



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118653** (13) **C2**
(51) МПК

C07K 14/59 (2006.01)

C12N 15/16 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 5/06 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2015 00722</p> <p>(22) Дата подання заявки: 29.07.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2019</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/677,331</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 30.07.2012</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.04.2015, Бюл.№ 7</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2019, Бюл.№ 4</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2013/052510, 29.07.2013</p>	<p>(72) Винахідник(и): Шкудлінські Маріуш (US), Уейнтрауб Брюс Д. (US)</p> <p>(73) Власник(и): ТРОФОДЖЕН ІНК., 9714 Medical Center Dr., Suite 1114, Rockville, MD 20850, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр. №4</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2007219116 A1, 20.09.2007 WO 2011075606 A2, 23.06.2011 US 2002110909 A1, 15.08.2002 US 2007298463 A1, 27.12.2007 WO 2012016576 A1, 09.02.2012 Engineering human glycoprotein hormone superactive analogues / Mariusz W. Szkudlinski, Neneta G. Teh, Mathis Grossmann, et. al. // Nature Publishing Group – 1996. - Vol. 14. - P. 1257-1263 Human thyroid-stimulating hormone (hTSH) subunit gene fusion produces hTSH with increased stability and serum half-life and compensates for mutagenesis-induced defects in subunit association / Mathis Grossmann, Rosemary Wong, Mariusz W. Szkudlinski, et. al. // The journal of biological chemistry – 1997. - Vol. 272 (34). - P. 21312-21316 Szkudlinski M.W. New Frontier in Glycoprotein Hormones and Their Receptors Structure-Function / Mariusz W. Szkudlinski // Frontiers in endocrinology – 2015. - Vol. 6. - P. 1664-2392</p>
--	--

(54) СУПЕРАГОНІСТИ ГЛІКОПРОТЕЇНОВОГО ГОРМОНУ ТРИВАЛОЇ ДІЇ

(57) Реферат:

Винахід стосується модифікованого поліпептиду бичачої альфа-субодиниці та модифікованого гліпротеїнового гормону, що містить дану альфа-субодиницю. Винахід також стосується

UA 118653 C2

способу стимуляції овуляції у тварин, який включає введення вказаного глікопротеїнового гормону.

ОБЛАСТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується загалом модифікованих глікопротеїнових гормонів, що мають активність суперагоністів, та їхнього застосування при лікуванні станів, пов'язаних з активністю глікопротеїнового гормону. Конкретніше, цей винахід стосується модифікованих молекул глікопротеїнів, що містять амінокислотні заміщення та один або більше вставлених пептидів в альфа-субодиницях, порівняно з альфа-субодиницями дикого типу, причому такі модифіковані молекули мають поліпшені фармакологічні властивості порівняно із глікопротеїнами дикого типу.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Гонадотропіни фолітропін (фолікул-стимулюючий гормон, FSH) і хоріонічний гонадотропін (CG), лютропін (лютеїнізуючий гормон, LH) і тиреотропний гормон (тиреотропний гормон, TSH) становлять сімейство глікопротеїнових гормонів. Кожний гормон є гетеродимером із двох нековалентно зв'язаних субодиниць: альфа та бета. У тих же видах амінокислотна послідовність альфа-субодиниці ідентична у всіх гормонах, у той час як послідовність бета-субодиниці є гормон-специфічною (Pierce, Ann Rev. Biochem 50: 465-495 (1981)). Той факт, що послідовності субодиниць високо консервативні від риб до ссавців, означає, що ці гормони еволюціонували від загального білка-предка (Фонтейн, Gen. Comp Endocrinol 32: 341-347. (1977)).

Попередні дослідження зі зміненими глікопротеїновими гормонами виявили обнадійливі дані. Наприклад, на додачу до забезпечення модифікованих глікопротеїнових гормонів з підвищеною активністю, подальші мутації показали збільшення рецепторів спорідненістю зв'язування (див., наприклад, WO 2005/089445 і WO 2005/101000). Проте, у той час як афінність була збільшена, дослідження показали, що модифіковані глікопротеїнові гормони були очищені настільки ж швидко, якщо не швидше, ніж їхні аналоги дикого типу. Для того, щоб генерувати клінічно корисний суперагоніст із підвищеною активністю, модифікований глікопротеїновий суперагоніст повинен мати підвищений період біологічного напіврозпаду на додачу до поліпшення афінності зв'язування рецептора. Проте, попередні спроби подальших модифікацій глікопротеїнових гормонів збільшити період напіврозпаду та підвищити біодоступність були менш ніж задовільними, і замість цього модифіковані глікопротеїнові гормони продемонстрували тільки ослаблену відповідь.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується модифікованого глікопротеїнового гормону, що містить амінокислотну послідовність, щонайменше, одне консервативне заміщення основної амінокислоти в Q13, E14, P16 або Q20 та інсерцію VNVTVT (SEQ ID NO: 20) між D3 і Q5 альфа-субодиницями в глікопротеїновому гормоні.

У деяких варіантах втілення винаходу модифікований глікопротеїновий гормон містить, щонайменше, два або, принаймні, три основних амінокислотних заміщення в Q13, P16 і Q20. У деяких варіантах втілення винаходу, модифікований глікопротеїновий гормон додатково містить основне амінокислотне заміщення в E14. У деяких варіантах втілення винаходу основна амінокислота являє собою аргінін.

У деяких варіантах втілення винаходу альфа-субодиниця містить амінокислотну послідовність із щонайменше 85 % ідентичністю відносно SEQ ID NO: 11, і додатково містить бета-субодиницю лютеїнізуючого гормону (LH), хоріонічного гонадотропіну (CG), фолікулостимулюючого гормону (FSH) або тиреотропного гормону ((TSH)). У деяких варіантах втілення винаходу альфа-субодиниця походить від людської альфа-субодиниці (SEQ ID NO: 6).

Цей винахід включає модифікований глікопротеїновий гормон, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше одним основним консервативним амінокислотним заміщенням на K15, K17, K20 або K24 та інсерцію NVTINV (SEQ ID NO: 1) між F6 і T7 альфа-субодиницею глікопротеїнового гормону.

У деяких варіантах втілення винаходу модифікований глікопротеїновий гормон містить, щонайменше, два, або, принаймні, три або, принаймні, чотири основних амінокислотних заміщення на K15, K17, K20 і K24. У деяких варіантах втілення винаходу, модифікований глікопротеїновий гормон додатково містить основне амінокислотне заміщення на E18. У деяких варіантах втілення винаходу основна амінокислота являє собою аргінін.

У деяких варіантах втілення винаходу, альфа-субодиниця містить амінокислотну послідовність із щонайменше 85 % ідентичністю відносно SEQ ID NO: 7, і додатково містить бета-субодиницю лютеїнізуючого гормону (LH), хоріонічного гонадотропіну (CG), фолікулостимулюючого гормону (FSH) або тиреотропного гормону ((TSH)). У деяких варіантах втілення винаходу альфа-субодиниці одержують із великої рогатої худоби, свиней, овець (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 3, відповідно).

Цей винахід включає модифікований глікопротеїновий гормон, що містить амінокислотну послідовність із щонайменше одним консервативним заміщенням основної амінокислоти на K15, K20, E18 або K24, та інсерцію NVTINV (SEQ ID NO: 1) між F6 і T7 або, альтернативно, інсерцію NV між F6 і T7 плюс інсерцію INV між T7 і T8 альфа-субодиниці глікопротеїнового гормону.

У деяких варіантах втілення винаходу модифікований глікопротеїновий гормон містить, щонайменше, два, або, принаймні, три або, принаймні, чотири основні амінокислотних заміщення в K15, E18, K20 і K24. У деяких варіантах втілення винаходу, модифікований глікопротеїновий гормон включає інсерцію NVTINV (SEQ ID NO: 1) між F6 і T7 альфа-субодиницею. У деяких варіантах втілення винаходу модифікований глікопротеїновий гормон включає інсерцію NV між F6 і T7 плюс інсерцію INV між T7 і T8 альфа-субодиницею. У деяких варіантах втілення винаходу основна амінокислота являє собою аргінін або гістидин. У деяких варіантах втілення винаходу основна амінокислота являє собою аргінін.

У деяких варіантах втілення винаходу, альфа-субодиниця містить амінокислотну послідовність із щонайменше 85 % ідентичністю відносно SEQ ID NO: 4, і додатково містить бета-субодиницю лютеїнізуючого гормону (LH), хоріонічного гонадотропіну (CG), фолікулостимулюючого гормону (FSH) або тиреотропного гормону (TSH). У деяких варіантах втілення винаходу альфа-субодиниця походить із кінської альфа-субодиниці (SEQ ID NO: 4).

Цей винахід також стосується способу стимуляції глікопротеїнового рецептора у тварини, що включає введення зазначених вище модифікованих глікопротеїнових гормонів даній тварині. Цей винахід також стосується способу стимуляції овуляції у тварини, що включає введення кожного з перерахованих вище модифікованих глікопротеїнових гормонів даній тварині. У деяких варіантах втілення винаходу твариною є людина, корова, вівця, свиня або кінь.

КОРОТКИЙ ОПИС МАЛЮНКІВ

На Фіг. 1 показано cAMP стимуляції в CHO-FSHR клітинах з обраними bFSH аналогами, виробленими тимчасовою трансфекцією. На Фіг. 1A показано порівняння Folltropin®-V (pFSH), bFSH-WT (дикого типу) з bFSH-5R аналогом. На Фіг. 1B показано ослаблення біологічної активності в *in vitro* hFSH-TR4402 аналога (перехідний 4402) на два N-кінцеві розширення (ANITV, NITV) і однієї внутрішньої неогліколізації (V78N) (SPA cAMP). На Фіг. 1C показане порівняння bFSH-5R аналогів з інсерцією 1 (5R + інсерція 1) та інсерцією 2 (5R + інсерція 2).

На Фіг. 2A и 2B показано РК скринінг різних аналогів bFSH після однократної підшкірної ін'єкції мишам. У кожному експерименті 5 мишей використовували для кожного препарату. Зразки крові брали через 24, 32 і 48 годин після ін'єкції, плазмові рівні були відраховані та були виражені дані в % від уведеної дози (% ID). FSH у зразках плазми аналізували з використанням FSH ELISA (Endocrine Technologies).

На Фіг. 3 A-D проілюстрований аналіз виробництва різних партій TR55601. Фіг. 3A ілюструє аналіз гетерогенності заряду за допомогою IEF і потім вестерн-блоттингу. Субоптимальне сіалювання Партії 3 (доріжки 2 і 3) перебуває в різкому контрасті з оптимальними сильно кислими ізоформами, виявленими в партії 4 (доріжки 5 і 6). Доріжка 1, IEF 3-10 маркер; Доріжка 2, TR55601/Партії 3 (8 мкг); Доріжка 3, TR55601/Партії 3 (4 мкг); Доріжка 4 і 8, TR4401 (LUG); Доріжка 5, TR55601/Партії 4 (8 мкг); Доріжка 6, TR55601/Партії 4 (4 мкг); Доріжка 8, IEF 3-10 маркер. Фіг. 3B ілюструє аналіз заряджених ізоформ за допомогою нейрамінідази (холерний вібріон), IEF і Вестерн-блоттингу. Неопрацьовані TR55601/Партія 4 зразки (доріжки 2 і 3) і TR55601/Партія 4 зразок, оброблені нейрамінідазою перед нанесенням 3-10 IEF гель (доріжки 4-6). Доріжка 1, IEF 3-10 маркер; Доріжка 2, неопрацьована TR55601/Партія 4 (8 мкг); Доріжка 3, неопрацьована TR55601/Партія 4 (4 мкг); Доріжка 4, оброблена TR55601/Партія 4 (4 мкг); Доріжка 5, оброблена TR55601/Партія 4 (2 мкг); Доріжка 6, оброблена TR55601/Партія 4 (1 мкг). Профіль IEF для нейрамінідаза дигестованих ізоформ змістився в діапазоні р від 7,8 до 10,0. Середнє зрушення р становить приблизно 5 одиниць рн і множинні смуги (близько до 10 смуг) перетворюються в одну основну смугу (р ~9,5) і три слабкі смуги (р 7, 8-10,0), указуючи, що більшість спостережуваних гетерогенностей зарядів (Фіг. 3A - Партія 4) залежить від кінцевих залишків сілової кислоти, з невеликими іншими модифікаціями, такими як деамідування та/або протеолітична деградація. Залишкові основні групи (PI 4.8-5.5), наведені на Фіг. 3B, є неспецифічними, отриманими від підготовки нейрамінідази. На Фіг. 3C проілюстровано аналіз заряджених ізоформ TR 55601-партія 5 по IEF 3-10 у пі градиентном гелі (IEF 3-10 з наступним вестерн-блоттингом. Доріжка 1, IEF 3-10 маркер; Доріжка 2, TR 55601-партія 5 (4 мкг); Доріжка 3, TR 55601-партія 5 (4 мкг); Доріжка 4, TR 55601-партія 4 (4 мкг); Доріжка 5, TR 55601-партія 4 (8 мкг); Доріжка 6, TR 55601-партія 3 (4 мкг); доріжка 7, TR 55601-партія 3 (8 мкг). На Фіг. 3D показаний SDS-вестерн-блоттинг аналіз TR55601 Партії 5 порівняно з TR55601 Партією 4 і Fol-V. Доріжка 1, маркерний білок; Доріжка 2: Партія 4, 500 мкг; Доріжка 3: Партії 5, LUL; Доріжка 4:

порожня доріжка; Доріжка 5: Партії 4, 4 мкг; Доріжка 6: Партія 5, 1 мкг; Смуга 7: Fol-V, 673 мкг; Доріжка 8: маркерний білок.

На Фіг. 4 наведені результати класичного біотестування Steelman-Pohley з hCG збільшенням яєчників вага в незрілих (22 дня) самок пацюків Спрега-Доулі. Масу яєчників визначали через 72 години після прийому препарату. Дані представлені у вигляді середньої загальної ваги яєчників двох яєчників + SEM (n=5 на дозу, у групі). Пацюки були стимульовані однією ін'єкцією випробуваного виробу або носія, з додаванням 40 МЕ hCG. Були використані наступні лікарські групи: 1 група одержувала hCG тільки (не FSH), групи 2-5 одержували TR55601 партія 4 (0, 0,33 мкг, 1,0 мкг, 3,33 мкг, і 10 мкг, відповідно ліворуч праворуч), групи 6-8, одержували Folltropin-V® (3,333 мкг, 10,000 мкг, і 30,000 мкг відповідно зліва направо), і група 9-10 одержувала TR4401 (1,0 мкг і 3,33 мкг).

На Фіг. 5 наведений протокол синхронізації фолікулярної хвилі для суперовуляції, індукції овуляції та фіксованого часу штучного запліднення. В 8 ін'єкціях Folltropin-VR (Bioniche) заміняли однієї або двома ін'єкціями TR55601.

На Фіг. 6 показане середнє число фолікулів (від 3 до 5 мм у діаметрі) під час суперстимуляційної обробки м'ясних корів, що одержували 60 мкг rFSH заданої одним їм ін'єкції або 300 мкг Folltropin-V (контроль) проведеної двічі в день ІМ ін'єкції протягом 4 днів (3 експерименти об'єднані).

На Фіг. 7 показане середнє число фолікулів 6 до 8 мм у діаметрі при суперстимуляційній обробці м'ясних корів, оброблених 60 мкг rFSH заданою однією внутрішньом'язовою ін'єкцією або 300 мкг Folltropin-V (контроль), проведеної двічі на день ІМ щоденних ін'єкцій протягом 4 днів (3 експерименти об'єднані).

На Фіг. 8 показане середнє число фолікулів > 9 мм у діаметрі під час суперстимуляційної обробки м'ясних корів, що одержували 60 мкг rFSH заданою однією внутрішньом'язовою ін'єкцією або 300 мкг Folltropin-V (контроль), проведеною двічі щоденно внутрішньом'язовою ін'єкцією більше 4 днів (3 експерименти об'єднані).

На Фіг. 9 показані профілі середнього діаметра всіх фолікулів > 3 мм у діаметрі під час суперстимуляційної обробки м'ясних корів, що одержували 60 мкг rFSH заданою однією внутрішньом'язовою ін'єкцією або 300 мкг Folltropin-V (контроль), проведеною двічі щоденно внутрішньом'язовою ін'єкцією більше 4 днів (3 експерименти об'єднані).

На Фіг. 10A наведене порівняння виробництва cAMP для інсерції в альфа-субодиниці людини (A2), інсерції без аміно-кінцевого валіну (Інсерція 2), 5 аргінінових заміщень тільки без інсерції (5R) і контролю тільки середовища. Фіг. 10B показує EC50 для трьох випробуваних конструкцій.

На Фіг. 11A наведене порівняння виробництва cAMP у відповідь на людську модифіковану альфа-субодиницю з інсерцією SEQ ID NO: 1 і модифіковану альфа-субодиницю великої рогатої худоби, які не мають інсерції. На Фіг. 11B наведене порівняння виробництва cAMP у відповідь на людську модифіковану альфа-субодиницю та субодиниці великої рогатої худоби з і без різних інсерцій.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Цей винахід забезпечує молекули модифікованого суперактивного глікопротеїнового гормону, що показують дивно підвищену ефективність і підвищений період біологічного напіврозпаду порівняно з їхніми аналогами дикого типу. Модифіковані означає, що, у той час як білок містить амінокислотну послідовність, що відрізняється від глікопротеїнових гормонів дикого типу, послідовність була змінена так, що вона не збігається з відомою глікопротеїною послідовністю іншого виду гормонів. Суперактивність може бути оцінена відповідно до різних параметрів, у тому числі активності та ефективності. Ефективність є параметром біологічної активності, що визначається шляхом виміру половини максимальної відповіді. Розходження в ефективності визначаються шляхом порівняння значення відповіді глікопротеїнових гормонів аналога на півшляху між базовим і максимальним значенням (EC₅₀) порівняно з глікопротеїновим гормоном дикого типу. Відповіді глікопротеїнового гормону можуть бути виміряні in vitro з використанням очищених білків, або можуть бути оцінені наступною перехідною трансфекцією нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок. Відповіді глікопротеїнового гормону також можуть бути виміряні in vivo, тобто у тварини, що реагує на аналоги глікопротеїнового гормону. Такі відповіді охоплюють будь-яку відому клітинну або біологічну та кількісну або якісну відповідь глікопротеїнового гормону з його рецептором, наприклад, виробництво cAMP, синтез білків, таких як прогестерон, здатність до запліднення, швидкість утворення бластоцистів, розвиток ембріона в заплідненій яйцеклітині тощо. Ефективність (V_{макс}) або максимальна реакція - це ще один параметр біологічної активності. Як обговорювалося в даній заявці, параметри біологічної активності можуть змінюватися

залежно від кількості рецепторів і зв'язування рецептора в аналізі клітинної лінії. У системах з меншою кількістю рецепторів або порушенням зв'язком, розходження більш помітні в плані V_{max} (ефективність). У системах, де відбувається надекспресія рецепторів, розходження в ефективності більш помітні.

