



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88879

(13) C2

(51) МПК (2009)  
A61K 38/24МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) МУТАНТ ГЛІКОЗИЛУВАННЯ FSH

1

2

(21) а200603350

(22) 02.09.2004

(24) 10.12.2009

(86) PCT/US2004/029042, 02.09.2004

(31) 60/499,802

(32) 02.09.2003

(33) US

(46) 10.12.2009, Бюл.№ 23, 2009 р.

(72) ГЕРОН ЛУІЗ М., US, АРКІНСТЕЛЛ СТЕФЕН  
ДЖ., GB, БРОНДИК УІЛЬЯМ Х., US, КАМПБЕЛЛ  
РОБЕРТ К., US, ДЗЯНЬ СЮЛЯНЬ, US, МАККЕНА  
ШОН Д., US, ТЕППЕР МАРК, US(73) ЕПЛАЙД РІСЬОРЧ СИСТЕМЗ ЕРС ХОЛДІНГ  
Н.В., AN

(56) WO 0158493 A, 16.08.01.

(57) 1. Рекombінантний FSH, в якому альфа-  
субодина FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3, а  
бета-субодина FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ  
№4.2. Рекombінантний FSH за п. 1, який відрізняється  
тим, що N55 бета-субодина є глікозилованим.3. Рекombінантний FSH за п. 1, який відрізняється  
тим, що N83 альфа-субодина є глікозилованим і  
T57 бета-субодина є глікозилованим.4. Композиція, яка містить рекombінантний FSH за  
п. 2 або 3 і фармацевтично прийнятний носій або  
наповнювач.5. Спосіб лікування безплідної тварини, який  
включає введення ссавцю, який цього потребує,  
ефективної кількості рекombінантного FSH за п. 2  
або 3.6. Спосіб стимулювання фолікулогенезу у ссавця,  
який включає введення ссавцю, який цього потре-  
бує, ефективної кількості рекombінантного FSH за  
п. 2 або 3.7. Спосіб індукування гіперстимуляції яєчника у  
ссавця, який включає введення ссавцю, який цього  
потребує, ефективної кількості рекombінантного  
FSH за п. 2 або 3.

Цей винахід стосується поліпептидів, які де-  
монструють активність фолікулостимулювального  
гормону, способів одержання таких поліпептидів  
та застосування таких поліпептидів у терапії, зок-  
рема, при лікуванні розладів репродуктивної фун-  
кції.

## а. Гонадотропіни

Фолікулостимулювальний гормон (FSH) є чле-  
ном сімейства гонадотропінів, які відіграють клю-  
чову роль у людській фертильності. Гонадотропі-  
ни, до яких належить також лютеїнізуючий гормон  
(LH) та хоріонічний гонадотропін (CG), є гетероди-  
мерами, кожен з яких складається зі спільної  $\alpha$ -  
субодина (92 амінокислоти) та специфічної  $\beta$ -  
субодина (111 амінокислот у FSH). Амінокислотні  
послідовності зрілих форм  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодина пред-  
ставлені ПОСЛІДОВНІСТЮ №1 і ПОСЛІДОВНІС-  
ТЮ №2, відповідно.

Людський FSH виділили з гіпофізу та з сечі по-  
стклімактеричних жінок (EP 322438), а також одер-  
жали рекombінантними методами у клітинах сса-  
вців (патент США №5,639,640, патент США  
№5,156,957, патент США №4,923,805, патент США

№4,840,896, патент США №5,767,251, EP 211,894 і  
EP 521,586). У останніх згаданих посиланнях роз-  
кривають також ген  $\beta$ -субодина FSH. У патенті  
США №5,405,945 розкривають модифікований  
людський ген  $\alpha$ -субодина, що містить лише один  
інтрон.

Лю (Liu) та інші, J. Biol. Chem., 1993, 15; 268(2):  
21613-21617, Гроссманн (Grossmann) та інші, Mol.  
Endocrinol., 1996, 10(6): 769-779, Рот (Roth) та Діас  
(Dias), Mol. Cell. Endocrinol., 1995, 1; 109(2): 143-  
149, Валов (Valove) та інші, Endocrinology 1994;  
135(6): 2657-2661, Ю (Yoo) та інші, J. Biol. Chem.,  
1993, 25; 268(18): 13034-13042), патент США  
№5,508,261, Чепел (Chappel) та інші, 1998,  
Human Reproduction, 13(3): 1835 розкривають різ-  
номанітні дослідження структурно-функціональної  
залежності та ідентифікують амінокислотні залиш-  
ки, залучені до зв'язування рецепторів, активації  
та димеризації FSH.

б. Застосування гонадотропінів у методиках  
допоміжної репродукції

Гонадотропіни відіграють ключову роль у ре-  
продуктивному циклі, і їх застосування у екзоген-

(13) C2

(11) 88879

(19) UA

них терапевтичних заходах є обов'язковим у методах допоміжної репродукції (ART), наприклад, у заплідненні *in vitro* (IVF), FVF у поєднанні з інтрацитоплазматичним введенням сперми (IVF/ICSI) та трансплантації зародка (ET), а також для індукції овуляції (OI) у ановуляторних хворих, що зазнають запліднення *in vivo* природним шляхом або шляхом внутрішньоматкового запліднення (IUI).

Патент США №4,589,402 і патент США №4,845,077 розкривають очищений людський FSH, що не містить LH, та його застосування для запліднення *in vitro*. EP 322438 розкриває білок із активністю FSH (щонайменше 6200Од/мг), по суті позбавлений активності LH, де  $\alpha$ -субодиниця і  $\beta$ -субодиниця FSH можуть бути, відповідно, субодиницями дикого типу або їхніми специфічними скороченими формами.

Для досягнення терапевтичного ефекту необхідним є тривале лікування, як правило, впродовж 8-10 послідовних днів, а подеколи до 21 дня для стимулювання фолікулогенезу у жінок та майже до 18 місяців у гіпогонадотропних чоловіків для індукування сперматогенезу. Рекombінантний hFSH, як правило, вводять шляхом внутрішньом'язових або підшкірних щоденних ін'єкцій, що пов'язано з дискомфортом та потенційною можливістю виникнення місцевих реакцій на ділянку ін'єкції. Зменшення частоти введень полегшило б лікування і забезпечило б зручність введення гонадотропінів із більшою стерпністю та легкістю для хворих.

