tyr	Tyr	His	Lys	Ser				
				85						90					

ΦΙΓ. 5

Asn	Ser	Cys	Glu	Leu	Thr	Asn	Ile	Thr	Ile	Ala	Ile	Glu	Lys	Glu	Glu
1				5						10				15	
Cys	Arg	Phe	Cys	Ile	Ser	Ile	Asn	Thr	Thr	Trp	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys
			20					25					30		
Tyr	Thr	Arg	Asp	Leu	Val	Tyr	Lys	Asp	Pro	Ala	Arg	Pro	Lys	Ile	Gln
		35						40					45		
Lys	Thr	Cys	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Val	Tyr	Glu	Thr	Val	Arg	Val	Pro
		50					55					60			
Gly	Cys	Ala	His	His	Ala	Asp	Ser	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Val	Ala	Thr
65					70					75				80	
Gln	Cys	His	Cys	Gly	Lys	Cys	Asp	Ser	Asp	Ser	Thr	Asp	Cys	Thr	Val
				85						90				95	
Arg	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Tyr	Cys	Ser	Phe	Gly	Glu	Met	Lys	Glu	
				100						105					

ΦΙΓ. 6