Наприклад, у тих випадках, коли модифікований глікопротеїновий гормон є модифікованою FSH або CG молекулою, *in vivo* кількісні і якісні параметри, такі як кількість ооцитів, швидкість запліднення та бластоцисти та швидкості утворення зародків, можуть бути виміряні в максимально ефективній дозі для числа ооцитів. Максимально ефективною дозою для кількості ооцитів є оптимальна кількість суперактивного FSH для якості ооцитів і їхньої кількості. Максимально ефективна доза для кількості ооцитів залежить від маси та швидкості метаболізму тварини. Наприклад, максимально ефективна доза для більшої тварини з повільнішою швидкістю метаболізму більша, ніж максимально ефективна доза для меншої тварини з вищою швидкістю метаболізму. Максимально ефективна доза визначається емпірично для кожної тварини.

Однак, незалежно від використовуваної системи, білки модифікованого суперактивного глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу можуть демонструвати щонайменше, приблизно від 2 до 10 кратне збільшення ефективності або щонайменше приблизно 20-кратне, 30-кратне, 40-кратне, 50-кратне, 60-кратне, 70-кратне, 80-кратне, 90-кратне або навіть 100-кратне збільшення активності порівняно з диким типом, або збільшення максимальної ефективності від 2 до 10 %, або щонайменше 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або навіть 100 %-не збільшення максимальної ефективності порівняно з аналогом дикого типу. Суперактивні аналоги відповідно до даного винаходу можуть також забезпечувати приблизно 5-10 кратне збільшення активності або від 5 % до 10 % збільшення максимальної ефективності порівняно з FSH дикого типу. Деякі з модифікованих білків відповідно до даного винаходу можуть демонструвати щонайменше приблизно від тридцятикратного до п'ятдесятикратного збільшення активності або від 30 % до 50 % збільшення максимальної ефективності порівняно з диким типом. Таким чином, білки модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу можуть бути корисні для лікування суб'єктів з низькою кількістю рецепторів або недоліками у відповіді рецептора, тому що модифікований білок відповідно до даного винаходу може підтримувати щонайменше 10-кратне збільшення ефективності або 10 %-не збільшення максимальної ефективності навіть у системах з низькою кількістю рецепторів або відповіддю.

Швидкість усмоктування модифікованого суперактивного глікопротеїнового гормону може привести до збільшення тривалості дії. Аналог модифікованого глікопротеїнового гормону зі зменшенням швидкості поглинання та збільшення тривалості дії може бути корисним для гіпосенситивних суб'єктів, таких як ті, хто страждає від безпліддя. Швидкість поглинання вимірюють за допомогою K_a . Швидкість виведення вимірюють за допомогою K_e .

Молекули модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу включають модифіковані білки видів, обраних із групи, що складається з людини, великої рогатої худоби, коней, свиней, овець, мишей, пацюків, кроликів, приматів та ін. Глікопротеїновий гормон риб (також відомий як GTN-1) може використовуватися в аквакультурі, тобто, для того, щоб допомогти росту інших видів, що перебувають під погрозою зникнення або риб у неволі. Інші види модифікованих глікопротеїнових гормонів можуть бути використані в сільському господарстві для розведення, і далі в лабораторних умовах для тестування впливу різних комбінованих мутацій на різні чоловічі та жіночі стани, пов'язані із глікопротеїновим гормоном.

Молекули модифікованого глікопротеїнового гормону інших видів мають заміщення в положеннях, що відповідають положенням у модифікованих молекулах глікопротеїнового гормону людини (наприклад, Фіг. 12), великої рогатої худоби (див. Фіг. 4), овець, коней і свиней, описані в даній заявці, які можуть бути ідентифіковані за допомогою будь-якої програми вирівнювання, включаючи, але не обмежуючись, застосування програм DNASIS, ALIONment, SIM і GCG, таких як Gap, BestFit, FrameAlign і Compare.

Молекули модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу включають, щонайменше, модифіковану альфа-субодиницю, де альфа-субодиниця містить, щонайменше, дві основні амінокислоти, наприклад на лізинових залишках. В альфа-субодиницях людини основні амінокислоти можуть бути уведені в положеннях 13, 14, 16 і 20 дикого типу людської альфа-субодиниці (SEQ ID NO: 6). В інших видах основні амінокислоти можуть бути уведені в положеннях, що відповідають положенням 15, 17, 20 і 24 дикого типу бичачої альфа (SEQ ID NO: 2), дикого типу свині альфа (SEQ ID NO: 5) і дикого типу овець альфа (SEQ ID NO: 3), і положеннях 15, 20 і 24 дикого типу коней альфа (SEQ ID NO: 4). Глутаматний залишок у положенні 18 (бичачий, свинячий, овечий і кіньський) може бути також заміщений основною амінокислотою. У деяких варіантах втілення винаходу основна

амінокислота може являти собою аргінін або гістидин. У деяких варіантах втілення винаходу основна амінокислота може бути аргініном.

Пептид з послідовністю NVTINV (SEQ ID NO: 1) або TNVTINV (SEQ ID NO: 12), або VNVTINVT (SEQ ID NO: 20) може бути вставлений між амінокислотами D3 і Q5 людської альфа-субодиниці (SEQ ID NO: 6), а також між F6 і T7 альфа-субодиниці великої рогатої худоби, свиней, овець і коней.

Альтернативно, альфа-субодиниця модифікованого глікопротеїнового гормону биків, свиней, овець або коней може включати інсерцію NV між F6 і T7 плюс інсерцію INV між T7 і T8. Модифіковані білки відповідно до даного винаходу можуть також містити додаткові заміщення, особливо консервативні заміщення, які не змінюють поліпшені властивості білка. Звичайно, однак, такі модифіковані білки містять менш чим п'ять заміщень у положеннях, інших, чим ті, які перераховані вище, і можуть проявляти повну ідентичність амінокислотної послідовності з відповідного дикого типу глікопротеїновим гормоном альфа в положеннях, інших, чим зазначені вище положення.

Основні амінокислоти включають амінокислоти лізин, аргінін і гістидин, а також будь-які інші основні амінокислоти, які можуть бути модифікацією кожної із цих трьох амінокислот, синтетичними основними амінокислотами, які звичайно не зустрічаються в природі, або будь-якою іншою амінокислотою, що позитивно заряджена при нейтральному рН. Основні амінокислоти, зокрема, обрані із групи, що складається з лізину та аргініну.

Приклади модифікованих альфа молекул, що мають основні амінокислотні заміщення та пептидну інсерцію, показані в SEQ ID NO: 11 (людини), SEQ ID NO: 7 (бика), SEQ ID NO: 8 (вівці), SEQ ID NO: 10 (свині), і SEQ ID NO: 9 (коней). Цей винахід стосується модифікованих глікопротеїнів з амінокислотними послідовностями із щонайменше 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або вище ідентичністю з кожної з SEQ ID NO: 7 до 11.

Модифіковані альфа-субодиниці білків модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу можуть також мати альфа-субодиницю, що містить два, три, чотири або п'ять основних амінокислотних заміщень. Заміщені амінокислоти можуть бути залишками лізину, глутаматними залишками, залишками проліну або глутаміновими залишками. Наприклад, бичачі альфа-субодиниці дикого типу, один або більше з лізінів у положеннях 15, 17, 20 і 24 можуть бути заміщені, а також глутамат у положенні 18, основною амінокислотою, такою як аргінін і гістидин. У дикого типу людських альфа-субодиницях, один або більше із глутамінів у положеннях 13 і 20 можуть бути заміщені, а також глутамат у положенні 14 і пролін у положенні 16 основною амінокислотою, такою як аргінін і гістидин. У дикого типу свинячій альфа-субодиниці, один або більше з лізінів у положеннях 15, 17, 20 і 24 можуть бути заміщені, а також глутамат у положенні 18, основною амінокислотою, такою як аргінін і гістидин. У дикого типу овечій альфа-субодиниці один або більше з лізінів у положеннях 15, 17, 20 і 24 можуть бути заміщені, а також глутамат у положенні 18, основною амінокислотою, такою як аргінін і гістидин. У дикого типу кінській альфа-субодиниці один або більше з лізінів у положеннях 15, 20 і 24 можуть бути заміщені, а також глутамат у положенні 18, основною амінокислотою, такою як аргінін і гістидин.

Як приклад, додатково модифіковані бичачі альфа-субодиниці представлені в послідовностях, викладених в SEQ ID NO: 13 до 19 і 22. Цей винахід стосується модифікованих глікопротеїнів з амінокислотними послідовностями із щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або вище ідентичністю з кожною з SEQ ID NO: 13 з 19 і 22.

Як приклад, додатково модифіковані кінські альфа-субодиниці представлені в послідовностях, викладених в SEQ ID NO: 38 до 42. Цей винахід забезпечує модифіковані глікопротеїни з амінокислотними послідовностями із щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або вище ідентичністю з кожною з SEQ ID NO: 43 до 45.

Додатково модифіковані альфа-субодиниці можуть бути сконструйовані шляхом порівняння амінокислотних послідовностей розглянутої альфа-субодиниці з послідовностями інших видів, щоб визначити відповідні основні залишки в білках інших видів. Такі способи описані в патенті США 6,361,992, що включений у дану заявку як посилання в повному обсязі. Розгляд може бути також надано відносної біологічної активності глікопротеїнового гормону з різних видів, щоб обрати види для порівняння та заміщення. Крім того, гомологічне моделювання на основі структури суміжних глікопротеїнових гормонів корисне, щоб ідентифікувати залишки амінокислот на поверхні. Щоб змінити додаткові амінокислотні позиції, глікопротеїновий гормон послідовності людей і не-людей можуть бути вирівняні за допомогою стандартних комп'ютерних

програм, таких як DNASIS (Hitachi Software Engineering) або будь-якої іншої програми вирівнювання з перерахованих вище, у тому числі, але не обмежуючись наведеним, ALIONment, SIM і GCG програми, таких як Gap, BestFit, FrameAlign і Compare. Амінокислотні залишки, які відрізняються між людським і не-людським глікопротеїновим гормоном, можуть

5 бути заміщені за допомогою одного із зазначених вище методів, і отриманий глікопротеїновий гормон аналізували на його ефективність за допомогою одного зі згаданих у даній заявці аналізів.

Відповідно, даний винахід також представляє модифікований FSH білок, що має підвищену активність порівняно з FSH дикого типу тих же видів, що містять модифіковані альфа-субодиниці, описані в даній заявці.

10

Даний винахід також представляє модифікований LH білок, що має підвищену активність порівняно з дикого типу LH тих же видів, що містять модифіковані альфа-субодиниці, описані в даній заявці.

Даний винахід також представляє модифікований TSH білок, що має підвищену активність порівняно з дикого типу TSH з тих же видів, що містять модифіковані альфа-субодиниці, описані в даній заявці.

15

Даний винахід також представляє модифікований CG білок, що має підвищену активність порівняно з дикого типу CG з тих же видів, що містять модифіковані альфа-субодиниці, описані в даній заявці.

20

Цей винахід також охоплює фрагменти аналогів, описаних у даній заявці, які мають суперагоністичну або антагоністичну активність. Наприклад, фрагменти модифікованих альфа-ланцюгів відповідно до даного винаходу можуть бути використані окремо або в поєднанні з будь-яким фрагментом або повною довжиною бета ланцюга, щоб створити суперагоністичну сполуку. У деяких випадках, фрагменти молекул модифікованої альфа-субодиниці відповідно

25 до даного винаходу також можуть бути використані як антагоністи, наприклад, щоб обмежити тривалість активності терапевтичного глікопротеїнового гормону, після того, як він був уведений.

Даний винахід також представляє послідовності нуклеїнових кислот, що кодують модифіковані глікопротеїнові гормони, описані в даній заявці. Даний винахід також представляє нуклеїнові кислоти, які кодують поліпептиди з консервативними амінокислотними заміщеннями. Нуклеїнові кислоти відповідно до даного винаходу можуть кодувати поліпептиди, які транспортують цукор. Виділені нуклеїнові кислоти можуть мати щонайменше приблизно 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 99 % ідентичність послідовності із зазначеними вище послідовностями. Виділені нуклеїнові кислоти можуть кодувати поліпептид,

30 що має амінокислотну послідовність, що має ідентичність, щонайменше приблизно 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, або послідовність, ідентичну 99 % амінокислотних послідовностей, кодованих наведеними вище номерами доступу. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує транспортер, може гібридизуватися з наведеними вище послідовностями нуклеїнових кислот.

35

Нуклеїнова кислота, що кодує білок модифікованого глікопротеїнового гормону, може бути генетично злита з послідовностями, що контролюють експресію, для експресії. Підходящі послідовності, що контролюють експресію, включають промотори, які застосовні в цільовому організмі-хазяїні. Такі промотори добре відомі фахівцям у даній галузі для різних хазяїв прокаріотичних та еукаріотичних організмів і описані в літературі. Наприклад, такі промотори

40 можуть бути виділені із природних генів або можуть бути синтетичними або химерними промоторами.

45

Даний винахід також представляє касети експресії для інсерції нуклеїнової кислоти, що кодує білок модифікованого глікопротеїнового гормону в цільових молекулах нуклеїнових кислот, таких як вектори. Для цього до касети експресії постачаються нуклеотидні послідовності в 5'- і 3'-флангах, щоб полегшити видалення з та інсерції в певних положеннях послідовності, як, наприклад, сайти пізнання ферментів рестрикції або послідовності-мішені для гомологічної рекомбінації, як, наприклад, каталізованої рекомбіназами. На додачу до касети нуклеїнової кислоти або молекули експресії відповідно до даного винаходу, вектор може містити додаткові гени, такі як маркерні гени, які дозволяють вибір згаданого вектора для клітини-хазяїна,

50 прийнятної в підходящих умовах. Як правило, вектор також містить одне або кілька джерел реплікації. Вектори можуть також містити термінаторні послідовності, щоб обмежити довжину за межами транскрипції нуклеїнової кислоти, що кодує транспортери відповідно до даного винаходу.

55

Бажано, щоб молекули нуклеїнових кислот, що втримуються у векторах, були функціонально пов'язані з послідовностями, що контролюють експресію, що дозволяють

60

експресію, тобто такими, що забезпечують транскрипцію та синтез трансльованої РНК, у прокаріотичних або еукаріотичних клітинах.

Термін "ізолюваний" відноситься до молекул, відділених від інших компонентів клітин/тканин (наприклад, ДНК або РНК), які присутні в природному джерелі макромолекули.

Термін "ізолювані", використовуваний у даній заявці, також відноситься до нуклеїнової кислоти або пептиду, що по суті не містить клітинного матеріалу, вірусного матеріалу, і культурального середовища, коли їх одержують способами рекомбінантних ДНК, або, по суті, є вільними від хімічних попередників або інших хімічних речовин, при хімічному синтезі. Крім того, виділена нуклеїнова кислота або пептид може включати кислоти або пептидні фрагменти нуклеїнових кислот, які не зустрічаються в природі у вигляді фрагментів, і не будуть знайдені в природному стані.

Терміни "плазмід" і "вектор" використовуються взаємозамінно, оскільки плазмід є найчастіше використовуваною формою вектора. Проте, винахід призначений, щоб включати такі інші форми векторів експресії, які мають еквівалентні функції і які стануть відомі в даній галузі, що відноситься до даної заявки. Вектор може бути кожною з декількох нуклеїнових кислот, у яку бажана послідовність може бути вставлена обмеженням і лігуванням для транспортування між різними генетичними середовищами або для експресії в клітині-хазяїні. Вектори, як правило, складаються із ДНК, РНК, хоча вектори також доступні. Вектори включають, але не обмежуються ними, плазміди та фагеміди. Клонуючий вектор є таким, що здатний до реплікації в клітині-хазяїні, і який додатково характеризується одним або більше сайтів ендонуклеазної рестрикції, у яких вектор може бути вирізаний обумовленим чином і в який бажана послідовність ДНК може бути лігована так, щоб новий рекомбінантний вектор зберігав свою здатність до реплікації в клітині-хазяїні. У випадку плазмід, реплікація необхідної послідовності може відбуватися багато разів, тому що плазміда збільшується числом копій усередині бактерії-хазяїна або всього один раз у хазяїні перед відтворенням хазяїна шляхом мітозу. У випадку фагу, реплікація може активно відбуватися під час літичної фази або пасивно під час лізогенної фази.

Вектори можуть додатково містити промоторну послідовність. Промотор може включати нетрансльовану послідовність нуклеїнової кислоти, як правило, розташовану вище по потоку області, що кодує, яка містить сайт для того, щоб ініціювати транскрипцію нуклеїнової кислоти. Область промотору може також включати інші елементи, які діють як регулятори експресії генів. В інших варіантах втілення цього винаходу вектор експресії містить додаткову область, щоб допомогти у виборі клітин, які мають вектор експресії. Послідовність промотору часто обмежена (включно) на її 3'-кінці сайтом ініціації транскрипції та проходить вище (5' напрямом), щоб включити мінімальне число основ або елементів, необхідних для ініціації транскрипції на рівні вище фонових детектованих значень. У промоторній послідовності можна знайти сайт ініціації транскрипції, а також домени зв'язування білка, відповідального за зв'язування РНК-полімерази. Еукаріотичні промотори часто, але не завжди, містять ТАТА бокси та САТ бокси. Активація промоторів може бути специфічною для певних клітин або тканин, наприклад, за допомогою транскрипційних факторів, які експресуються тільки в певних тканинах або промотор може бути повсюдним і здатним до експресії в більшості клітин або тканин.