#### с. Глікозилювання FSH

Гонадотропіни є глікопротеїнами, кожна субодиниця яких має зв'язані з аспарагіном (N-зв'язані) бічні олігосахаридні ланцюги, які є важливими для їх *in vivo* активності і функціонування. Додання вуглеводів (глікозилювання) до поліпептидів є посттрансляційним явищем, наслідком якого є додання цукрових ланцюгів до специфічних аспарагін-зв'язаних (N-зв'язаних) або серин/треонін-зв'язаних (O-зв'язаних) амінокислот. Вуглеводні структури, у протилежність до інваріантної амінокислотної послідовності білкової частини глікопротеїнів, є варіабельними і цю особливість називають мікрогетерогенністю. Наприклад, сайти N-глікозилювання на одному й тому самому білку можуть містити різні вуглеводні структури. Окрім того, навіть на одному й тому самому сайті глікозилювання на даному глікопротеїні можна знайти різні вуглеводні структури. Ця гетерогенність є наслідком позаматричного синтезу вуглеводів.

N-глікозилювання білків відбувається конкретно на консенсусній послідовності Asn-Xaa-Ser/Thr і, меншою мірою, на консенсусній послідовності Asn-Xaa-Cys, де Xaa може бути залишком будь-якої амінокислоти. Присутність консенсусного трипептиду не є, однак, достатньою умовою для забезпечення глікозилювання залишку аспарагіну. Наприклад, N-глікозилювання послідовності Asn-Pro-Ser/Thr відбувається з частотою, у 50 разів меншою за глікозилювання інших консенсусних послідовностей Asn-Xaa-Ser/Thr.

Людський FSH містить чотири N-зв'язані сайти глікозилювання: два на спільній  $\alpha$ -субодиниці у положеннях 52 і 78 і два на  $\beta$ -субодиниці у положеннях 7 і 24. Вуглеводи, приєднані до  $\alpha$ -

субодиниці FSH, є критичними для складання димерів, їх цільності, секретування та трансдукції сигналу, у той час як вуглеводи  $\beta$ -субодиниці є важливими для складання димерів, їх секретування та виведення гетеродимерів із системи кровообігу.

Гелвей (Galway) та інші, *Endocrinology* 1990; 127(1): 93-100, демонструє, що варіанти FSH, одержані у лінії клітин CHO з N-ацетилглюкозамінотрансферазою-1 або у лінії клітин CHO, дефективних за перенесенням сіалової кислоти, є активними *in vitro* такою ж мірою, що і FSH, секретований клітинами дикого типу або очищений гіпофізарний FSH, але їм бракує *in vivo* активності, ймовірно унаслідок швидкого виведення недостатньо глікозилованих варіантів із сироватки. Д'Антоніо (D'Antonio) та інші, *Human Reprod.*, 1999; 14(5): 1160-1167, описує різні ізоформи FSH, які циркулюють у системі кровообігу. Згадані ізоформи мають ідентичні амінокислотні послідовності, однак різняться за ступенем їх посттрансляційної модифікації. Було встановлено, що менш кисла ізоформна група виводиться *in vivo* швидше за кислу ізоформну групу, можливо унаслідок різниці у вмісті сіалової кислоти між ізоформами. Більше того, Бішоп (Bishop) та інші, *Endocrinology* 1995; 136(6): 2635-2640, дійшов висновку, що період напіввиведення із системи кровообігу, як видається, є головним визначником активності *in vivo*. Ці спостереження призвели до виникнення гіпотези, суть якої полягає у тому, що період напіввиведення FSH із кровотоку може бути збільшеним шляхом введення додаткових сайтів глікозилювання для підвищення вмісту сіалової кислоти у поліпептиді.

#### d. Варіанти FSH

Агоністи FSH зі збільшеним періодом напіввиведення з кровотоку були одержані шляхом злиття карбоксикінцевого пептиду hCG (CTP) з нативним рекombінантним людським FSH (rhFSH). Складовою CTP містить амінокислоти від 112-118 до 145 з чотирма O-зв'язаними сайтами глікозилювання, які знаходяться у положеннях 121, 127, 132 та 138. Патент США №5,338,835 і патент США №5,585,345 розкривають  $\beta$ -субодиницю модифікованого FSH, подовжену на C-кінцевому Glu складовою CTP hCG. Стверджують, що одержаний модифікований аналог має біологічну активність нативного FSH, але подовжений період напіввиведення з кровотоку. Патент США №5,405,945 розкриває, що карбоксикінцева ділянка  $\beta$ -субодиниці hCG або її варіант виявляють значний вплив на виведення CG, FSH та LH.

Патент США №5,883,073 розкриває однопептидові білки, до складу яких входить дві  $\alpha$ -субодиниці, з агоністичною або антагоністичною активністю відносно CG, TSH (тиреотропний гормон), LH та FSH. Патент США №5,508,261 розкриває гетеродимерні поліпептиди, що мають зв'язувальну спорідненість до рецепторів LH та FSH, до складу яких входить  $\alpha$ -субодиниця глікопротеїнового гормону та  $\beta$ -субодиничний поліпептид, який не зустрічається за природних умов, де згаданий  $\beta$ -субодиничний поліпептид являє собою ланцюг амінокислот, що містить чотири сполучені послі-

довності, кожна з яких вибрана з переліку специфічних послідовностей. Клейн (Klein) та інші (2003) розкриває одностанційний аналог FSH із подовженим періодом напіввиведення з кровотоку, де  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниці зв'язуються олігопептидом, що містить два N-зв'язаних сайти глікозилювання.

WO 01/58493 розкриває 77 мутацій, які можуть бути здійснені на  $\alpha$ -субодиниці FSH та 51 мутацію, які можуть бути здійснені на  $\beta$ -субодиниці FSH для поліпшення періоду напіввиведення FSH з кровотоку *in vivo*. WO 01/58493 розкриває, що мутантні  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниці можуть застосовуватись індивідуально (1 додатковий сайт глікозилювання) або у поєднанні (2 додаткові сайти глікозилювання). 128 мутантів-"кандидатів" ідентифікували шляхом застосування 50 моделей об'ємної структури FSH, які одержали виключно на основі структури hCG та порівняльного аналізу первинної структури FSH та hCG, незважаючи на лише 32% ідентичність між  $\beta$ -субодиницями hCG та FSH. WO 01/58493 не розкриває одержання або випробування жодних  $\alpha$ - або  $\beta$ -субодиниць FSH, де сайт глікозилювання було введено шляхом сайт-спрямованого мутагенезу.

Існує клінічна потреба у продукті, який повністю або частково забезпечував би усі терапевтично важливі ефекти FSH і який міг би вводиться рідше, аніж доступні на цей час продукти FSH, і який, відповідно до варіанта, якому віддають перевагу, забезпечував би більш стабільний рівень активності циркулюючого FSH, порівняно з відповідними показниками, які одержують за допомогою сучасних методів лікування.

Цей винахід спрямовано на такі продукти, а також на способи одержання таких продуктів.

Цей винахід стосується мутантного FSH, де  $\alpha$ -субодиниця FSH включає ПОСЛІДОВНІСТЬ №3 і де  $\beta$ -субодиниця FSH включає ПОСЛІДОВНІСТЬ №4. Мутантний FSH може бути N-глікозилований на 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6 залишках аспарагіну згаданого мутантного FSH. Глікозилованою може бути N83 мутантної  $\alpha$ -субодиниці. Глікозилованою може бути N55 мутантної  $\beta$ -субодиниці.

Цей винахід також стосується виділеної ДНК, що кодує  $\alpha$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3. Цей винахід також стосується виділеної ДНК, що кодує  $\beta$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4.

Цей винахід також стосується вектора, що містить ДНК, що кодує  $\alpha$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3. Згаданий вектор може бути експресійним вектором.

Цей винахід також стосується вектора, що містить ДНК, що кодує  $\beta$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4. Згаданий вектор може бути експресійним вектором.

Цей винахід також стосується вектора, що містить першу ДНК і другу ДНК, де згадана перша ДНК кодує  $\alpha$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3, і де згадана друга ДНК кодує  $\beta$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4. Згаданий вектор може бути експресійним вектором.

Цей винахід також стосується клітини, що містить вектор, що містить ДНК, що кодує  $\alpha$ -

субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3. Згаданий вектор може бути експресійним вектором. Згадана клітина може бути клітиною ссавця.

Цей винахід також стосується клітини, що містить вектор, що містить ДНК, що кодує  $\beta$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4. Згаданий вектор може бути експресійним вектором. Згадана клітина може бути клітиною ссавця.

Цей винахід також стосується клітини, що містить вектор, що містить першу ДНК і другу ДНК, де згадана перша ДНК кодує  $\alpha$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3, і де згадана друга ДНК кодує  $\beta$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4. Згаданий вектор може бути експресійним вектором. Згадана клітина може бути клітиною ссавця.

Цей винахід також стосується клітини, що містить перший і другий вектор, де перший згаданий вектор містить ДНК, що кодує  $\alpha$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3, і де другий згаданий вектор містить ДНК, що кодує  $\beta$ -субодиницю мутантного FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4. Згаданий вектор може бути експресійним вектором. Згадана клітина може бути клітиною ссавця.

Цей винахід також стосується способу одержання FSH-мутанта, що включає культивування клітин ссавця, здатних до глікозилювання білків, де згадані клітини містять перший експресійний вектор, що містить ДНА, що кодує  $\alpha$ -субодиницю FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №1, і другий експресійний вектор, що містить ДНК, що кодує  $\beta$ -субодиницю FSH, що містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №2.

Цей винахід також стосується композиції, що містить FSH-мутант і фармацевтично прийнятний носій або наповнювач, де  $\alpha$ -субодиниця FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3, і де  $\beta$ -субодиниця FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4.

Цей винахід також стосується способу лікування безплідного ссавця, що включає введення ссавцю, який цього потребує, ефективної кількості FSH-мутанта, де  $\alpha$ -субодиниця FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3, і де  $\beta$ -субодиниця FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4.

Цей винахід також стосується способу стимулювання фолікулогенезу у ссавця, що включає введення ссавцю, який цього потребує, ефективної кількості FSH-мутанта, де  $\alpha$ -субодиниця FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3, і де  $\beta$ -субодиниця FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4.

Цей винахід також стосується способу індукування гіперстимуляції яєчників у ссавця, що включає введення ссавцю, який цього потребує, ефективної кількості FSH-мутанта, де  $\alpha$ -субодиниця FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №3, і де  $\beta$ -субодиниця FSH містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №4.

На Фіг.1 показана плазмідна карта експресійного вектора, що застосовується для експресії субодиниці  $\alpha$ H83N.

На Фіг.2 показана плазмідна карта експресійного вектора, що застосовується для тимчасової експресії субодиниці  $\beta$ E55/V57T.

На Фіг.3 показана плазмідна карта експресійного вектора, що застосовується для експресії βE55/V57T.

На Фіг.4 показана морфологія GM-1. Фіг.4A і Фіг.4C: MALDI-TOF мас-спектрометрія (мас-спектрометрія з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині з часопролітним аналізатором) GM-1 та Gonad-F. Фіг.4B: SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію) аналіз GM-1 та Gonad-F.

На Фіг.5 показані характеристики GM-1 на моделі дводенної індукції овуляції у нестатевозрілих пацюків.

Незважаючи на те, що було показано, що наслідком підвищення вуглеводного вмісту FSH може бути збільшення періоду його напіввиведення з кровотоку *in vivo*, поліпшення періоду напіввиведення FSH із кровотоку є більш складною проблемою, аніж просте додання додаткових сайтів глікозилювання. Консенсусна послідовність глікозилювання є необхідною умовою додання вуглеводів, однак вона не є достатньою для забезпечення того, що сайт додання вуглеводу буде використаним. Інші фактори, наприклад, місцеве укладання білка та конформація під час біосинтезу, вирішують, чи приєднається олігосахарид на даному сайті консенсусної послідовності. Окрім того, консенсусна послідовність повинна знаходитись у такому положенні, щоб глікозилювання згаданого сайту не перешкоджало зв'язуванню рецептора або не погіршувало укладання, конформацію чи стабільність глікопротеїну.