Вектори можуть додатково містити один або кілька маркерних послідовностей, придатних для використання при ідентифікації та селекції клітин, які були перетворені або трансфіковані вектором. Маркери включають, наприклад, гени, що кодують білки, які збільшують або зменшують опір або чутливість до антибіотиків або інших сполук, гени, які кодують ферменти, діяльність яких детектується стандартними аналізами, відомими в даній галузі (наприклад, β -галактозидаза або лужна фосфатаза), і гени, які помітно впливають на фенотип трансформованих або трансфікованих клітин, хазяїв, колоній або бляшок. Вектори можуть бути такими, які здатні до автономної реплікації та експресії структурних генів, що є присутнім у продуктах сегментів ДНК, до якого вони функціонально приєднані. Вектор експресії, той, у якому бажана послідовність нуклеїнової кислоти може бути вбудована обмеженням і лігуванням так, що він функціонально з'єднаний або функціонально пов'язаний з регуляторними послідовностями, і може бути експресований як РНК-транскрипт. Експресія відноситься як до транскрипції та/або трансляції ендегенного гену, трансгену або кодувальної області у клітині.

Кодувальна послідовність і регуляторна послідовність, функціонально з'єднані, коли вони ковалентно зв'язані таким чином, щоб помістити експресію або транскрипцію послідовності, що кодує, під впливом або контролем регуляторних послідовностей. Якщо бажано, що кодувальні послідовності будуть трансльовані на функціональний білок, дві послідовності ДНК, як зазначається, функціонально з'єднані, якщо індукція промотору в регуляторних послідовностях призводить до 5' транскрипції кодувальної послідовності, і якщо природа зв'язку між двома

послідовностями ДНК не (1) призводить до введення мутації зрушення рамки, (2) не заважає здатності області промотору направляти транскрипцію кодувальних послідовностей, або (3) не заважає впливу відповідного РНК-транскрипту трансляції на білок. Таким чином, область промотору може бути функціонально з'єднана з кодувальною послідовністю, якщо область промотору була здатна здійснювати транскрипцію цієї послідовності ДНК таким чином, що в результаті транскрипт може бути трансльований на потрібний білок або поліпептид.

Деякі аспекти цього винаходу включають трансформацію та/або трансфекцію нуклеїнових кислот. Трансформація є введенням екзогенної або гетерологічної нуклеїнової кислоти всередину прокаріотичної клітини. Трансфекція є введенням екзогенної або гетерологічної нуклеїнової кислоти усередину еукаріотичної клітини. Трансформація або трансфекція нуклеїнової кислоти може або не може бути інтегрована (ковалентно зв'язана) у хромосомну ДНК, складову геному клітини. У прокаріотах, наприклад, трансформована нуклеїнова кислота може бути збережена на епісомальному елементі, такому як плазмід або вірусний вектор. Стосовно еукаріотичних клітин, стабільно трансфікованою клітиною є та, у якій трансфекція нуклеїнової кислоти стала інтегрована в хромосому так, що вона успадковується дочірніми клітинами за допомогою хромосомної реплікації. Ця стабільність демонструє здатність еукаріотичної клітини встановити клітинні лінії або клони, що складаються з популяції дочірніх клітин, що містять трансфіковану нуклеїнову кислоту.

Існують численні експресуючі вектори *E. coli* (кишкова паличка), відомі будь-якому фахівцеві в даній галузі, які корисні для експресії інсерції нуклеїнової кислоти. Інші мікробні хазяї, підходящі для використання, включають бацили, такі як *Bacillus subtilis*, і інші ентеробактерії, такі як *Salmonella*, *Serratia*, і різні види *Pseudomonas*. У цих прокаріотичних хазяях можна також зробити вектори експресії, які звичайно містять контролюючу експресію послідовності, сумісні із клітиною-хазяїном (наприклад, джерело реплікації). Крім того, будь-яка кількість різних відомих промоторів буде присутня, наприклад, у системі промотору лактози, триптофанової (Trp) промоторної системи, системи промоторної бета-лактамази, або системи промотору з фагу лямбда. Промотори звичайно контролюють експресію, необов'язково за допомогою операторної послідовності та мають послідовності зв'язування рибосомного сайту, наприклад, для ініціації та термінації транскрипції та трансляції. За необхідності, кінцева амінокислота метіонін може бути забезпечена шляхом інсерції Met-кодону 5'і в рамку з наступною інерцією нуклеїнової кислоти. Крім того, карбоксильне-кінцеве подовження інсерції нуклеїнової кислоти може бути вилучене з використанням стандартних процедур олігонуклеотидного мутагенезу.

Крім того, можуть бути використані експресії дріжджів. Є кілька переваг систем експресії в дріжджах. По-перше, існують докази того, що білки, вироблені в системах секреції дріжджів, виявляють правильне дисульфідне спарювання. По-друге, посттрансляційне глікозилювання ефективно здійснюється дріжджовими секреторними системами. Пре-про-альфа-факторна лідерна область *Saccharomyces cerevisiae* (кодована MF"-1 геном) звичайно використовується для прямої секреції білка із дріжджів (Brake, Proc. Nat. Acad. Sci., 81: 4642-4646 (1984)). Лідерна область пре-про-альфа-фактора містить сигнальний пептид і про-сегмент, що включає послідовність пізнавання для дріжджової протеази, кодованої геном KEX2: цей фермент розщеплює білок-попередник на карбоксильній стороні сигнальної дипептидної послідовності розщеплення Lys-Arg. Кодуюча послідовність FSH може бути злита в рамці зчитування з лідерною областю пре-про-альфа-фактора. Цей конструкт потім поміщають під контроль сильної промоторної транскрипції, такої як алкогольдегідрогеназний I промотор або гліколітичний промотор. Кодуюча послідовність нуклеїнової кислоти - з наступною трансляцією кінцевого кодона, а потім термінацією транскрипції сигналів. Альтернативно, кодуючі послідовності нуклеїнової кислоти можуть бути злиті з кодуючою послідовністю другого білка, наприклад, Sj26 або бета- галактозидазою, які можуть бути використані для полегшення очищення злитого білка за допомогою афінної хроматографії. Інсерція сайтів розщеплення протеазою, щоб відокремити компоненти злитого білка застосовна до конструктів, використовуваних для експресії в дріжджах. Ефективне пост трансляційне глікозилювання та експресія рекомбінантних білків також можуть бути досягнуті в системах *Baculovirus*.

Клітини ссавців дозволяють експресію білків у середовищі, що сприяє важливим посттрансляційним модифікаціям, таким як складання та спарювання цистеїну, додавання складних вуглеводних структур, і секреція активного білка. Вектори, застосовні для експресії активних білків у клітинах ссавців, характеризуються інсерцією кодуючої послідовності білка між сильним промотором вірусу та сигналом поліаденілювання. Вектори можуть містити гени, що надають стійкість до гігromіцину, опору до гентаміцину, або інших генів або фенотипів, що підходять для використання як маркери селективності або опору метотрексату для ампліфікації гена. Химерний білок кодуючої послідовності може бути введений у клітинні лінії в клітинах

яєчника китайського хом'ячка (CHO) з використанням стійкого до метотрексату коду чого вектора, або інших клітинних ліній за допомогою вибору підходящих маркерів. Наявність векторної ДНК у трансформованих клітинах може бути підтверджена саузерн-блоттинг-аналізом. Виробництво РНК, що відповідає інсерції кодуєчої послідовності, може бути

5 підтверджене за допомогою нозерн-блоттинг-аналізу. Ряд інших ліній клітин-хазяїв здатних секретувати інтактні людські білки, що були розроблені в даній галузі, включають клітинні лінії CHO, HeLa клітини, клітинні лінії мієломи, клітини Jurkat тощо. Експресуючі вектори для цих клітин можуть включати послідовності, що контролюють експресію, такі, як джерело реплікації, промотор, енхансер, і необхідні сайти обробки інформації, такі як сайти зв'язування рибосом

10 сплайсингом РНК, сайти поліаденілювання, і послідовності термінації транскрипції. Прикладами послідовностей, що контролюють експресію, є промотори, отримані з генів імуноглобуліну, SV 40, аденовірусу, бичачого вірусу папіломи тощо. Вектори, що містять сегменти розглянутої нуклеїнової кислоти, можуть бути передані в клітину-хазяїна добре відомими методами, які змінюються залежно від типу клітини-хазяїна. Наприклад, перетворення хлориду кальцію

15 звичайно використовують для прокаріотичних клітин, тоді як фосфат кальцію, DEAE декстран, або ліпофектин-опосередкована трансфекція або електропорація можуть бути використані для інших клітин-хазяїв.

Альтернативні вектори для експресії генів у клітинах ссавців, подібні до розроблених для експресії людського гамма-інтерферону, тихорецького активатора плазміногену, фактор згортання VIII, поверхневого антигену вірусу гепатиту В, NexinI протеази та основного білка основних еозинофілів, можуть бути використані. Крім того, вектор може включати CMV промоторні послідовності та сигнал поліаденілювання, доступні для експресії нуклеїнових кислот, вставлених у клітини ссавців (наприклад, COS-7).

Експресія гена або гібридного гена може бути *in vivo* або *in vitro*. *In vivo* синтез включає перетворення прокаріотичних або еукаріотичних клітин, які можуть служити як клітини-хазяї для вектора. Альтернативно, експресія гена може відбуватися в лабораторній системі експресії. Наприклад, *in vitro* системи транскрипції є комерційно доступними, і зазвичай використовуються для синтезу щодо більших кількостей мРНК. У таких системах *in vitro* транскрипції, нуклеїнова кислота, що кодує глікопротеїновий гормон, може бути клонована у вектор експресії, суміжний із

25 промотором транскрипції. Наприклад, вектори клонування та експресії Bluescript II містять сайти множинного клонування, які примикають до сильних прокаріотичних промоторів транскрипції (Stratagene). Доступні набори, які містять всі необхідні реагенти для синтезу в пробірці РНК із шаблону ДНК, такі як вектори Bluescript (Stratagene). РНК одержують *in vitro* за допомогою системи, тому що це може бути трансльовано *in vitro* для одержання бажаного

30 глікопротеїнового гормону (Stratagene).

Інший спосіб одержання глікопротеїнового гормону полягає в тому, щоб зв'язати два пептиди або поліпептиди спільно методами хімії білків. Наприклад, пептиди або поліпептиди можуть бути синтезовані хімічно з використанням доступного в цей час лабораторного устаткування, використовуючи хімію Fmoc (9-флуоренілметилоксікарбоніл) або Boc (теребутилоксикарбоніл) (Applied Biosystems). Фахівці в даній галузі можуть легко зрозуміти, що пептид або поліпептид, що відповідає гібриду глікопротеїнового гормону, можуть бути синтезовані за допомогою стандартних хімічних реакцій. Наприклад, пептид або поліпептид можуть бути синтезовані, а не відщеплені від його синтетичної смоли, у той час як інший фрагмент гібридного пептиду може бути синтезований, а потім його відтщеплювали від смоли,

40 тим самим відкриваючи кінцеву групу, що функціонально заблокована на іншому фрагменті. За реакцією пептидної конденсації ці два фрагменти можуть бути ковалентно з'єднані через пептидний зв'язок їх карбоксильними та аміно-кінцями, відповідно, з утворенням гібридного пептиду. (Grant, Synthetic Peptides: A User Guide, W.H. Freeman (1992) and Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag (1993) і Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag (1993)). Альтернативно, пептид або поліпептид можуть бути незалежно один від одного синтезовані *in vivo*, як описано вище. Після виділення ці незалежні пептиди або поліпептиди можуть бути пов'язані з утворенням глікопротеїнового гормону через аналогічні реакції конденсації пептиду. Наприклад, ферментативне або хімічне лігування клонованих або синтетичних сегментів пептиду може дозволити відносно короткі пептидні фрагменти, які будуть

55 приєднані до утворення більших пептидних фрагментів, поліпептидів або цілі білкові домени (Abrahmsen, Biochemistry, 30:4151 (1991); Dawson, Science, 266: 776-779 (1994)).

Модифіковані глікопротеїнові гормони відповідно до даного винаходу можуть бути рекомбінантними білками, отриманими шляхом клонування нуклеїнових кислот, що кодують поліпептид, у системі експресії, здатної створювати їхні фрагменти поліпептиду. Наприклад,

60 можна визначити активний домен модифікованої альфа-субодиниці, що разом з бета-

субодиницею може взаємодіяти з рецептором глікопротеїнового гормону та викликати біологічний ефект, пов'язаний із глікопротеїновим гормоном. В одному прикладі знайдено, що амінокислоти не сприяють активності або специфічності зв'язування, або спорідненість глікопротеїнового гормону може бути вилучена без втрат відповідної активності.

Наприклад, аміно або карбоксильні термінальні амінокислоти можуть бути вилучені з послідовного або нативного або модифікованого глікопротеїнового гормону та випробувані в одному з багатьох доступних аналізів, описаних вище для відповідної активності. В іншому прикладі модифіковані білки відповідно до даного винаходу можуть мати частини термінальних аміно або карбоксильних термінальних амінокислот, або навіть внутрішню область гормону, заміщену на фрагмент поліпептиду або інший фрагмент, такий як біотин, які можуть сприяти очищенню модифікованого глікопротеїнового гормону. Наприклад, модифікований глікопротеїн може бути злитий з білком, що зв'язує мальтозу, або через пептидну хімію клонування відповідних нуклеїнових кислот, що кодують два поліпептидних фрагменти у вектор експресії таким чином, щоб експресія приводила до кодуєчої області у гібридному поліпептиді. Гібридний поліпептид може бути підданий афінному очищенню шляхом пропущення його через афінну амилонну колонку та модифікований глікопротеїн може бути відділений від з'єднувальної мальтози області шляхом розщеплення гібридного поліпептиду специфічним протеазним фактором Ха.

Активні фрагменти молекул модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу також можуть бути синтезовані безпосередньо, або отримані шляхом хімічного або механічного руйнування більшого глікопротеїнового гормону. Активний фрагмент визначається як амінокислотна послідовність щонайменше приблизно 5 послідовних амінокислот, отриманих із природної амінокислотної послідовності, що має відповідну активність, наприклад, зв'язувальну або регуляторну. Фрагменти, чи приєднані вони до інших послідовностей, чи ні, можуть також включати інсерції, делеції, заміщення або інші обрані модифікації конкретних областей або конкретних амінокислотних залишків, за умови, що активність пептиду істотно не змінена або порушена порівняно з модифікованим глікопротеїновим гормоном. Ці модифікації можуть передбачати якусь додаткову властивість, таким чином, щоб видалити/додати амінокислоти, здатні до утворення дисульфідних зв'язків, щоб підвищити його біологічну довговічність тощо. У кожному разі, пептид повинен мати біологічно активні властивості, такі як сполучна активність, регулювання зв'язування в поєднальному домені тощо. Функціональні або активні області глікопротеїнового гормону можуть бути ідентифіковані шляхом мутагенезу конкретної області гормону, з наступною експресією і випробуваннями експресованого поліпептиду. Такі способи очевидні для кваліфікованого фахівця в даній галузі, і можуть включати сайт-специфічний мутагенез нуклеїнової кислоти, що кодує рецептор.

Цей винахід також охоплює злиті білки та химерні білки, що містять мутації, описані в даній заявці, у тому числі, наприклад, злиті із глікопротеїном FSH. Такий злитий білок може бути отриманий шляхом лігування відповідних послідовностей нуклеїнових кислот, що кодують бажані амінокислотні послідовності, один з одним за допомогою методів, відомих у даній галузі, у власній системі кодування, і експресуючи злитий білок кожним із засобів, описаних вище. Альтернативно, такий злитий білок може бути отриманий за допомогою методів синтезу білка, наприклад, з використанням пептидного синтезатора. Аналоги одиничних ланцюгів та химерні білки відповідно до цього винаходу можуть включати пептидний лінкер між альфа- і бета-субодиницями, або між різними ділянками химерного білка.

Характеристика суперагоністів глікопротеїнового гормону

Ефект зміни або модифікації дикого типу глікопротеїнових гормонів, описаних у даній заявці, може бути встановлений будь-якими способами. Наприклад, зміни в системах другого месенджера в клітинах, трансфікованих нуклеїновою кислотою, що кодує модифіковані глікопротеїнові гормони, можуть бути виміряні та порівняні з аналогічними клітинами, трансфікованими нуклеїновою кислотою, що кодує глікопротеїновий гормон дикого типу. Альтернативно, активність модифікованого глікопротеїнового гормону може бути визначена з аналізів зв'язування рецептора, аналізів поглинання тимідину, аналізів виробництва прогестерону, або аналізів Т4 секреції. Фахівцеві в даній області буде легко визначити будь-який підходящий аналіз та використовувати його для визначення активності гормону дикого типу або модифікованого глікопротеїнового гормону.

В одному з варіантів втілення цього винаходу, модифікований глікопротеїновий гормон має ефективність, що збільшилася порівняно з ефективністю глікопротеїнового гормону дикого типу. Ця підвищена активність може бути оцінена за допомогою кожного з методів, зазначених вище, або в будь-якому іншому відповідному аналізі, як легко визначено фахівцем у даній галузі.

Збільшення ефективності не повинне бути послідовними від аналізу до аналізу, або від клітинної лінії до клітинної лінії, тому що воно, звичайно, буде варіюватися.

В іншому варіанті втілення цього винаходу модифікований глікопротеїновий гормон має максимальну ефективність, що збільшується порівняно з максимальною ефективністю глікопротеїнового гормону дикого типу. Це збільшення максимальної ефективності можна оцінити за допомогою кожної з методик, зазначених вище, або в будь-якому іншому відповідному аналізі, як легко визначено фахівцем у даній області. Збільшення максимальної ефективності не повинне бути послідовними від аналізу до аналізу, або від клітинної лінії до клітинної лінії, тому що вони, звичайно, буде варіюватися.

Інші аналізи, що підходять для характеристики аналогів, описаних у даній заявці, описані в PCT/US99/05908, що включена в даній заявці як посилання в повному обсязі. Наприклад, різні імунологічні аналізи можуть бути використані, включаючи, але не обмежуючись ними, конкурентні та неконкурентні тест-системи з використанням таких методів, як радіоімуноаналізи, ELISA, аналізи ізоелектричного фокусування (IEF), імунологічні сендвіч-аналізи, імунорадіометричні аналізи, гель-дифузійні реакції осадження, аналізи імунодифузії, *in situ* імунологічні аналізи, вестерн-блотинг, реакції осадження, аналізи аглютинації, аналізи зв'язування комплементу, імунофлуоресцентні аналізи, аналізи білка А та імуноелектрофоретичні аналізи тощо.