До цього часу аналоги FSH зі збільшеним періодом напіввиведення обмежувались гібридними білками, де гібридна частина поліпептиду включала додаткові сайти глікозилювання. Аналоги FSH із підвищеним періодом напіввиведення ще належало одержати введенням сайтів глікозилювання шляхом сайт-спрямованого мутагенезу.

Знання структури FSH є критичним у разі додання сайтів глікозилювання шляхом сайт-спрямованого мутагенезу, оскільки консенсусні залишки повинні додаватись у положеннях, що є сумісними з доданням вуглеводів. У разі, якщо сайт глікозилювання вводять шляхом мутації, мутовані залишки не повинні руйнувати тривимірної структури білка або суттєво погіршувати бажану функцію білка, наприклад, зв'язування рецептора або активацію. Окрім того, консенсусні залишки не повинні додаватись таким чином, що вони опиняться захованими у нутрощах укладеної білкової структури, оскільки у такому разі зменшується ймовірність здійснення глікозилювання на конкретному сайті.

До недавніх часів відомості про тривимірну структуру гонадотропінів обмежувались двома незалежними повідомленнями про кристалічну структуру hCG: одна структура частково деглікозилизованого hCG (Лепторн (Lapthorn) та інші, 1994; Бу (Wu) та інші, 1994) і структура трикомпонентного комплексу повністю глікозилизованого hCG і двох Fv фрагментів, визначена з низькою роздільною здатністю (Тегоні (Tegoni) та інші, 1999).

Незважаючи на те, що hCG і FSH мають по суті ідентичні схеми укладання, дві згадані структури суттєво різняться (Фокс (Fox) та інші, 2001), і докладна структура окремих амінокислотних залишків молекули FSH не може бути відповідним чином модельована на основі попередньо визначених структур hCG (Бу (Wu) та інші, 1994; Лепторн (Lapthorn) та інші, 1994).

Цей винахід спрямовано на FSH-мутант, який розробили виключно на основі тривимірної кристалічної структури молекули людського FSH (Фокс (Fox) та інші, 2001). FSH-мутант відповідно до цього винаходу ("GM-1") модифікували для введення представлених нижче замін для одержання додаткових сайтів упізнання глікозилювання: H83N α-субодиниці та E55N/V57T β-субодиниці. Глікозилюватись може один або декілька додаткових сайтів глікозилювання рекомбінантного FSH. Один або декілька додаткових сайтів глікозилювання мутантного FSH можуть глікозилюватись *in vitro* або *in vivo*.

[042] FSH-мутант відповідно до цього винаходу можна одержати за допомогою будь-якого відповідного способу, відомого у цій галузі. До цих способів належить конструювання нуклеотидних послідовностей, що кодують відповідні FSH-мутанти та експресія амінокислотної послідовності у відповідному трансфікованому хазяїні. FSH-мутант відповідно до цього винаходу можна також одержати шляхом хімічного синтезу або комбінуванням хімічного синтезу та методів рекомбінантних ДНК.

[043] FSH-мутант відповідно до цього винаходу може містити α- та β-субодиниці FSH у формі двох окремих поліпептидних ланцюгів, де два згадані ланцюги димеризуються *in vivo* таким чином, що утворюють димерний поліпептид, або він може містити одноланцюгову генно-інженерну конструкцію, що містить дві субодиниці, ковалентно зв'язані пептидним зв'язком або пептидним лінкером. Амінокислотні залишки лінкерного пептиду можуть демонструвати властивості, які суттєво не перешкоджають активності FSH-мутанта.

FSH-мутант відповідно до цього винаходу може мати збільшений період напіввиведення порівняно з FSH дикого типу. FSH-мутант відповідно до цього винаходу може також мати підвищену стабільність порівняно з FSH дикого типу. FSH-мутант може містити олігосахариди на 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6 N-зв'язаному сайтах глікозилювання. FSH-мутант може містити один або декілька ізоформ FSH-мутанта, де кожна ізоформа містить олігосахариди на 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6 N-зв'язаному сайтах глікозилювання.

Нуклеотидна послідовність, що кодує α- або β-субодиниці FSH-мутантів відповідно до цього винаходу, може конструюватись шляхом виділення або синтезування нуклеотидної послідовності, що кодує субодиницю батьківського FSH, наприклад, hFSH-альфа або hFSH-бета, з амінокислотними послідовностями, представленими ПОСЛІДОВНІСТЮ №3 і ПОСЛІДОВНІСТЮ №4, відповідно. Нуклеотидна послідовність у подальшому може змінюватись таким чином, щоб забезпечити можливість заміни відповідних амінокислотних

залишків. Згадана нуклеотидна послідовність може модифікуватись сайт-спрямованим мутагенозом. Як альтернатива, нуклеотидна послідовність може бути одержана шляхом хімічного синтезу, де олігонуклеотиди конструюються на основі специфічної амінокислотної послідовності FSH-мутанта.

Нуклеотидна послідовність, що кодує поліпептид, може вводитись до рекомбінантного вектора і функціонально зв'язуватись із контрольними послідовностями, необхідними для експресії поліпептиду у бажаній трансформованій клітині-хазяїні. Фахівець у цій галузі може зробити вибір серед цих векторів, послідовностей контролювання експресії та хазяїв без зайвого експериментування. Згаданим рекомбінантним вектором може бути вектор з автономною реплікацією, тобто вектор, що існує як позахромосомна структура, реплікація якої не залежить від реплікації хромосоми, наприклад, плазміда. Як альтернатива, згаданим вектором може бути вектор, який, у разі введення до клітини-хазяїна, інтегрується у геном клітини-хазяїна і реплікується разом із хромосомою(-ами), з якою(-ими) він об'єднався.

Згаданим вектором може бути експресійний вектор, у якому нуклеотидна послідовність, що кодує поліпептид відповідно до цього винаходу, є функціонально зв'язаною з додатковими сегментами, необхідними для транскрипції нуклеотидної послідовності. Згаданий вектор можна одержати з плазмідної або вірусної ДНК. Ряд придатних експресійних векторів для експресії у клітинах-хазяях, які були згадані у цьому описі, є комерційно доступними або описаними у літературі.

Згаданий рекомбінантний вектор може додатково містити послідовність ДНК, яка надає можливість реплікування згаданого вектора у відповідній клітині-хазяїні. Прикладом такої послідовності (у разі, коли клітиною-хазяїном є клітина ссавця) є точка початку реплікації SV40. Згаданий вектор може також містити селективний маркер, наприклад, ген, продукт якого доповнює Дефект клітини-хазяїна, наприклад, ген, що кодує дигідрофолатредуктазу (DHFR) або ген, який забезпечує стійкість до лікарського препарату, наприклад, ампіциліну, канаміцину, тетрацикліну, хлорамфеніколу, неоміцину, гіроміцину або метотрексату.

Згаданий вектор може містити також ампліфікувальний ген, наприклад, DHFR, завдяки чому клітини, що мають численні копії ампліфікувального гена та фланкувальні послідовності, у тому числі ДНК мутантного FSH, можуть відбиратись на відповідних живильних середовищах. Термін "контрольні послідовності", що застосовується у цьому описі, означає усі компоненти, необхідні або прийнятні для експресії поліпептиду відповідно до цього винаходу. Прикладами відповідних контрольних послідовностей для спрямування транскрипції у клітинах ссавців є ранні та пізні промотори SV40 та аденовірусу, наприклад, головний пізній промотор аденовірусу 2, промотор MT-1 (ген метаталонеїну) та передранній промотор гена людського цитомегаловірусу (CMV).

Цей винахід також стосується виділеної ДНК, що кодує  $\alpha$ -субодиницю H83N та виділеної ДНК, що кодує  $\beta$ -субодиницю E55N/V57T FSH. Нуклео-

тидні послідовності цього винаходу, що кодують FSH-мутанти, незалежно від того, чи були вони одержані сайт-спрямованим мутагенозом, синтезом, полімерною ланцюговою реакцією або іншими способами, можуть факультативно містити також нуклеотидну послідовність, що кодує сигнальний пептид. Згаданий сигнальний пептид є присутнім у тому разі, коли поліпептид повинен секретуватись клітинами, у яких він експресується. Такий сигнальний пептид, у разі присутності, повинен належати до числа тих, що розпізнаються клітиною, вибраною для експресії поліпептиду. Згаданий сигнальний пептид може бути гомологічним (наприклад, бути таким, який є за нормальних умов зв'язаним із субодиницею hFSH) або гетерологічним (тобто походить з іншого джерела, аніж hFSH) поліпептиду чи може бути гомологічним або гетерологічним клітині-хазяїну, тобто бути сигнальним пептидом, який за нормальних умов експресується клітиною-хазяїном або який за нормальних умов клітиною-хазяїном не експресується.

Для продукування поліпептидних субодиниць відповідно до цього винаходу може застосовуватись будь-який придатний хазяїн, у тому числі клітини або лінії клітин бактерій, грибів (у тому числі дріжджів), рослин, комах, ссавців або клітини "чи лінії клітин інших придатних тварин, а також трансгенні тварини або рослини. Прикладами придатних клітин-хазяїв ссавців є лінії клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO) (наприклад, CHO-KL; ATCC (Американська колекція типових культур) CCL-61), лінії клітин зеленої мавпи (COS) (наприклад, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651); клітини мишей (наприклад, NSIO), лінії клітин нирок хом'ячка (BI-EK) (наприклад, ATCC CRL-1632 або ATCC CCL-10) і людські клітини (наприклад, BEK 293 (ATCC CRL-1573)), а також клітини рослин у культурі клітин тканини. У цій галузі відомі додаткові придатні лінії клітин, доступні з колекцій, наприклад, з Американської колекції типових культур, США. Способи введення екзогенної ДНК до клітин-хазяїв ссавців включають трансфекцію, опосередковану фосфатом кальцію, електропорацію, трансфекцію, опосередковану DEAE (діетиламіноетил)-декстраном, трансфекцію, опосередковану ліпосомами та застосування векторів на основі вірусних геномів.

Клітини можуть культивуватись у живильному середовищі, придатному для продукування поліпептиду із застосуванням способів, відомих у цій галузі. Клітина, наприклад, можуть культивуватись у хитальних колбах, шляхом ферментації у лабораторних або промислових масштабах (у тому числі шляхом безперервної ферментації, періодичної ферментації, періодичної ферментації з підживленням або твердофазної ферментації) у лабораторних або промислових ферментерах у придатному середовищі або за умов, які забезпечують можливість експресії та/або виділення поліпептиду. Культивування відбувається у придатному живильному середовищі, що містить джерела вуглецю і азоту та неорганічні солі, за методами, відовими у цій галузі. Придатні живильні середовища є доступними від комерційних постачальників або можуть готуватись за опублікованими про-

писами (наприклад, у каталогах Американської колекції типових культур). Якщо поліпептид секретується до живильного середовища, його можна виділяти безпосередньо зі згаданого середовища. Якщо поліпептид не секретується, його можна виділяти з клітинних лізатів.

Одержаний мутантний поліпептид FSH може виділятися способами, відомими у цій галузі. Наприклад, він може виділятися із живильного середовища традиційними способами, у тому числі (але без обмеження) центрифугуванням, фільтруванням, екстрагуванням, сушінням розпилюванням, випарюванням або осадженням. Мутантні поліпептиди FSH можуть очищатися різноманітними способами, відомими у цій галузі, у тому числі (але без обмеження) хроматографуванням (іонообмінним, афінним, гідрофобним, хроматофокусувальним та гель-хроматографуванням), методами електрофорезу (наприклад, препаративним ізоелектричним фокусуванням), завдяки різниці розчинності (наприклад, осадженням сульфатом амонію), SDS-PAGE або екстрагуванням.