Наприклад, коли бета-субодиниці є такими, що FSH поліпшення якості та кількості ооцитів можуть бути оцінені в аналізах *in vitro* і *in vivo*, суперактивні FSH можуть бути використані для поліпшення якості та кількості ооцитів від тварин, у тому числі, але не обмежуючись ними, людини, миші, пацюка, примата, кролика, свині, коня, вівці та собаки. Переважно, суперактивний FSH уводять людині або будь-якій тварині. Він є розповсюдженням для підвищення кількості ооцитів, поліпшення якостей, які повинні бути визначені, використовуючи різні кінцеві точки процесу запліднення *in vitro*, такому як утворення яйцеклітин, запліднення ооцитів, і утворення бластоцистів. Експерименти запліднення *in vitro* можуть впливати з "протоколу суперовуляції", у якому суб'єктів обробляють суперактивним FSH аналогом відповідно до даного винаходу, що призведе до вивільнення та дозрівання декількох ооцитів. В *in vitro* експериментах запліднення, FSH (суперактивний FSH і рекомбінантний дикого типу FSH) можуть бути введені з HCG, щоб викликати овуляцію. Ті контрольні тварини можуть бути використані, які одержують тільки HCG або сироватку гонадотропину вагітної кобили (PMSG). Якість ооцитів може бути поліпшена за рахунок збільшення швидкості запліднення ооцитів у тварини. Швидкість запліднення суперактивного фолікулостимулюючого гормону може бути визначена *in vivo* або *in vitro* шляхом порівняння швидкості запліднення, досягнутої із суперактивним FSH порівняно зі швидкістю запліднення, досягнутою з такою ж кількістю рекомбінантного дикого типу FSH. Контрольна тварина також може бути використана, яка приймає hCG. Швидкість запліднення може бути виміряна у відсотках для двоклітинних ембріонів, які розвиваються, до загального числа ооцитів. Якщо відбувається запліднення *in vitro*, два клітинні ембріони можна перерахувати в чашках запліднення. У мишей два клітинних ембріони розвиваються через приблизно двадцять чотири години після запліднення. Швидкість запліднення змінюється залежно від кількості уведеного суперактивного FSH. Тварина може приймати безліч джерел суперактивного FSH. Швидкість запліднення збільшується щонайменше приблизно на 10 відсотків, у результаті введення суперактивного FSH при максимально ефективній дозі на кількість ооцитів. Швидкість запліднення може збільшуватися, щонайменше, приблизно на 20 відсотків, переважно щонайменше на 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 100 % у результаті введення суперактивного FSH при максимально ефективній дозі на кількість ооцитів. Суперактивний фолікулостимулюючий гормон може поліпшити якість ооцитів шляхом підвищення швидкості утворення бластоцистів для заплідненої яйцеклітини. Швидкість формування бластоцистів може бути виміряна шляхом визначення процентної частки двоклітинних ембріонів, які утворюють бластоцисти. Швидкість формування бластоцистів збільшується залежно від того, чи перебувають форми бластоцистів *in vivo* або *in vitro*. Швидкість утворення бластоцистів залежить від кількості суперактивного фолікулостимулюючого гормону, який вводять. Швидкість формування бластоцистів збільшується, щонайменше, приблизно на 10 відсотків, у результаті введення суперактивного фолікулостимулюючого гормону в максимально ефективній дозі для кількості ооцитів. Швидкість формування бластоцистів може збільшуватися, щонайменше, приблизно на 20 відсотків, переважно, щонайменше, на 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 100 % у результаті введення суперактивного FSH при максимально ефективній дозі для кількості ооцитів.

Суперактивний фолікулостимулюючий гормон може поліпшити якість ооцитів шляхом збільшення загальної кількості зародків у заплідненій яйцеклітині. Збільшення загальної кількості зародків у запліднених ооцитах збільшується, залежно від того, чи відбувається запліднення *in vivo* або *in vitro*. Збільшення загальної кількості зародків у заплідненій яйцеклітині залежить від кількості суперактивного фолікулостимулюючого гормону, який вводять. Загальна кількість ембріонів у запліднених ооцитах збільшується щонайменше на приблизно 10 відсотків, у результаті введення суперактивного фолікулостимулюючого гормону в максимально ефективній дозі для кількості ооцитів. Загальна кількість ембріонів у заплідненій яйцеклітині може збільшитися на щонайменше приблизно 20 відсотків, переважно щонайменше на 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 100 % у результаті введення суперактивного FSH у максимально ефективній дозі для кількості ооцитів.

Наприклад, коли бета-субодиниця є субодиницею CG, ефективний лютеїнізуючий гормон з (LH)-подібною активністю може бути оцінений у *in vitro* і *in vivo* біологічних аналізах. Суперактивний CG індукуює овуляцію, розширює строк життя жовтого тіла, збільшує синтез прогестерону та сприяє формуванню допоміжних жовтих тіл у деяких видів. Такі дії приводять до більш ефективного збору ооцитів, підвищенню якості ооцитів у деяких видів, поліпшенню зберігання вагітності та підвищенню кількості вагітностей.

Аналоги глікопротеїнового гормону з підвищеним строком напіввиведення сироватки

Білки модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу можуть бути також додатково модифіковані таким чином, що напіврозпад у плазмі збільшується порівняно з аналогами дикого типу. Білки модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу можуть додатково містити потенційний сайт глікозилювання, у тому числі послідовності, що містять сайти N-глікозилювання та/або про-глікозилювання. Наприклад, розміщення пептиду NVTINV (SEQ ID NO: 1) або VNVTINVT (SEQ ID NO: 20) в альфа-субодиниці забезпечує потенційний сайт глікозилювання альфа-субодиниці. Пептиди SEQ ID NO: 20 або SEQ ID NO: 1 можуть бути поміщені в людські дикого типу послідовності між D3 і Q5. Пептиди SEQ ID NO: 20 або SEQ ID NO: 1 можуть бути поміщені в послідовності дикого типу великої рогатої худоби, коней, свиней і овець між F6 і T7. Вставлений пептид може додатково містити додатковий залишок треоніну на аміно-кінці. Пептиди для інсерції, щоб змінити глікозилювання, включають H.B., INV і TNV пептиди, а також TNVTINV (SEQ ID NO: 12). Наприклад, модифікована альфа-субодиниця з глікогормону може включати інсерцію NV між F6 і T7 плюс інсерцію INV між T7 і T8. Збільшення періоду напіврозпаду також може бути надано пегілюванням або кон'югацією інших відповідних хімічних груп або шляхом конструкту злитих білків, що мають підвищений період напіврозпаду або будь-яким іншим способом. Такі способи відомі в даній галузі, наприклад, як описано в патенті США 5,612,034, патенті США 6,225,449 і патенті США 6,555,660, кожний з яких включений шляхом посилання в повному обсязі.

Період напіврозпаду також може бути збільшений за рахунок збільшення кількості негативно заряджених залишків у молекулі, наприклад, кількості глутаматних і/або аспартатних залишків. Така зміна може бути здійснена шляхом сайт-спрямованого мутагенезу. Така зміна може бути також досягнута за допомогою інсерції з амінокислотної послідовності, що містить один або більш негативно заряджених залишків, у білки модифікованого глікопротеїнового гормону.

Період напіврозпаду білка є мірою стабільності білка та вказує на час, необхідний для зменшення половини відновлення концентрації білка. Період напіврозпаду сироватки білка модифікованого глікопротеїнового гормону, описаного в даній заявці, може бути визначений за допомогою будь-якого способу, прийнятого для виміру рівня гормонів у зразках суб'єкта протягом часу, наприклад, але не обмежуючись наведеним, імунологічним використанням антитіл для виміру рівня в зразках сироватки, узятих протягом періоду часу після введення білків модифікованого глікопротеїнового гормону, або шляхом виявлення мічених молекул гормону, тобто мічених молекул, у зразках, узятих в суб'єкта після введення мічених глікопротеїнових гормонів.

Способи лікування

Білки модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу можуть бути використані для лікування будь-якого стану, пов'язаного з активністю глікопротеїнового гормону. Білки модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу можуть бути використані для лікування суб'єкта, що потребує цього. Суб'єкт може бути твариною, таким як ссавець, рептилія, риби, птахи та амфібії. Суб'єкт може бути ссавцем, таким як людина, корова, вівця, свиня або кінь. Тварина включає худобу та свійських тварин, таких як собаки та кішки. Суб'єкт може бути людським пацієнтом або твариною, що має потребу в активності поліпшеного глікопротеїнового гормону. Станами, що пов'язані з активністю глікопротеїнового гормону, є ті, які повністю або частково викликані реагуванням зміненого глікопротеїнового гормону, або ті, за

яких корисним є введення глікопротеїнового гормону. Наприклад, такі стани включають, але не обмежуються ними, дисфункції овуляції, дефекти лютеїнової фази, неояснене безпліддя, чоловіче безпліддя, обмежене у часі зачаття, низьку експресію рецептора FSH, низьку чутливість рецептора FSH, дефекти єднального FSH рецептора, дефекти сполучного FSH

рецептора, виробництво низького рівня тестостерону, чоловіче облісіння, і відмова або травма гіпофіза.

Наприклад, кількість і якість ооцитів можуть бути поліпшені шляхом введення аналога суперактивного FSH, як описано в даній заявці, тварині. Наприклад, Заявники виявили, що шляхом введення суперактивного FSH, що містить модифіковану альфа-субодиноццю, одержують різке збільшення кількості і якості ооцитів. Вплив суперактивного FSH на кількість і якість ооцитів можуть бути додатково підвищені за рахунок збільшення періоду напіврозпаду FSH у сироватці в суперактивному FSH. Період напіврозпаду сироватки FSH може бути збільшений шляхом подальшої зміни суперактивного FSH. Подальші модифікації, у тому числі, але не обмежуючись ними, які описані вище, можуть бути використані, щоб збільшити період напіврозпаду в сироватці FSH.

Білки модифікованого FSH, CG, LH або TSH глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу також можуть бути використані в терапевтичних схемах допоміжної репродукції в будь-якому суб'єкті чоловічої або жіночої статі, і включають введення допоміжної кількості білків модифікованого глікопротеїнового гормону суб'єктові. У таких способах, аналоги можуть бути уведені окремо або в сполученні з іншими терапевтичними засобами, наприклад, включаючи, але не обмежуючись ними, кломіфен цитрат і GnRH (гонотропін-вивільнюючий гормон). Білки модифікованого глікопротеїнового гормону відповідно до даного винаходу можуть бути введені у вигляді комбінації одного або більше глікопротеїнів. Наприклад, модифіковані альфа-субодиноци можуть бути об'єднані з бета-субодиноцями FSH, бета-субодиноцею CG, бета-субодиноцею TSH, і/або бета-субодиноцею LH, разом або окремо, і модифіковані глікопротеїни потім уводять суб'єктові. Наприклад, у суб'єкта з ізольованим дефіцитом гонадотропіну (IGD), модифіковані FSH, CG, TSH, LH і можуть бути введені суб'єктові, щоб відновити нормальну функцію статевих залоз. Широко відомо в даній галузі, що глікопротеїнові гормони, такі як FSH, CG, TSH, LH, є невід'ємними в жіночій репродуктивній фізіології, і ці глікопротеїнові гормони можна вводити суб'єктові, щоб перебороти ряд репродуктивних розладів, і тим самим допомогти відтворенню.

Однократні та багаторазові режими дозування ін'єкцій перевіряли для модифікованого глікопротеїну CG коней. Для суперстимуляції за допомогою eCG аналога в коней, корів, або свиней, використовували одиночні або 2:1 спліт ін'єкції eCG аналога. Доза в діапазоні дослідження для eCG аналога включала однократну ім. ін'єкцію 30, 45, 60, 75, 90, 105 і 120 мкг. Оптимізація дози протестована в співвідношенні 2:1 і додаткова друга спліт-доза співпадатиме з лікуванням PGF2альфа на 6-та день або іншу дату. Лікування модифікованим eCG спричиняє суперовуляцію коней, корів і свиней.

Кваліфікованому фахівцеві в даній галузі легко визначити ефективну кількість глікопротеїнового гормону для введення, і вона буде залежати від таких факторів, як маса, розмір, вага конкретного стану, і від типу самого суб'єкта. Терапевтично ефективна кількість може бути легко визначена за допомогою звичайних процедур оптимізації. Цей винахід стосується глікопротеїнових гормонів з підвищеною ефективністю стосовно дикого типу глікопротеїнового гормону. Ці модифіковані глікопротеїнові гормони дозволяють практикуючим фахівцям вводити більше низьку дозу модифікованого глікопротеїнового гормону порівняно з диким типом глікопротеїнового гормону для досягнення подібного терапевтичного ефекту, або альтернативно, вводити дозу модифікованого глікопротеїнового гормону, аналогічну дозі дикого типу глікопротеїнового гормону, щоб досягти підвищеного терапевтичного ефекту.

Залежно від того, чи вводять глікопротеїновий гормон перорально, парентерально, або іншим способом, введення простагландину може бути у вигляді твердих, напівтвердих або рідких лікарських форм, таких як, наприклад, таблетки, пігулки, капсули, порошки, рідини, креми, і суспензії тощо, переважно в одиничній дозованій формі, придатний для доставки точної дози. Глікопротеїновий гормон може містити ефективну кількість обраного глікопротеїнового гормону в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм, і, крім того, містити інші медичні агенти, фармацевтичні агенти, носії, ад'юванти, розріджувачі тощо. Під "фармацевтично прийнятним" мають на увазі матеріал, що не є біологічно або у інший спосіб небажаним, тобто матеріал можна вводити індивідуумові разом з обраним глікопротеїновим гормоном, не викликаючи неприйнятних біологічних ефектів або неприйнятної взаємодії з глікопротеїновим гормоном. Сучасні способи одержання таких лікарських форм відомі або будуть очевидні для

фахівця в даній галузі; наприклад, див Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition (Mack Publishing).

Наведені нижче приклади призначені для опису та ілюстрації даного винаходу. Вони не повинні бути витлумачені як такі, що обмежують обсяг даного винаходу. Фахівці в даній галузі оціняють, що багато інших варіантів втілення винаходу також входять в обсяг даного винаходу, як це описано в даній заявці вище та у формулі даного винаходу.

ПРИКЛАДИ

Конструкція аналогів альфа-субоднини

FSH людського суперагоніста глікопротеїну зі змінами в альфа-субоднині в Q13R + E14R + P16R + Q20R (людський 4R) з диким типом бета-субоднини продемонстрували значну перевагу зв'язування над їхніми аналогами дикого типу.

У Таблиці 1 наведене порівняння людської альфа дикого типу (WT) і обраних hFSH суперагоністів первинної амінокислотної структури. Показані N-кінцеві ділянки людської альфа дикого типу (амінокислотні залишки 1-28 з 92 загальних залишків) і мутантні форми. Розташування 4 заміщень суперагоністів аргініну (R) перебувають у затіненій області. Обрані 4 різні інсерції введення однієї або двох додаткових N-зв'язаних вуглеводних ланцюгів, позначені між амінокислотою D3 і Q5 послідовністю дикого типу.

Таблиця 1

WT	APD	V	QDCPECTLQENPFFFSQPGAPILQC
TR4401 (4R)	APD	V	QDCPECTLRRNRFFFSQPGAPILQC
TR44701 (4R+Ins1)	APDV	NVTINVT	QDCPECTLRRNRFFFSQPGAPILQC
TR44601 (4R+Ins2)	APD	NVTINVT	QDCPECTLRRNRFFFSQPGAPILQC
TR44201 (4R+Ins3)	APD	NVT	QDCPECTLRRNRFFFSQPGAPILQC
TR44301 (4R+Ins4)	APDV	NVT	QDCPECTLRRNRFFFSQPGAPILQC

Сегменти в Таблиці 1 перераховані в наступному вигляді: SEQ ID NO: 43, hFSH WT; SEQ ID NO: 33, hFSH альфа (4R); SEQ ID NO: 34, hFSH альфа (4R + Ins1); SEQ ID NO: 35, hFSH альфа (4R + INS2); SEQ ID NO: 36, hFSH альфа (4R + в S3); SEQ ID NO: 37, hFSH альфа (4R + Ins4).

Заміщення FSH (bFSH) великої рогатої худоби в деяких варіантах втілення винаходу достатньо аналогічні залишкам раніше мутагенізованим у людському FSH альфа-субоднині і включають сполучення 5 мутацій, названих "5R" (K15R + K17R + E18R + K20R + K24R). Наприклад, SEQ ID NO: 7. Щоб збільшити ймовірність того, що введені послідовності пізнання глікозилування (NXT або NXS) приводять до приєднання N-зв'язаного вуглеводного ланцюга, 18 різних бичачих конструктів альфа-субоднини були створені та клоновані в раніше розроблені вектори експресії. 12 конструктів містили N-кінцеве подовження пептидних послідовностей ANITV, ANTTA, ANTSA, ANITVNITV, ANTSANTTA і ANTSANTSA.

У Таблиці 2 наведене порівняння бичачої альфа дикого типу (WT) і структур первинної амінокислоти, обраних bFSH суперагоністів. Показані N-кінцеві ділянки бичачої альфа дикого типу (амінокислотні залишки 1-32 з 96 загальних залишків) і бичачої мутантної альфа. Розташування заміщення 5 суперагоністів аргініну (R) або лізину (K) відзначені в затіненій області між амінокислотами C14 і P25, кодовані як 5R з 4R + 1K. Обрані 4 різні інсерції введення одного або двох додаткових ланцюгів N-зв'язаних вуглеводних відзначені між F6 амінокислотою та T8 послідовністю дикого типу.

Сегменти в Таблиці 2 наведені в такий спосіб: SEQ ID NO: 44, WT bFSH; SEQ ID NO: 23, bFSH альфа (5R); SEQ ID NO: 24, bFSH альфа (4R+1K); SEQ ID NO: 25, bFSH альфа (5R+Ins1); SEQ ID NO: 26, bFSH альфа (5R+Ins2); SEQ ID NO: 27, bFSH альфа (5R+Ins3); SEQ ID NO: 28, bFSH альфа (5R+Ins4); SEQ ID NO: 29, bFSH альфа (4R+1K+Ins1); SEQ ID NO: 30, bFSH альфа (4R+1K+Ins2); SEQ ID NO: 31, bFSH альфа (4R+1K+Ins3); SEQ ID NO: 32, bFSH альфа (4R+1K+Ins4).

Таблиця 2

WT	FPDGEF	TMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ
5R	FPDGEF	TMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ
4R+1K	FPDGEF	TMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ
5R+Ins1	FPDGEF	NVTINVTMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ
5R+Ins2	FPDGEFTNVTINVTMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ	
5R+Ins3	FPDGEF	NVTMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ
5R+Ins4	FPDGEFTNV	TMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ
4R+1K+Ins1	FPDGEF	NVTINVTMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ
4R+1K+Ins2	FPDGEFTNVTINVTMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ	
4R+1K+Ins3	FPDGEF	NVTMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ
4R+1K+Ins4	FPDGEFTNV	TMQGCPECKLRKNRYFSR	PDAPITYQQ

5

Глікопротеїнові альфа-субодиниці коней, у тому числі мутації, були також підготовлені та деякі варіанти включають заміщення K15R, E18R, K20R, і K24R. Наприклад SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 38-40. Крім того, глікопротеїнові альфа-субодиниці коней, що мають K15R, K20R, E18H і K24R, також були отримані (наприклад, SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42). Ці мутантні альфа-субодиниці також містять інсерцію NVTINT між F6 і T7 субодиницями (наприклад, SEQ ID NO: 9, 40, і 42) або NV інсерцію між F6 і T7 плюс INV між T7 і T8 (наприклад, SEQ ID NO: 38, 39 і 41).

10

Перехідна трансфекція bFSH аналогів з використанням поліетиленіміну (PEI) призводить у результаті до 3, 7-4,5 кратного збільшення експресії аналога bFSH порівняно з методами на основі ліпофектаміну (дані не показані). Рівні експресії різних аналогів FSH на основі гетеродимерно-специфічної ELISA не показали більшу втрату формування FSH димера та це не підтримує попередні заяви, що одноланцюговий конструктор необхідний, щоб досягти високого рівня експресії.

15

Вибір тимчасово експресованих bFSH аналогів включав cAMP біотестування in vitro і PK скринінг (див. Фіг. 1 і 2). Отримано значне 3-4 кратне збільшення активності bFSH з 5R заміщеннями порівняно зі свинячим FSH (pFSH-Folltropin®-V) і контролями bFSH (Фіг. 1A). Зазначено, що на відміну від багатьох попередніх досліджень (Фіг. 1B), (Heikopp, Eur J. Biochem 261: 81-84, 1999; Trousdale, Fertil Steril 91: 265-270, 2009) нові інсерції неоглікозилювання були виявлені як такі, що не зменшують біологічну активність in vitro FSH 5R аналогів великої рогатої худоби (Фіг. 1C). Ідентичні сайти неоглікозилювання, додані в N-кінець, знижували in vitro біологічну активність bFSH, що аналогічно послабляє вплив неоглікозилювання на внутрішню активність еритропоетину ((Elliott, Exp. Hematol. 32: 1146-1155, 2004; Elliott, Nat. Biotechnol. 21: 4144-421, 2003; Sinclair, J. Pharm. Sci. 94: 1626-1635, 2005) і ефект багатьох інших продовжень альфа- напіврозпаду, що включають сайт-спрямоване пегування (Fishburn, J. Pharm. Sci. 97: 4167-4183, 2008; Uchiyama, Vet. J. 184: 208-211, 2010). Дводенні PK скринінг дослідження на мишах показали, що всі не прогліколізовані FSH "5R" аналоги великої рогатої худоби збільшили період напіврозпаду порівняно з bFSH-WT і Folltropin®-V (Фіг. 2A и 2Y). Дані PK скринінг-тесту показали значно більше тривалий період напіввиведення із плазми через глікозилювання в одному або двох уведених сайтах неоглікозилювання (інсерція 1 і 2) порівняно з bFSH-WT, Folltropin®-V і контролем TR4401. Спостережувані рівні були порівнянні з bFSH одноланцюгової молекули з лінкером 29 амінокислот і 4-5 пов'язано-зв'язаними вуглеводними ланцюгами. Два спочатку випробуваних аналоги, виконані у вигляді комбінованих інсерцій суперагоніста та неоглікозилювання, названі "Інсерція 1 і 2" мали біологічну активність in vitro, порівнянну з 5R суперагоністом контролю самим по собі (Фіг. 1C) і усе ще тривалим був період напіврозпаду в мишей (Фіг. 2B). Такі довгостроково діючі аналоги без зниження активності суперагоніста є безпрецедентними та приводять до очікуваної вражаючої продуктивності in vivo у корів.

30

35

40

Кілька сотень міліграм різних FSH і TSH були отримані рекомбінантно (rFSH або RTSH) зі CHO клітини за допомогою колби, шейкера, роллер-флакона та біореакторів. Під час первісної роботи дицистронні ретровірусні векторні системи були оптимізовані для високої експресії рівня FSH і TSH аналогів у CHO-DG44 клітинах. Препарати людського rFSH були протестовані. Одна 60 мкг доза rFSH індукувала розвиток фолікула, у результаті чого велика кількість ембріонів доброї якості відповідало раніше оптимізованим восьми ін'єкціям Folltropin®-V (300 мкг), які вводили двічі на день протягом 4 днів, надалі підтримуючи свої унікальні властивості, такі як уповільнена абсорбція після внутрішньом'язової ін'єкції, а також збільшений час

50

перебування FSH рецептора. Див. Фігури 3 і 5-8. rFSH суперагоніст при 10 мкг дозі показав виняткову здатність набору та підтримки протягом 12 днів підвищеного пулу зростаючих фолікулів, зокрема фолікулів в 3-5 мм діапазоні розмірів, які також відомі в організмі людини як такі, що мають невелику кількість рецепторів FSH (дані не показані). Це несподіване розширення та підтримка дрібних фолікулів з боку rFSH не спостерігається з раніше оптимізованою дозою контролю Folltropin®-V, і забезпечує новий спосіб набору FSH реагуючих фолікулів на випадкових етапах циклу та підвищує потенціал для успішного ЕКО та суперовуляції для ряду збіднених респондентів, викликаних зниженням FSH числа рецепторів або функції (Perez Mayorga, J. Clin. Endocrinology 152: 3268-3369, 2000; Levallet, Arch. Med. Red. 30: 486-494, 1999; Rannikko, Moї. Hum. Reprod. 8: 311-317, 2002; Cai, Feril. Steril. 87: 1350-1356, 2007). Проте, через різницю в 4 амінокислот між бичачим FSH і людським FSH, на основі альфа-субодиниць із 4 аргінін-заміщеннями, спостерігалися деякі перехідні ефекти від попередніх процедур з rFSH у тих же корів, що узгоджується з даними попередніх досліджень, що показують імуногенні властивості людського FSH у кроликів і макак резус (Cai, Int. J. Toxicol. 30: 153-161, 2011; De Castro, Theriogenology 72: 655-662, 2009).

Введення аргінінових (R) або лізинових (K) залишків в обрані модифікації дозволеної області загальної альфа-субодиниці, як раніше було показано, модулює активність глікопротеїнових гормонів у процесі еволюції (Szkudlinski, Nat. Biotechnol. 14: 1257-1263, 1996; Szkudlinski, Physiol. Rev. 82: 473-502, 2002) і відіграє важливу роль в електростатичній взаємодії з негативно зарядженим кластером, що перебуває в шарнірній області рецепторів глікопротеїнового гормону (Mueller, Trends Endocrinol. Metab. 21: 111-122, 2010; Mueller, J. Biol. Chem. 284: 16317-16324, 2009; Mueller, Endocrinol. 152: 3268-3278, 2011). Розвиток специфічного bFSH суперагоніста включає мінімальні заміщення 4-5 R і/або K, щоб одержати більше сильну та ефективну молекулу з можливою затримкою абсорбції для збільшення тривалості дії, як показано в даних цієї заявки та інших досліджень для hFSH і інших аналогів глікопротеїнового гормону (Szkudlinski, Physiol. Rev. 82: 473-502, 2002). Інсерції амінокислот мінімальної довжини, що містять один або два вуглеводні сайти неоглікозування, щоб збільшити період напіврозпаду для одержання одного аналога ін'єкції без зниження підвищеної потенції/ефективності суперагоніста, також була досліджена (див Фіг. 4). Для подальшого аналізу, 8 конструктів, що містять пептидні інсерції NVTINV, NVTINVT, NV і NVT, розташовані між амінокислотою 6 і 8 послідовності дикого типу, можуть бути використані. Як показано в даних у цій заявці та на відміну від попередніх досліджень неоглікозування та пегілювання (Trousedale, Feril. Steril. 91: 265-270, 2009; Uchiyama, Vet J. 184: 208-211, 2010; Perlman, J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 3227-3235, 2003), можна спроектувати інсерцію амінокислоти мінімальної довжини, що містить складні вуглеводи, щоб збільшити період напіврозпаду без зниження підвищеної потенції/ефективності суперагоніста. Ці нові аналоги можуть бути експресовані за допомогою тимчасової трансфекції в клітини CHO-K1 з використанням оптимізованого способу системної високої експресії за допомогою PEI і роллер-флаконів.

Очищення обраних 4-6 аналогів, експресованих тимчасовою трансфекцією, може бути виконано з використанням стадії захоплення за допомогою SP Sepharose стовпчика, а потім вибору аналогів за допомогою Mono Q іонообмінної хроматографії перед остаточним поліруванням з використанням гель-фільтрації. Чистота аналогів bFSH може бути більше ніж 98 %. Накопичувальне відновлення може досягати 50% при повному 50-кратному очищенні. Всі аналоги можуть бути охарактеризовані in vitro шляхом ELISA імуноаналізу, грубо в in vitro cAMP біоаналізі з використанням клітинної лінії CHO-FSHR, SDS-PAGE електрофорезу та аналізу гелю ізоелектричним фокусуванням (IEF). Обрані очищені аналоги також можуть бути проаналізовані за допомогою точної кількісної ВЕРХ з оберненою фазою, вуглеводного композиційного аналізу та оцінки стійкості та агрегації цих станів.

Подальші експерименти призводили до одержання бичачого FSH аналога TR55601 (альфа-субодиниці: SEQ ID NO: 7), що містить у собі заміщення аргініну (R) в 15K, 17K, 18K, 20K, 24K і альфа-субодиниці, а також NVTINV (SEQ ID NO:1) інсерції між 6F і 7T альфа-субодиницями. Кілька партій TR55601 були отримані та випробувані з використанням IEF і вестерн-блоттинг аналізу. На Фіг. 3A -D показано ілюстративні результати аналізу. На Фіг. 3A-3D показано, зокрема, що TR55601/Партія 4 і Партія 5 демонструють оптимальний розподіл і перевіряють ефективність мутацій у цій партії. Партії 4 і 5 і партії, що мають подібні результати скринінгу, були використані при лікуванні тварин. Наприклад, вестерн-блоттинг аналіз показує оптимізовані кислотні ізоформи TR56001 Партії 4 і Партії 5 на Фіг. 3 A-C. З іншого боку, як показано на Фіг. 3A и 3B, Партія 3 була не повністю перевірена та не була використана при лікуванні тварин. Аналоги bFSH і, зокрема, зразки TR55601 вивчали також за допомогою РК скринінгу в мишей. Мишам робили підшкірні ін'єкції обраними зразками bFSH і зразки крові були

відібрані через 24, 32 і 48 годин після ін'єкції. Плазма була виділена та проаналізована за допомогою bFSH ELISA (Endocrine Technologies, Inc.). Тривалий період напіврозпаду Партії 4 зразків TR55601 був підтверджений за допомогою РК скринінгу. Дані не показані.

Повний фармакокінетичний профіль обраних аналогів-кандидатів може бути виконаний за допомогою підшкірного введення разової дози 10 нг на пацюка та 10 різних зборів крові (1, 5, 15, 30 хв. і 1, 2, 6, 24 і 48 годин), що охоплюють фазу розподілу та виведення. Рівень FSH у бичачій плазмі може бути кількісно визначений у плазмі за допомогою bFSH-ELISA. Повний аналіз РК може бути виконаний.

Аналоги були обрані для побудови біцистронних векторів експресії, і вибору та посилення експресії аналога в CHO-DG44 клітинах при підготовці для великомасштабного виробництва, очищення та досліджень суперовуляції великої рогатої худоби. CHO -DHFR(-) DG44 клітини спільно трансфікували векторами експресії та піддавали ампліфікації гена в культуральному середовищі, що містить збільшення постадійних інкрементів метотрексату (MTX). Клітини були кваліфіковані для наступної стадії ампліфікації після відновлення їхньої багатокутної морфології (2-3 тижні). Клоні, які представляли рівень секреції > 2 пг/клітина/день, можуть бути піддані другій обробці, спрямованій на ампліфікацію гена-маркера GS (MSX). Додаткове 5-кратне збільшення можна одержати, досягши рівня секреції до 10 пг/клітина/день.

Одержання та експерименти з аналогами альфа-субодиниці

Хоча rFSH викликали суперовуляторну відповідь після однократної внутрішньом'язової ін'єкції та 60 мкг, дуже близько до оптимальної дози, було значне зниження суперовуляторної відповіді, коли корови були піддані rFSH три рази або більше. Таким чином, були розроблені експерименти, щоб протестувати нову rFSH композицію під назвою TR 55601 rFSH, що містить альфа-субодиниці (SEQ ID NO: 7), що має "5R" заміщення та інсерцію NVTINT між F6 і T7. Мета полягала в першу чергу в тому, щоб визначити ефект однократної або дробової дози лікування rFSH, щоб викликати суперовуляторну реакцію в м'ясних корів, а потім додатково оцінити суперовуляторну реакцію однократної ін'єкції rFSH і визначити, чи залишається суперовуляторна реакція високою, коли корів піддають rFSH двічі або тричі.

Зразки TR55601 FSH були проаналізовані in vivo у пацюків за допомогою класичного Steelman-Pohley FSH біоаналізу (Steelman et al., Endocrinol. 53: 604-616, 1953). Самкам пацюків Спрега-Доулі (200-220 грам) вводили одну дозу випробуваного виробу (наприклад, bFSH) або основи, з додаванням 40 ME hCG. Масу яєчників визначали через 72 години після прийому препарату. Див Фіг. 4. Кожну групу обробляли hCG, щоб забезпечити фоновий рівень. TR55601 bFSH, при всіх концентраціях, значно збільшує масу яєчників.

На Фіг. 5 наведений протокол синхронізації фолікулярної хвилі для суперовуляції, індукції овуляції та фіксованого часу штучного запліднення, де 8 ін'єкцій Folltropin-VR (Bioniche) заміняли на одинарне або подвійне впорскування TR55601. Лікування передбачало введення прогестерону (P4) що вивільняється інтравагінальним пристроєм, та введення естрадіол бензоату (BE) у день 0. Суперовуляційне лікування було розпочато на 4 день із TR55601 як однократне або подвійне впорскування. Друга ін'єкція спліт-дози збігалася з PGF2a лікуванням на 6-та день. Прогестероновий пристрій був вилучений з останньої FSH ін'єкцією на день 7. На 8 день донори одержували свинячий LH та їх запліднювали без виявлення еструсу через 12 і 24 годин, або один раз на день 8 (через 16 годин після rLH). OVA/ембріони були зібрані без хірургічного втручання на 15-та день (2, 3). Folltropin-V® використовували як контроль; усього 300 мг* було дано в 8 внутрішньом'язових ін'єкціях двічі в день протягом 4 днів (мг * - на основі NIH-FSH-P1 еталону з високим вмістом домішок).

Зокрема, 30 корів, що не годують, породи червоний ангус були стратифіковані та блокувалися залежно від їхньої передісторії виробництва ембріонів і випадковим чином розподілені в одну із трьох лікувальних груп. Корови в контрольній групі (n=10) одержували 300 мг Folltropin-V, внутрішньом'язово в протоколі спадної дози два рази на день протягом 4-денних періодів. Зокрема: день 4, 3,0 мл (ранок і вечір); день 5, 2,5 мл (ранок і вечір); день 6, 1,5 мл (ранок і вечір) і день 7, 0,5 мл (ранок і вечір). Корови в rFSH 60 мкг, група лікування, одержували однократну ін'єкцію внутрішньом'язово 60 нг rFSH і корови в rFSH 40-20 мкг, група лікування, одержували ін'єкцію внутрішньом'язово 40 нг, rFSH на 4-та день з наступною ще однією внутрішньом'язовою ін'єкцією 20 мкг, rFSH на 6-тий день.

Потім, 25 з 30 корів знову суперстимулювали Folltropin-V (контроль) або однократним введенням 60 нг rFSH. Тварини в контрольній групі (n=10) залишалися в контрольній групі, і 8 з 10 корів в rFSH 60 нг в експерименті 1, були оброблені ще раз за допомогою однієї внутрішньом'язової ін'єкції rFSH. Крім того, 7 з 10 корів, що раніше одержували спліт-однократні ін'єкції rFSH, лікували однократною внутрішньом'язовою ін'єкцією rFSH. Інтервал між відборами ембріонів склав 29 днів.

24 з 25 корів, використовуваних у другому експерименті, були знову суперстимульовані Folltropin-V (контроль) або однократним введенням 60 мкг rFSH. Знову ж, корови контролю залишалися в контрольній групі, і rFSH корови залишалися в rFSH групі. Інтервал між відборами ембріонів становив 30 днів.

На День 0 (початок експерименту), всі тварини одержували 5 мг естрадіолу-17 β + 50 мг прогестерону та інтравагінальний пристрій, просочений прогестероном (Cue-Mate, Bioniche Animal Health). На день 4 (очікуваний день виникнення фолікулярної хвилі), усі корови були суперстимульовані по групах у спосіб, описаний вище. 60 мкг дози для однієї внутрішньом'язової ін'єкції rFSH становили 7,5 мол і Folltropin-V вводили в 8 м ін'єкціях у протоколі спадної дози. Всі тварини одержували 500 нг клопростенолу внутрішньом'язово (Cyclase, Syntex, Argentina) у день 6 ранком і ввечері. Cue-mates були вилучені ввечері на 6-тий день. Ранком 8-го дня корови одержали 100 нг гонадогерілу (Gonasyn, Синтекс Аргентина) і запліднили через 12 і 24 години по тому. Усі корови були запліднені замороженою спермою того самого бика. Ova /ембріони були зібрані без хірургічного втручання на 15-та день і оцінені відповідно до IETS рекомендацій.

Усе корови були досліджені за допомогою ультразвуку в дні 0, 4, 6 і 8 на присутність CL і розмір і кількість фолікулів, щоб визначити профілі росту фолікулів. Овуляторна реакція була підтверджена шляхом підрахунку кількості CL і фолікулів > 10 мм у діаметрі за допомогою УЗД та пальпації прямої кишки на 15-та день.