Цей винахід також стосується фармацевтичної композиції, що містить FSH-мутант відповідно до цього винаходу. Такі фармацевтичні композиції можуть застосовуватися для стимулювання фолікулогенезу, наприклад, у поєднанні з індукцією овуляції або методиками допоміжної репродукції (ART). Оскільки FSH-мутант відповідно до цього винаходу є особливо ефективним у відношенні індукування розвитку та визрівання численних фолікулів, він є особливо придатним для застосування у методиках допоміжної репродукції, у яких бажаним є збирання численних овоцитів.

Як альтернатива, у разі ретельного підбирання дози, FSH-мутант відповідно до цього винаходу може застосовуватися для індукування монофолікулогенезу для ОІ або нечисленного фолікулогенезу (приблизно до трьох фолікулів) для ІУІ для запліднення *in vivo*. Монофолікулогенез може забезпечуватися також зменшеною дозою FSH-мутанта або рідшим введенням дози, порівняно з традиційними препаратами FSH. Наприклад, препарат FSH відповідно до цього винаходу для ОІ може вводиться у дозі 225-400МОд через три дні або у менших дозах у залежності від реакції хворого. Реакція хворого може відслідковуватися за допомогою двовимірної ультразвукової ехографії.

FSH-мутант відповідно до цього винаходу може застосовуватися у схемах контрольованої гіперстимуляції яєчників (СОН). Стандартні схеми СОН включають фазу регуляції за типом негативного зворотного зв'язку, впродовж якої виділення ендогенного лютеїнізуючого гормону (LH) інгібуюється введенням агоніста гонадотропін-визивального гормону (GnRH), з подальшою стимуляторною фазою, на якій розвиток фолікулів (фолікулогенез) індукується щоденним введенням фолікулостимулювального гормону (FSH), як правило, у дозі приблизно 150-225МОд/добу. Як альтернатива, стимулювання розпочинають FSH після спонтанної або індукованої менструації, з подальшим введенням GnRH-антагоніста (із започаткуванням, як правило, приблизно на шостий день стимуляторної фази). У разі появи щонайменше 3

фолікулів >16мм (одного 18мм), вводять разову ударну дозу hCG (5-10000МОд) для імітації імпульсного викиду природного LH і індукування овуляції. Виділення овоцитів відбувається через 36-38год. після ін'єкції hCG.

FSH-мутант відповідно до цього винаходу може застосовуватися також для ОІ та ІУІ. FSH-стимуляцію препаратом відповідно до цього винаходу розпочинають після спонтанної або індукованої менструації у добовій дозі 75-150МОд. Коли 1 фолікул або 3 фолікули досягнуть діаметра щонайменше 16мм, вводять разову ударну дозу hCG для індукування овуляції. Запліднення здійснюють *in vivo* шляхом регулярних статевих зносин або ІУІ.

Оскільки FSH-мутант відповідно до цього винаходу може мати збільшений період напіввиведення, порівняно з препаратами FSH дикого типу, у схемах, опис яких було наведено вище, можуть застосовуватися нижчі (у МОд) дози FSH та/або вони можуть модифікуватися шляхом скорочення FSH-стимуляторного періоду, з досягненням такої самої або кращої реакції з точки зору кількості та життєздатності фолікулів. Наприклад, у разі застосування препарату FSH відповідно до цього винаходу, адекватного фолікулогенезу можна досягти з добовими дозами, що дорівнюють або приблизно дорівнюють 50-150МОд FSH, відповідно до варіанта, якому віддають перевагу, 50-100МОд, відповідно до варіанта, якому віддають більшу перевагу, що дорівнюють або приблизно дорівнюють 50-75МОд FSH. Введення FSH здійснюють, як правило, на добовій або напівдобовій основі. Період введення може бути меншим або становити приблизно 14 днів, відповідно до варіанта, якому віддають перевагу, бути меншим або становити приблизно 12 днів, відповідно до варіанта, якому віддають більшу перевагу, бути меншим або становити приблизно 11 днів або 10 днів. У разі ОІ, препарати FSH-мутанта відповідно до цього винаходу можуть вводиться у дозах 25-150МОд FSH/добу, відповідно до варіанта, якому віддають перевагу, 50-125МОд FSH/добу. Для лікування безпліддя у чоловіків, препарат FSH-мутанта відповідно до цього винаходу може вводиться у дозі 3×150-300МОд/тиждень, доки сперматогенез не досягне рівнів, адекватних для запліднення шляхом регулярних статевих зносин або шляхом застосування методик допоміжної репродукції.

Завдяки довшому періоду напіввиведення мутантного FSH відповідно до цього винаходу, він може вводиться як препарат пролонгованої дії. Традиційний FSH може вводиться у дозі, що дорівнює або приблизно дорівнює 300МОд через день із досягненням таких самих результатів, як і у разі введення кожного дня у дозі, що дорівнює або приблизно дорівнює 150МОд. Словосполучення "пролонговані" означає препарати FSH, які можуть вводиться рідше, аніж через два дні. Мутантний FSH відповідно до цього винаходу може вводиться через три дні, через чотири дні, через п'ять днів, через шість днів або через сім днів із досягненням подібних або кращих результатів, порівняно з щоденним введенням традиційного FSH.

Відповідно до одного аспекта, FSH-мутант або композиція, що містить FSH-мутант, застосовуються для виготовлення лікарського препарату для лікування захворювань, розладів або станів. Відповідно до іншого аспекта, поліпептид або фармацевтична композиція відповідно до цього винаходу застосовуються у способі лікування ссавця, зокрема, людини, що включає введення ссавцю, який цього потребує, такого поліпептиду або фармацевтичної композиції.

Фахівцям у цій галузі буде зрозуміло, що ефективна кількість поліпептиду, препарату або композиції відповідно до цього винаходу залежить, *inter alia*, від захворювання, дози, схеми введення лікарського засобу, незалежно від того, вводять поліпептид, препарат або композицію незалежно або у поєднанні з іншими лікарськими засобами, періоду напіввиведення згаданої композиції із сироватки та від загального стану здоров'я хворого. За типовим варіантом, ефективна доза препарату або композиції відповідно до цього винаходу є достатньою для забезпечення терапевтичного ефекту.