У кожному експерименті точки даних були оцінені спочатку на нормальність і однорідність відхилень. Оскільки відхилення відрізнялися між групами, дані були перетворені через квадратний корінь і проаналізовані односпрямованим аналізом ANOVA. Аналіз загальної реакції після трьох експериментів буде закінчений двосторонньою ANOVA для визначення впливу експериментальної кількості та лікування і їхніх взаємодій. Середні значення були порівняні за допомогою тесту захищеного LSD. Дані фолікулів були проаналізовані за допомогою змішаної процедури для виявлення ефекту лікування, удень, і їхньої взаємодії на кількості фолікулів і профілі росту. Всі аналізи були виконані за допомогою програмного забезпечення Infostat Analytical Software (Universidad Nacional de Cordoba, Argentina).

Дані суперовуляційного реагування і яйцеклітин/ембріонів наведені в Таблиці 3. Хоча середнє число CL і корів з <2 CL у день збору яйцеклітин/ембріонів не відрізнялося між групами, спліт-ін'єкція rFSH призводила в результаті до більшої ($P < 0,05$) кількості незапліднених фолікулів. Середня загальна кількість яйцеклітин/ембріонів, запліднених яйцеклітин і перенесених ембріонів (класи 1, 2 і 3) також не відрізнялося.

У Таблиці наведені дані суперовуляції з одинарними або спліт-одинарними дозами TR55601 (rFSH).

Таблиця 3

Середня (\pm SEM) кількість жовтих тіл (CL), фолікулів > 10 мм у діаметрі, кількість корів з <2 CL під час збору яйцеклітин/ембріонів, кількість яйцеклітин/ембріонів, запліднених яйцеклітин і класів 1, 2, і 3 ембріонів (переносимих ембріонів) у м'ясних корів, що одержували однократні (60 мкг) або спліт-однократні (40-20 мкг внутрішньом'язові ін'єкції rFSH (TR55601) або 300 мг Folltropin-V® (контролю) двічі на день внутрішньом'язові ін'єкції протягом 4 днів

Лікування	N	CL	Фолікул > 10 мм	Корови з <2 CL на 15 день	Кількість яйцеклітин/ембріонів	Запліднені яйцеклітини	Ембріони класу 1	Ембріони класу 1 та 2	Ембріони класу 1, 2 та 3	Кіл. "0" емб
Контроль	10	14,1 \pm 2,1	3,2 \pm 1,1a	0	12,7 \pm 2,4	10,5 \pm 1,6	7,5 \pm 1,4	8,1 \pm 1,4	9,0 \pm 1,5	0
rFSH 60 мкг	10	12,7 \pm 2,8	4,6 \pm 1,1ab	2	11,6 \pm 3,0	9,1 \pm 2,2	5,4 \pm 1,2	6,6 \pm 1,5	6,6 \pm 1,5	2
rFSH 40-20 мкг	10	13,9 \pm 1,5	8,5 \pm 1,8b	0	11,2 \pm 1,9	9,9 \pm 1,8	6,2 \pm 1,4	7,4 \pm 1,7	7,9 \pm 1,7	0
Р-значення		0,8407	0,0262	0,1173	0,7317	0,6008	0,4339	0,6035	0,4462	0,1173

- 5 Суперовуляторна відповідь і дані яйцеклітин/ембріонів для другої дози наведені в Таблицях 4 і 5. Середня кількість CL, фолікулів > 10 мм і корів з <2 CL у день збору яйцеклітин/ембріонів не відрізнялася між групами. Середня загальна кількість яйцеклітин/ембріонів, запліднених яйцеклітин і переносимих ембріонів (класи 1, 2 і 3) також не відрізнялися між групами. У Таблицях 4 і 5 наведені дані суперовуляції з однією дозою TR55601 (rFSH).

Таблиця 4

Середня (\pm SEM) кількість CL, фолікули > 10 мм у діаметрі та кількість корів з <2 CL на момент збору яйцеклітин/ембріонів. Корови були оброблені за допомогою однієї (60 мкг) внутрішньом'язові ін'єкції rFSH або 300 мг Folltropin-V (контроль), виконаних двічі на день щоденних внутрішньом'язових ін'єкцій протягом 4 днів

Лікування	N	CL	Фолікул > 10 мм	Корови з <2 CL на 15 день
Контроль	10	12,7 \pm 2,4	3,7 \pm 0,9	0
rFSH 60 мкг	15	14,7 \pm 1,9	5,3 \pm 1,3	1
Р-значення		0,5730	0,3752	0,4047

10

Таблиця 5

Середня (\pm SEM) кількість яйцеклітин/ембріонів, запліднених яйцеклітин і класів 1, 2 і 3 ембріонів (переносимі ембріони) у м'ясних корів, що одержували однократні (60 (нг) внутрішньом'язові ін'єкції rFSH (TR55601) або 300 мг Folltropin-V® (контроль) виконані двічі на день щоденні внутрішньом'язові ін'єкції протягом 4 днів

Лікування	N	Кількість яйцеклітин/ембріонів	Запліднені яйцеклітини	Ембріони класу 1	Ембріони класу 1 та 2	Ембріони класу 1, 2 та 3	Кіл. "0" емб
Контроль	10	11,9 \pm 2,5	10,5 \pm 2,2	3,2 \pm 0,8	4,7 \pm 1,1	4,9 \pm 1,2	2
rFSH 60 мкг	14	13,4 \pm 3,3	11,6 \pm 3,0	3,5 \pm 1,0	5,1 \pm 1,5	6,1 \pm 1,8	4
Р-значення		0,8263	0,7958	0,8903	0,8608	0,9992	0,6326

Для остаточного експерименту з дозування тільки дані фолікулів доступні в цей момент. Не було жодного істотного розходження в профілях між ростом фолікулів і кількістю фолікулів у день перед заплідненням між rFSH і Folltropin-V групами. Дані овуляції і яйцеклітин/ембріонів будуть доступні найближчим часом і будуть представлені окремо для експерименту 3, а потім у поєднанні з експериментом 1 і 2. Дані щодо фолікулів в експерименті 3 доступні та були об'єднані з даними експериментів 1 і 2, і представлені в Таблиці 6.

У Таблиці 6 наведені дані по трьох суперовуляціях з TR55601 (rFSH) з 30-денними інтервалами.

Таблиця 6

Середня (\pm SEM) кількість CL, фолікулів > 10 мм у діаметрі, кількість корів з <2 CL під час збору яйцеклітин/ембріонів, кількість яйцеклітин/ембріонів, запліднених яйцеклітин і сортів 1, 2 і 3 ембріонів (переносимі ембріони) у м'ясних корів, що одержували однократні (60 мкг) або спліт-однократні (40-20 нм) внутрішньом'язові ін'єкції rFSH (TR55601) або 300 мг Folltropin-V® (контроль) внутрішньом'язові ін'єкції двічі на день протягом 4 днів. Корови були оброблені три рази підряд з ~ 30 -денними інтервалами (3 експерименти об'єднані)

Основні дії										
Експерименти	N	CL	Фолікул > 10 мм	Корови з <2 CL на 15 день	Кількість яйце- клітин/ ембріо- нів	Заплідне- ні яйцеклі- тини	Ембрі- они класу 1	Ембрі- они класу 1 та 2	Ембрі- они класу 1, 2 та 3	Кіл. "0" емб
Експе- римент 1	24	14,1 \pm 1,4	5,0 \pm 1,0	1	13,0 \pm 1,6	11,0 \pm 1,1	7,3 \pm 0,8 ^a	8,4 \pm 0,9 ^a	8,9 \pm 1,0 ^a	1
Експе- римент 2	24	13,7 \pm 1,5	4,7 \pm 0,9	1	10,7 \pm 1,8	8,9 \pm 1,4	4,5 \pm 1,0 ^b	5,6 \pm 1,1 ^{ab}	6,6 \pm 1,2 ^{ab}	2
Експе- римент 2	24	15,5 \pm 1,9	5,3 \pm 1,0	3	12,8 \pm 2,2	11,1 \pm 1,9	3,4 \pm 0,7 ^a	5,0 \pm 1,0 ^b	5,6 \pm 1,2 ^b	6
Р-значен- ня		0,9420	0,9195	0,4233	0,5881	0,5169	0,0031	0,0219	0,0480	0,0695
Лікування										
Контроль	30	13,9 \pm 1,2	3,7 \pm 0,6 ^a	0	11,3 \pm 1,5	8,7 \pm 1,2	4,9 \pm 0,8	6,0 \pm 0,8	6,7 \pm 1,0	2
rFSH 60 мкг	42	14,8 \pm 1,3	5,9 \pm 0,8 ^a	5	12,8 \pm 1,5	10,8 \pm 1,3	5,2 \pm 0,7	6,6 \pm 0,8	7,3 \pm 0,9	7
Р-значення		0,9684	0,0224	0,0501	0,7893	0,9184	0,9361	0,9571	0,9840	0,2059
Взаємодії експеримент лікування		0,8644	0,7250		0,7720	0,8597	0,9385	0,9790	0,9769	

Характеристики фолікулів від початку лікування безпосередньо до штучного запліднення показані в Таблиці 7 і на Фіг. х 6-9.

У Таблиці 7 наведені номери фолікулів у моделі суперовуляції в корів, що не годують. Розвиток фолікулів (у середньому \pm SEM) був виявлений за допомогою УЗІ м'ясних корів, що одержували 60 мкг rFSH однократною внутрішньом'язовою ін'єкцією або 300 мг Folltropin®-V внутрішньом'язовою ін'єкцією двічі в день протягом 4 днів.

Таблиця 7

Лікування	N	День 0 Фолікули 3-5 мм	День 4 Фолікули 3-5 мм	День 8 Фолікули ≥ 9 мм
rFSH	18	13,2 \pm 1,1	18,9 \pm 1,7	14,7 \pm 2,7
Folltropin-V	18	12,4 \pm 1,2	17,4 \pm 1,3	18,4 \pm 1,9
Р-значення		0,66	0,47	0,12

Кількості фолікулів 3-5 мм у діаметрі не розрізнялися між групами лікування (Фіг. 6). Також не відрізнялася кількість фолікулів від 6 до 8 мм у діаметрі (Фіг. 7), фолікулів > 9 мм (Фіг. 8) або середній діаметр фолікулів протягом днів лікування (Фіг. 9).

Результати, отримані в цій серії дослідів, можна інтерпретувати таким чином, щоб припустити, що rFSH продукт індукує суперовуляторну відповідь у м'ясних корів, що не відрізняється від Folltropin-V. Також немає даних про зниження суперовуляторної відповіді порівняно з Folltropin-V, коли корів обробили тричі підряд. Суперовуляторна відповідь у кінцевому дозуванні схожа на перші дві, і це буде підтверджено наступним набором OVA/ембріона. Існує стурбованість із приводу збільшення числа незапліднених (> 10 мм) фолікулів у корів, що одержували rFSH (в основному через велику кількість незапліднених фолікулів у двох корів), що повинна бути предметом подальшого розслідування. Інші дослідження також необхідні, щоб визначити оптимальне дозування rFSH суперзапліднених корів і молочних корів і визначити довгострокові наслідки лікування послідовно rFSH більш ніж у три рази.

Специфічність інсерції для поліпшеного періоду напіввиведення

Щоб визначити, чи є спостережуване поліпшення напіврозпаду специфічним для інсерції послідовності SEQ ID NO: 1, людська альфа-субодина з інсерцією була змінена, щоб видалити аміно кінцевий валін. Потім обоє були випробувані на їхню здатність продукувати cAMP, разом з аналогом, що не має інсерції. Дослідження показали, що інсерція являє собою конкретну послідовність і надає чудове зв'язування та період напіврозпаду в альфа-субодина (див. Фіг. 9). Умови одержання потім були розглянуті в різних умовах росту для оптимізації максимального продукування (див Таблицю 8).

У Таблиці 8 наведені дані оптимізації продукування людської альфа-субодина

Таблиця 8

Зразки	Серед- ня OD	Інтерпо- льована нг/мл	Фактор розведе- ння	нг/мл*роз	Концентра- ція нг/мл	SEM	Виходи нг/чашку
Вставка I в GLP Sigma 6 середовищі	1,1753 0,92265	23,10155 16,92817	800 1600	18481,24 27085,072	22783,156	4301,916	2506,1472
Вставка I в Excell 302 середовищі	1,1518 0,827	22,49597 14,75474	800 1600	17996,776 23607,584	20802,18	2805,404	2669,6131
Вставка I в Lonza середовищі	1,1652 0,90045	22,84037 16,41683	800 1600	18272,296 26266,928	22269,612	3997,316	2820,8175
Вставка I в Nyclone середовищі	1,9913 1,37845 0,9435 0,57165	24,68149 13,94756 8,538053 4,64663	400 800 1600 3200	9872,596 11158,048 13660,885 14869,216	12390,186	1140,7851	1734,6201

Інсерцію потім досліджували разом з бичачим аналогом, і було підтверджено, що збільшення періоду напіврозпаду є специфічним для послідовності інсерції (див. Фіг. 11).

Перелік послідовностей

<110> Шкудлінські, Маріуш В.
Уейнтрауб, Брюс Д.

<120> СУПЕРАГОНІСТИ ГЛІКОПРОТЕЇНОВОГО ГОРМОНУ ТРИВАЛОЇ ДІЇ

<130> 056815-5010-WO

<150> US 61/677,331

<151> 2012-07-30

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Модифікований глікопротеїн з інсерцією

<400> 1

Asn Val Thr Ile Asn Val

1 5

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 2

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu

1 5 10 15

Lys Glu Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys

20 25 30

Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg Ser Lys

35 40 45


```

Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala Thr Cys Cys
 50                      55                      60
Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn Val Arg Val
65                      70                      75                      80
Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
                      85                      90                      95

```

```

<210> 3
<211> 96
<212> PRT
<213> Ovis aries

```

<400> 3

```

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

```

```

<210> 4
<211> 96
<212> PRT
<213> Equus caballus

```

<400> 4

```

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

```

Val Ala Lys Ala Phe Ile Arg Val Thr Val Met Gly Asn Ile Lys Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr Cys Tyr His His Lys Ile
 85 90 95

<210> 5
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

<210> 7

<211> 102

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 7

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

<210> 8

<211> 102

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 8

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

```

                        85                      90                      95
Cys Tyr Tyr His Lys Ser
                        100

<210>  9
<211> 102
<212>  PRT
<213>  Equus caballus

<400>  9

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

```

```

<210> 10
<211> 102
<212>  PRT
<213>  Sus scrofa

<400>  10

```

```

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

```

Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val
 65 70 75 80
 Met Gly Asn Ala Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr
 85 90 95
 Cys Tyr Tyr His Lys Ser
 100

<210> 11
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Модифікований глікопротеїн з інсерцією

<400> 12

Thr Asn Val Thr Ile Asn Val

1 5
 <210> 13
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 13

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> 14
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 14

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

100

<210> 15
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 15

```

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

```

<210> 16
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 16

```

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

```

```

65              70              75              80
Val Met Gly Asn Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser
              85              90              95
Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
              100

```

```

<210> 17
<211> 98
<212> PRT
<213> Bos taurus

```

<400> 17

```

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

```

```

<210> 18
<211> 98
<212> PRT
<213> Bos taurus

```

<400> 18

```

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

```



```

      50              55              60
Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn Val
65              70              75              80
Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His
      85              90              95
Lys Ser

```

```

<210> 19
<211> 99
<212> PRT
<213> Bos taurus

```

```

<400> 19

```

```

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

```

```

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Модифікований глікопротеїн з інсерцією

```

```

<400> 20

```

```

Val Asn Val Thr Ile Asn Val Thr
1              5
<210> 21
<211> 99

```

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 99

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 22

```

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

```

<210> 23

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> bFSH суперагоніст (5R)

<400> 23

Phe	Pro	Asp	Gly	Glu	Phe	Thr	Met	Gln	Gly	Cys	Pro	Glu	Cys	Arg	Leu
1				5					10					15	
Arg	Arg	Asn	Arg	Tyr	Phe	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Pro	Ile	Tyr	Gln	Cys
			20					25						30	

<210> 24
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> bFSH суперагоніст (4R+1K)

<400> 24

Phe	Pro	Asp	Gly	Glu	Phe	Thr	Met	Gln	Gly	Cys	Pro	Glu	Cys	Arg	Leu
1				5					10					15	
Arg	Lys	Asn	Arg	Tyr	Phe	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Pro	Ile	Tyr	Gln	Cys
			20					25						30	

<210> 25
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> bFSH суперагоніст (5R+Ins1)

<400> 25

Phe	Pro	Asp	Gly	Glu	Phe	Asn	Val	Thr	Ile	Asn	Val	Thr	Met	Gln	Gly
1				5					10					15	
Cys	Pro	Glu	Cys	Arg	Leu	Arg	Arg	Asn	Arg	Tyr	Phe	Ser	Arg	Pro	Asp

```

                20                25                30
Ala Pro Ile Tyr Gln Cys
                35

<210> 26
<211> 39
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> bFSH суперагоніст (5R+Ins2)

<400> 26

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln
1                5                10                15
Gly Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro
                20                25                30
Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys
                35

<210> 27
<211> 34
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> bFSH суперагоніст (5R+Ins3)

<400> 27

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys
1                5                10                15
Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile Tyr
                20                25                30
Gln Cys

<210> 28
<211> 35

```

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> bFSH суперагоніст (5R+Ins4)

<400> 28

```
Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu
1           5           10           15
Cys Arg Leu Arg Arg Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile
          20           25           30
Tyr Gln Cys
          35
```

<210> 29

<211> 38

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> bFSH суперагоніст (4R+1K+Ins1)

<400> 29

```
Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln Gly
1           5           10           15
Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp
          20           25           30
Ala Pro Ile Tyr Gln Cys
          35
```

<210> 30

<211> 39

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> bFSH суперагоніст (4R+1K+Ins2)

<400> 30

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Met Gln
 1 5 10 15
 Gly Cys Pro Glu Cys Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro
 20 25 30
 Asp Ala Pro Ile Tyr Gln Cys
 35

<210> 31
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> bFSH суперагоніст (4R+1K+Ins3)

<400> 31

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys
 1 5 10 15
 Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile Tyr
 20 25 30
 Gln Cys

<210> 32
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> bFSH суперагоніст (4R+1K+Ins4)

<400> 32

Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Asn Val Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Leu Arg Lys Asn Arg Tyr Phe Ser Arg Pro Asp Ala Pro Ile
 20 25 30
 Tyr Gln Cys
 35

<210> 33
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> hFSH суперагоніст (4R)

<400> 33

Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	Cys	Thr	Leu	Arg	Arg	Asn
1				5				10					15		
Arg	Phe	Phe	Ser	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu	Gln	Cys			
			20					25							

<210> 34
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> hFSH суперагоніст (4R+Ins1)

<400> 34

Ala	Pro	Asp	Val	Asn	Val	Thr	Ile	Asn	Val	Thr	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu
1				5				10					15		
Cys	Cys	Thr	Leu	Arg	Arg	Asn	Arg	Phe	Phe	Ser	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro
			20					25					30		
Ile	Leu	Gln	Cys												
			35												

<210> 35
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> hFSH суперагоніст (4R+Ins2)

<400> 35

```

Ala Pro Asp Asn Val Thr Ile Asn Val Thr Gln Asp Cys Pro Glu Cys
1           5           10           15
Cys Thr Leu Arg Arg Asn Arg Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro Ile
           20           25           30
Leu Gln Cys
           35

```

<210> 36

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> hFSH суперагоніст (4R+Ins3)

<400> 36

```

Ala Pro Asp Asn Val Thr Gln Asp Cys Pro Glu Cys Cys Thr Leu Arg
1           5           10           15
Arg Asn Arg Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys
           20           25           30

```

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> hFSH суперагоніст (4R+Ins4)

<400> 37

```

Ala Pro Asp Val Asn Val Thr Gln Asp Cys Pro Glu Cys Cys Thr Leu
1           5           10           15
Arg Arg Asn Arg Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys
           20           25           30

```

<210> 38

<211> 101
<212> PRT
<213> Equus caballus

<400> 38

```

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

```

<210> 39
<211> 101
<212> PRT
<213> Equus caballus

<400> 39

```

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

```

100

<210> 40
<211> 102
<212> PRT
<213> Equus caballus

<400> 40

```

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

```

<210> 41
<211> 101
<212> PRT
<213> Equus caballus

<400> 41

```

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

```

```

65              70              75              80
Gly Asn Ile Lys Leu Glu Asn His Thr Gln Cys Tyr Cys Ser Thr Cys
              85              90              95
Tyr His His Lys Ile
              100

```

```

<210> 42
<211> 102
<212> PRT
<213> Equus caballus

<400> 42

```

```

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

```

```

<210> 43
<211> 28
<212> PRT
<213> Equus caballus

<400> 43

```

```

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
              20              25

<210> 44
<211> 32

```

<212> PRT

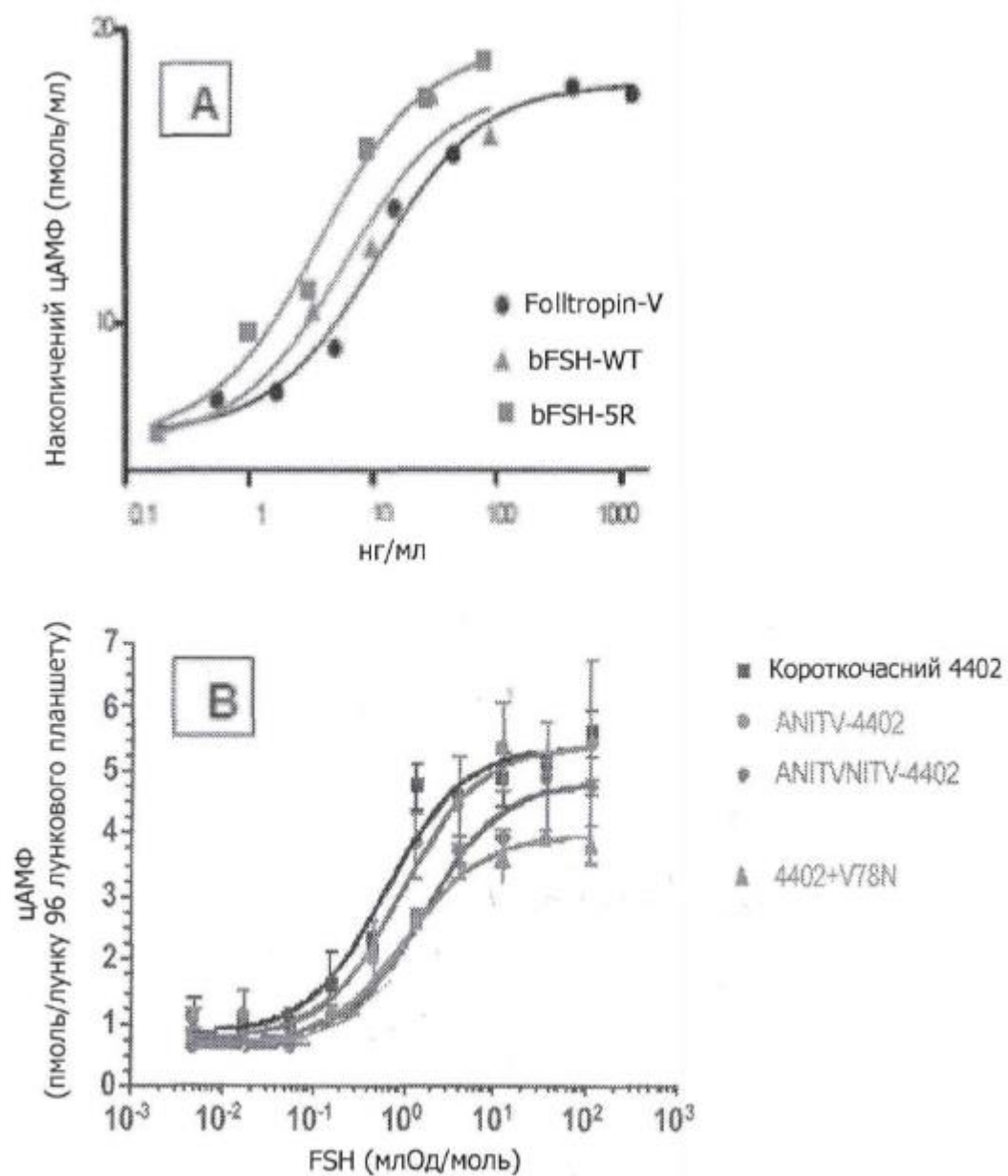
<213> Equus caballus

<400> 44

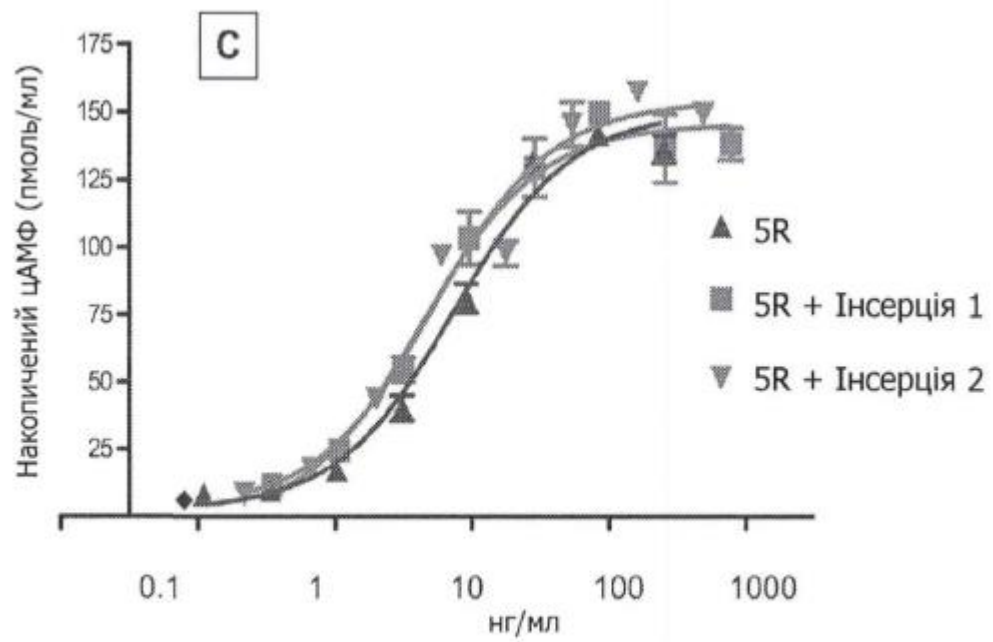
Phe	Pro	Asp	Gly	Glu	Phe	Thr	Met	Gln	Gly	Cys	Pro	Glu	Cys	Lys	Leu
1				5				10					15		
Lys	Glu	Asn	Lys	Tyr	Phe	Ser	Lys	Pro	Asp	Ala	Pro	Ile	Tyr	Gln	Cys
			20					25					30		

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

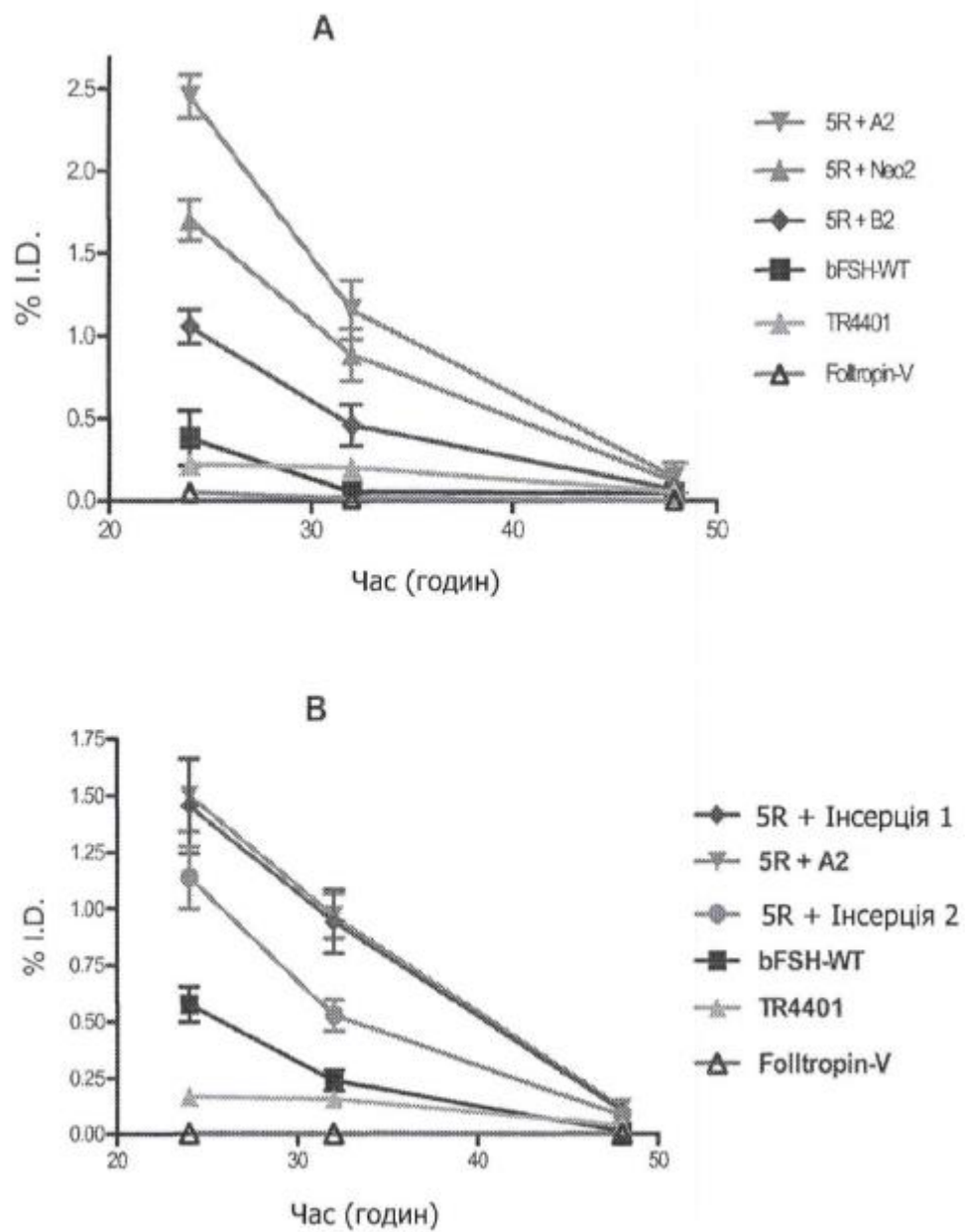
- 5 1. Модифікований поліпептид бичачої альфа-субодиниці, причому зазначений поліпептид альфа-субодиниці містить амінокислотну послідовність зі щонайменше 95 %, 86 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю до SEQ ID NO:7, причому коли ідентичність до SEQ ID NO:7 становить менше ніж 100 %, амінокислота в положенні 7 залишається Аспарагіном, положенні 8 залишається Валіном, положенні 9 залишається Треоніном, положенні 10 залишається Ізолейцином, положенні 11 залишається Аспарагіном, положенні 12 залишається Валіном, положенні 21 залишається Аргініном, положенні 23 залишається Аргініном, положенні 24 залишається Аргініном, положенні 26 залишається Аргініном та положенні 30 залишається Аргініном з SEQ ID NO:7.
- 10 2. Модифікований поліпептид бичачої альфа-субодиниці за пунктом 1, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7
- 15 3. Модифікований поліпептид бичачої альфа-субодиниці за пунктом 1, де зазначений поліпептид альфа-субодиниці являє собою поліпептид дикого типу бичачої альфа-субодиниці (SEQ ID NO:2), який містить;
 - (a) поліпептид Аспарагін-Валін-Треонін-Ізолейцин-Аспарагін-Валін (NVTINV) (SEQ ID NO:1), вставлений безпосередньо після положення 6 зазначеного поліпептиду альфа-субодиниці; та
 - 20 (b) заміщення на аргінін (R) в положеннях 15, 17, 18, 20 та 24.
- 25 4. Модифікований глікопротеїновий гормон, який містить модифікований поліпептид бичачої альфа-субодиниці за будь-яким одним з пунктів 1-3, та бета-субодиницю лютеїнізуючого гормону (LH), хоріонічного гонадотропіну (CG), фолікул-стимулюючого гормону (FSH) або тироїд-стимулюючого гормону (TSH).
- 30 5. Модифікований глікопротеїновий гормон, який містить модифікований поліпептид бичачої альфа-субодиниці за будь-яким одним з пунктів 1-3 та бета-субодиницю фолікул-стимулюючого гормону (FSH).
- 35 6. Модифікований глікопротеїновий гормон, який містить модифікований поліпептид бичачої альфа-субодиниці за будь-яким одним з пунктів 1-3 для застосування в лікуванні овуляторної дисфункції, недостатності лютеїнової фази, безпліддя незрозумілого ґенезу, обмеженого в часі запліднення яйцеклітини, низької експресії рецептора FSH, низької чутливості рецептора FSH, недостатності зв'язування з рецептором FSH, недостатності сполучення з рецептором FSH або недостатності або ураження гіпофізу у тварин.
- 40 7. Модифікований глікопротеїновий гормон за пунктом 4 або 5 для застосування в лікуванні овуляторної дисфункції, недостатності лютеїнової фази, безпліддя незрозумілого ґенезу, обмеженого в часі запліднення яйцеклітини, низької експресії рецептора FSH, низької чутливості рецептора FSH, недостатності зв'язування з рецептором FSH, недостатності сполучення з рецептором FSH або недостатності або ураження гіпофізу у тварин.
- 45 8. Модифікований глікопротеїновий гормон за пунктом 6 або 7, де зазначеною твариною є корова.
9. Спосіб стимулювання овуляції у тварини, який включає введення зазначеній тварині модифікованого глікопротеїнового гормону, який містить модифікований поліпептид бичачої альфа-субодиниці за будь-яким одним з пунктів 1-3.
10. Спосіб стимулювання овуляції у тварини, який включає введення зазначеній тварині модифікованого глікопротеїнового гормону за пунктом 4 або 5.
11. Спосіб за пунктом 9 або 10, де зазначеною твариною є корова.