FSH-мутант відповідно до цього винаходу може вводиться у композиції, що містить один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв або наповнювачів. "Фармацевтично прийнятний" означає носій або наповнювач, який не викликає жодних небажаних ефектів у хворих, яким він вводиться. Такі фармацевтично прийнятні носії та наповнювачі є добре відомими у цій галузі і поліпептид відповідно до цього винаходу може вводиться до складу фармацевтичних композицій добре відомими способами (дивись, наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 видання, під редакцією AP. Геннаро (A.R. Gennaro), Mack Publishing Company (1990); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, під редакцією С. Фрокер (S. Frokjaer), Л. Хоргаард (L. Hovgaard), Taylor&Francis (2000); Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3 видання, під редакцією А. Кібб (A. Kibbe), Pharmaceutical Press (2000)). Фармацевтично прийнятними наповнювачами, які можуть застосовуватись у композиціях, що містять поліпептид відповідно до цього винаходу, є, наприклад, буферні агенти, стабілізуювальні агенти, консерванти, ізотонічні агенти, неіонні поверхнево-активні речовини або детергенти, змочувальні компоненти, антиоксиданти, заповнювачі або наповнювачі, хелатоутворювачі і співрозчинники.

Фармацевтичні композиції відповідно до цього винаходу, що містять FSH-мутант, можуть виготовлятися у різноманітних формах, у тому числі у формі рідин, наприклад, готових до застосування розчинів або суспензій, гелів, у ліофілізованих або будь-якій іншій придатній формі, наприклад, у формі порошку або кристалів, придатних для виготовлення розчину. Форма композиції може залежати від конкретного показання, за яким її застосовують і буде очевидною для фахівця у цій галузі.

Фармацевтична композиція, що містить FSH-мутант відповідно до цього винаходу, може вводиться внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, внутрішньоочеревинним, внутрішньошкірним, підшкірним, під'язиковим, букальним, інтраназальним,

черезшкірним, інгаляційним або будь-яким іншим прийнятним шляхом, наприклад, за методом PowderJect або ProLease або за допомогою шприца-ін'єктора. Спосіб введення може залежати від конкретного показання, за яким композиція застосовується, і буде очевидним для фахівця у цій галузі техніки. Композиція може вводиться підшкірним шляхом, оскільки це може надати можливість хворому здійснення самостійного введення.

Фармацевтичні композиції відповідно до цього винаходу можуть вводиться у поєднанні з іншими лікарськими засобами. Ці лікарські засоби можуть включатись як складова частина тієї самої фармацевтичної композиції або можуть вводиться окремо від поліпептиду відповідно до цього винаходу, одночасно або відповідно до будь-якої іншої прийнятної схеми введення лікарського засобу. На додаток до цього, поліпептид, препарат або фармацевтична композиція відповідно до цього винаходу може застосовуватись як допоміжний засіб з іншими способами лікувального впливу.

Цей винахід має численні аспекти, які ілюструються наведеними нижче необмежувальними прикладами.

#### Приклад 1

##### Одиночні FSH-мутанти

##### Ідентифікація можливих сайтів глікозилювання

Об'ємну кристалічну структуру людського FSH застосовували для ідентифікування можливих сайтів глікозилювання у  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць FSH. Кожна асиметрична одиниця кристалічної структури має дві молекули FSH (чотири субодиниці). Дві молекули FSH взаємно накладали і порівнювали, причому кожний залишок візуально перевіряли для ідентифікування потенційних сайтів N-глікозилювання. Кристалографічну структуру FSH об'єднували зі знанням взаємодії FSH/рецептора FSH (FSHR) для додаткової допомоги у виборі потенційних сайтів N-глікозилювання. Принципові критерії конструювання полягали у мінімальному руйнуванні об'ємної структури, мінімальному руйнуванні прогнозованих сайтів зв'язування і активації та прогнозованої об'ємної структури, сумісної з глікозилюванням.

Виходячи з вищенаведених критеріїв, з амінокислотної послідовності FSH одержали двадцять одиночних мутантів (8 $\alpha$  і 12 $\beta$ ), у тому числі два наведених нижче мутанти:

$\alpha$ -субодиниця H83N;

$\beta$ -субодиниця E55N/V57T.

##### Тимчасова експресія одиночних FSH-мутантів

Кожен із мутантів одержали шляхом сайт-спрямованого мутагенезу подібно до опису, наведеному у Прикладі 3. Мутанти тимчасово експресувались у невеликій кількості у клітинах CHO-Dukx разом з комплементарною субодиницею дикого типу подібно до опису, наведеному у Прикладі 4. Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA) одержаних культуральних супернатантів показав придатність 19 з 20 мутантів до тимчасової експресії. Рівні тимчасової експресії контрольних препаратів і мутантів знаходились у межах 0-1,95мкг/мл із середнім значенням 0,59мкг/мл і медіаною 0,5мкг/мл, відповідно, при неодноразово

підтвердженому рівні експресії 0мкг/мл при псевдотрансфекціях.

Морфологічний аналіз одиночних FSH-мутантів

Аліквоти концентрованих культуральних супернатантів тимчасової експресії одиночних FSH-мутантів піддавали електрофоретичному аналізу за невідновних умов (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію), що дозволило відділити інтактні гетеродимери FSH від вільних  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць. Білки електрофоретично переносили до PVDF (полівініліденфторид) і аналізували із застосуванням первинних антитіл, спрямованих проти  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць FSH. Під час попереднього добору перевірили цілий ряд первинних антитіл різних постачальників, які подеколи застосовували і у подальшому при проведенні підтверджувальних аналізів, однак найчастіше застосовували такі первинні антитіла: Chromaprobe BHS104 (біотинізоване поліклональне козяче антитіло проти  $\alpha$ -субодиниць FSH) (1,5мкг/мл) і Chromaprobe BHS 105 (мишаче моноклональне антитіло проти  $\beta$ -субодиниць FSH) (1,5мкг/мл).

Дані морфологічного аналізу двох додаткових типів доповнили результати вестерн-блотингу інтактних гетеродимерних проб. Проби мутантів та контрольних препаратів із дисоційованими гетеродимерами, які піддавали вестерн-блотингу, та електрофоретично відділені імунні осадки мутантів та контрольних препаратів із дисоційованими гетеродимерами, які піддавали авторадіографії, метаболічним шляхом мітили за допомогою  $^{35}\text{S}$ -Cys.