Фіг. 1



Фіг. 1



Фіг. 2

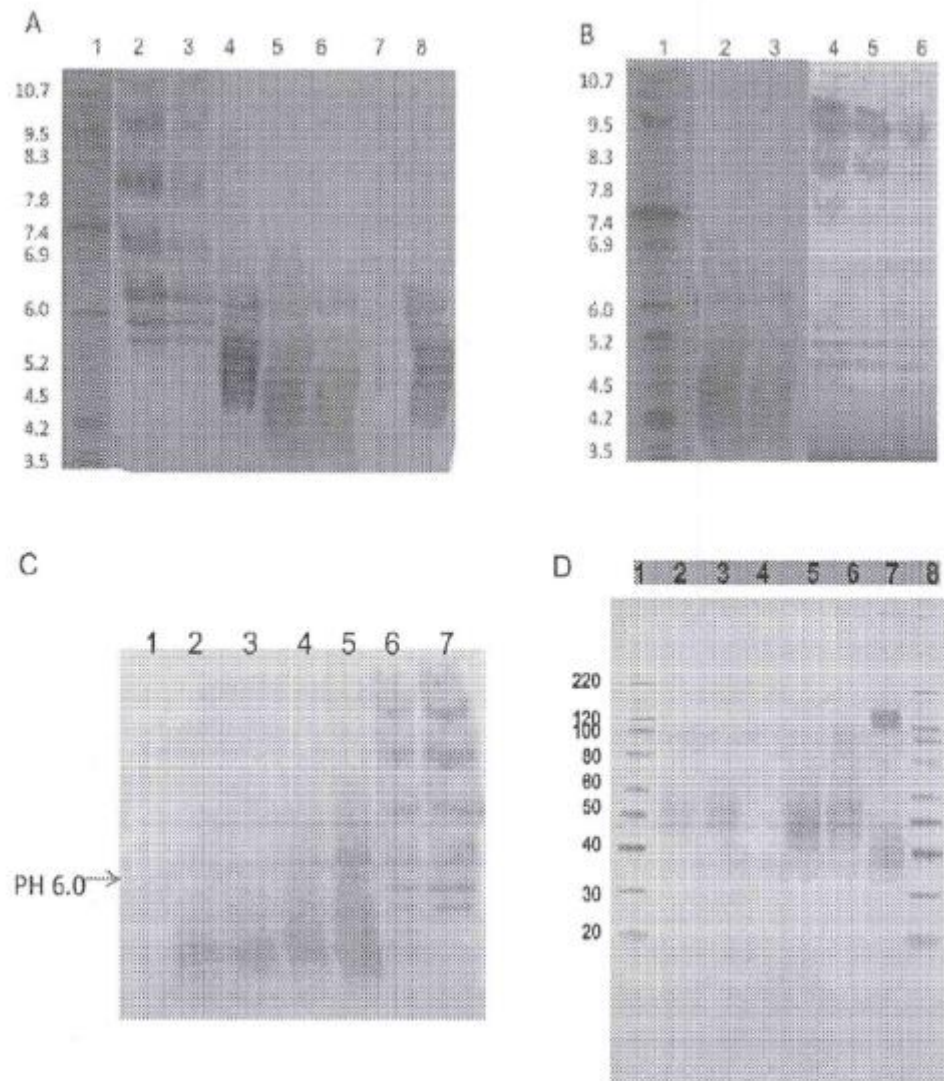
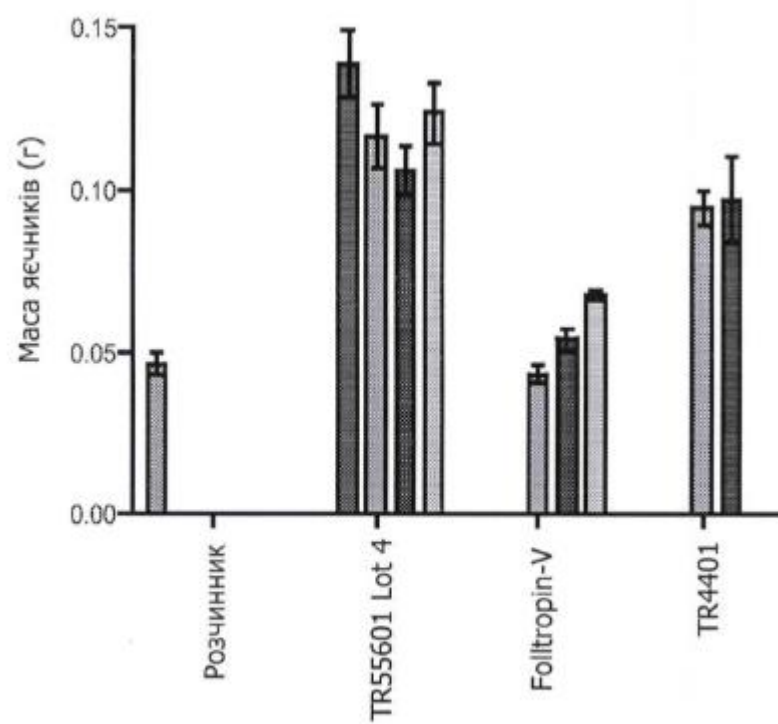
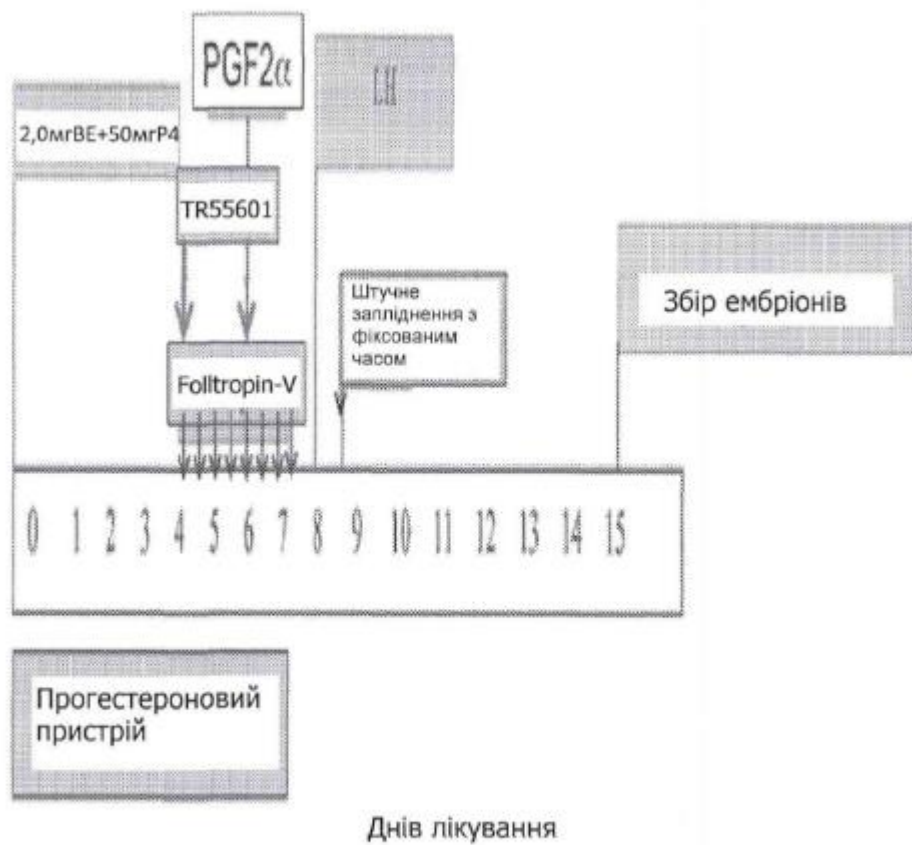


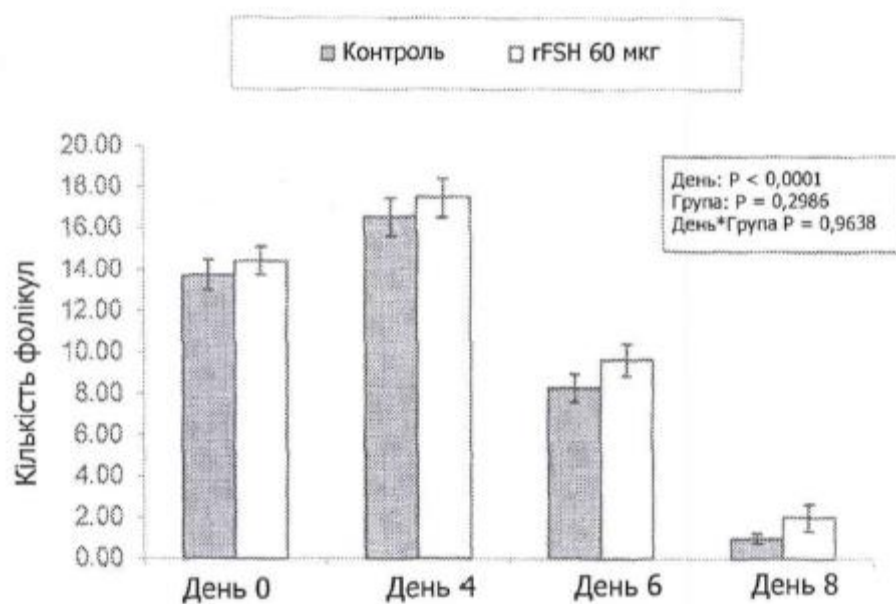
Fig. 3



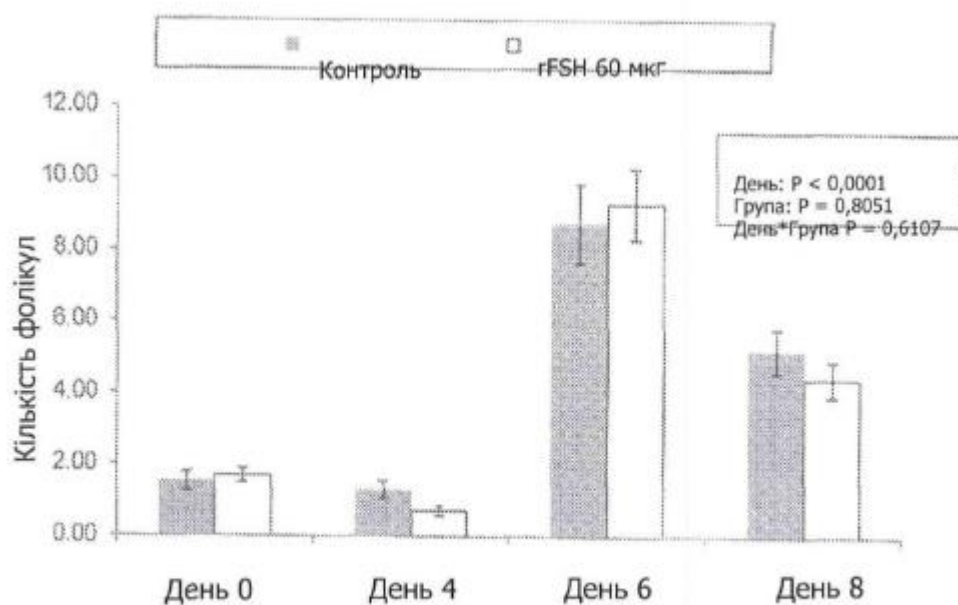
Фіг. 4



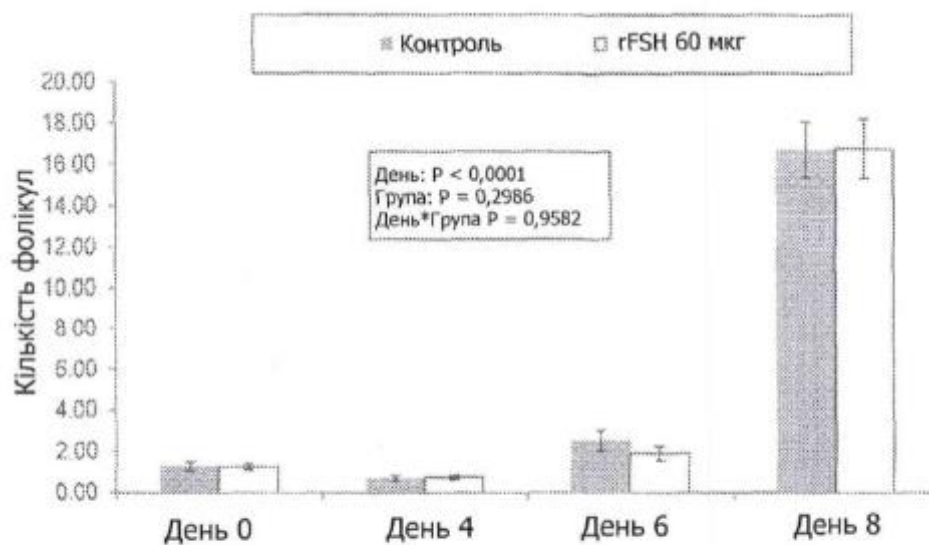
Фіг. 5



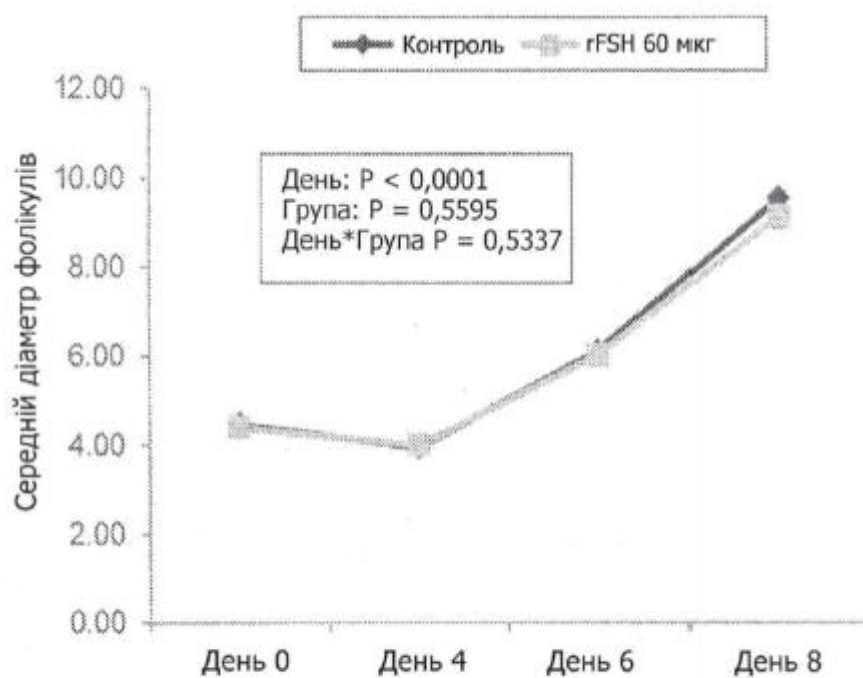
Фіг. 6



Фіг. 7

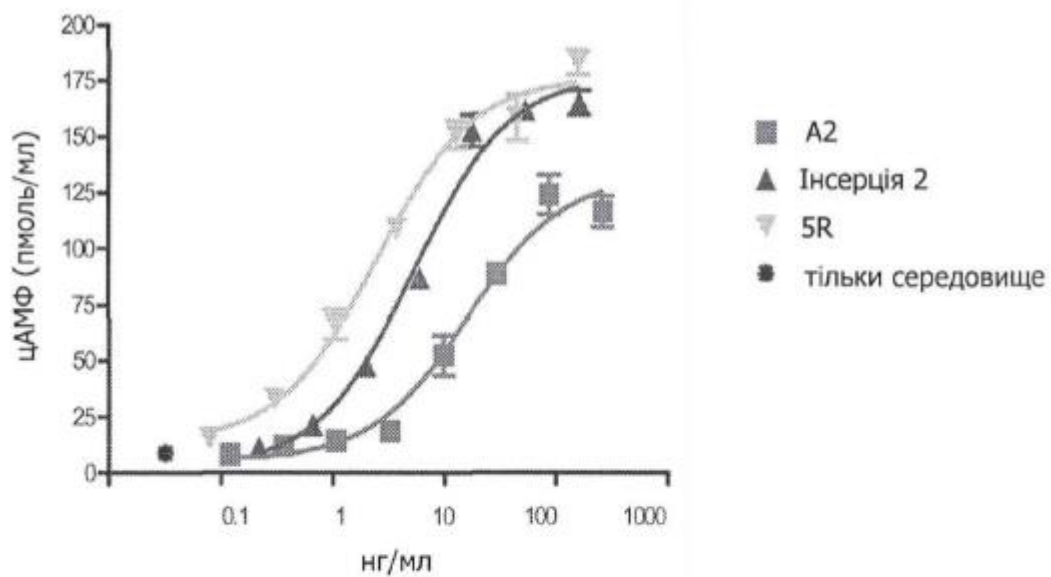


Фіг. 8



Фіг. 9

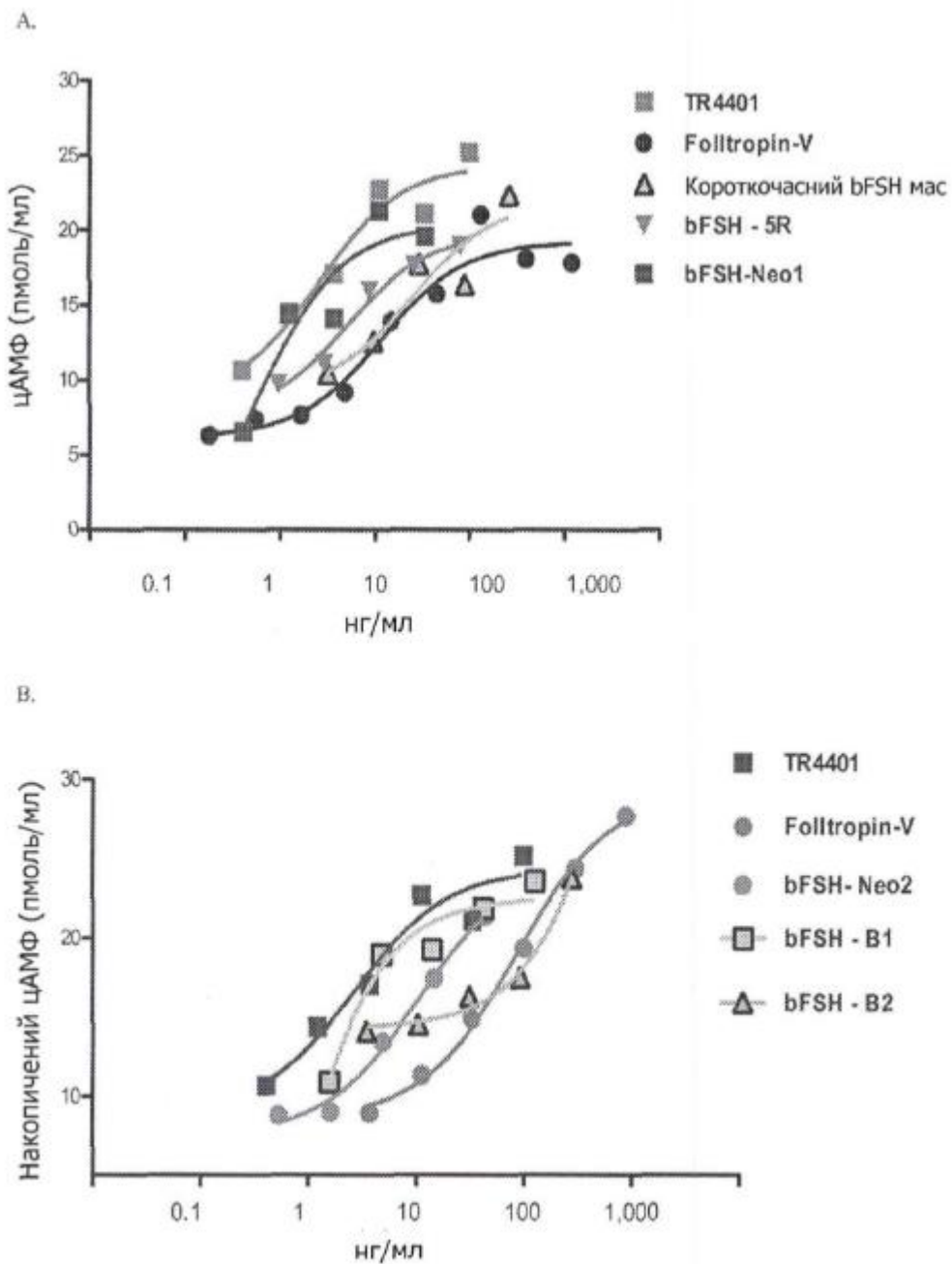
А.



В.

	EC50 (нг/мол)	Верхня частина кривої (V _{макс}) (пмоль цАМФ/мл)
A2	16,22	133,1
Інсерція 2	5,28	177,9
5R	2,45	176,7

Фіг. 10



Фіг. 11

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601