З 19 експресованих FSH-мутантів лише п'ять продемонстрували підвищений ступінь глікозилювання, що засвідчувалось зсувом розподілу середньої молекулярної маси субодиниць або гетеродимеру. П'ять мутантів продемонстрували підвищений ступінь глікозилювання, у тому числі один  $\alpha$ -субодиничний мутант і чотири  $\beta$ -субодиничні мутанти, у тому числі  $\beta\text{E55N/V57T}$ .

Цікаво те, що  $\alpha$ -субодиничний мутант H83N не показав ознак підвищеного рівня глікозилювання, однак, як видається, викликав появу підвищеного відносного вмісту гетеродимерів у білковій популяції, порівняно з відносним вмістом гетеродимерів серед субодиниць FSH дикого типу, коекспресованих за тих самих тимчасових умов.

Період напіввиведення тимчасово експресованих одиночних FSH-мутантів

Фармакокінетику п'яти гіперглікозилованих одиночних мутантів, які одержали шляхом тимчасової експресії, у тому числі  $\beta\text{E55N/V57T}$ , порівнювали з Gonad-F. Gonad-F являє собою рекомбінантну форму FSH, що не відрізняється від нативного hFSH. Кількісне визначення вмісту FSH у ін'єкційному матеріалі та у пробах сироватки пацієнтів, які відбирали у визначені періоди часу після ін'єкції для кожного фармакокінетичного експерименту, здійснювали за допомогою ELISA. Жоден з 5 одиночних мутантів, у тому числі  $\beta$ -субодиничний мутант E55N/V57T, не продемонстрував періоду напіввиведення, який перевищував би період напіввиведення контрольного Gonad-F.

Очищення і аналіз мутантів, одержаних шляхом глікозилювання на одному сайті

Три з чотирьох гіперглікозилованих одиночних  $\beta$ -субодиничних мутантів, у тому числі мутант E55N/V57T, експресували і очищали засобами імуноафінного хроматографування. In vitro активність трьох гіперглікозилованих  $\beta$ -субодиничних мутантів, у тому числі мутанта E55N/V57T, порівнювали з рекомбінантним FSH за (i) здатністю конкурувати з FSH, міченим радіоактивним ізотопом  $^{125}\text{I}$ , за зв'язування з мембранними препаратами, що містять рецептор людського FSH ( $K_i$ ) та за (ii) здатністю стимулювати продукування FSHR-сполученого цАМФ ( $\text{EC}_{50}$ ):

	$K_i$	$\text{EC}_{50}$
$\beta\text{E55N/V57T}$	$8,6 \times 10^{-10} \text{M}$	$3,9 \times 10^{-11} \text{M}$
rhFSH	$4,8 \times 10^{-10} \text{M}$	$1,2 \times 10^{-11} \text{M}$

Вищенаведені результати показують, що  $\beta$ -субодиничний мутант E55N/V57T мав in vitro активність, порівняну з активністю FSH дикого типу. Фактично кожен з трьох одиночних  $\beta$ -субодиничних мутантів мав in vitro активність, порівняну з активністю FSH дикого типу. Більше того, мас-спектрометричний аналіз очищених одиночних  $\beta$ -субодиничних мутантів показав, що зсуви розподілу маси спостерігались у кожного з трьох мутантів. Жоден з одиночних глікозилованих мутантів, однак, не продемонстрував суттєво подовженого періоду напіввиведення під час визначення фармакокінетичних характеристик очищених білків після одноразової внутрішньовенної ін'єкції нестатевозрілим пацієнтам-самцям. Порівняно з rhFSH, період напіввиведення якого становив  $3,8 \pm 0,6$  год., період напіввиведення  $\beta\text{E55N/V57T}$  дорівнював  $4,8 \pm 0,4$  год.

#### Приклад 2

Продукування і аналіз мутантів подвійного глікозилювання

Унаслідок нездатності одиночних  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиничних мутантів до поліпшення періоду напіввиведення FSH, два одиночних  $\alpha$ -субодиничних мутанти об'єднали з трьома одиночними  $\beta$ -субодиницями у процесі тимчасової експресії з одержанням шести різних подвійних мутантів, у тому числі GM-1, який включав  $\alpha$ -субодиничний мутант H83N і  $\beta$ -субодиничний мутант E55N/V57T.

[078] П'ять із шести подвійних мутантів, у тому числі GM-1, були здатними до експресування. П'ять експресійних подвійних мутантів аналізували на здатність до стимулювання продукування FSHR-сполученого цАМФ. Кожен із п'яти подвійних мутантів, у тому числі і GM-1, був порівнянним із rhFSH щодо здатності до стимулювання in vivo продукування FSHR-сполученого цАМФ.

[079] Фармакокінетику тих самих п'яти подвійних мутантів FSH порівнювали також із рекомбінантним hFSH і CTP-FSH. Результати, наведені у Таблиці 1, вказують на те, що період напіввиведення GM-1 значно перевищував період напіввиведення rhFSH і наближався до періоду напіввиведення CTP-FSH.



Таблиця 1

## Фармакокінетика

Блок	$t_{1/2}$ (год)
rhFSH	3,4±0,5
CTP-FSH	7,6±2,6
GM-1	5,1±1,6

Підвищений період напіввиведення GM-1 викликає подив, приймаючи до уваги те, що одиночний  $\beta$ -субодиничний мутант E55N/V57T сам по собі не впливав на період напіввиведення. Додатковий подив викликає підвищений період напіввиведення GM-1, приймаючи до уваги, що  $\alpha$ -субодиничний

мутант H83N не викликав посилення глікозилювання.

## Приклад 3

## Продуктування GM-1

кДНК  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць людського FSH субклонували у векторі pDONR (фірма Invitrogen). Для введення N-з'язаних сайтів глікозилювання до  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць FSH застосовували набір для сайт-спрямованого мутагенезу QuikChange™ (фірма Stratagene). У системі QuikChange™ застосовуються два синтетичні олігонуклеотидні праймери, що містять бажану(-і) мутацію(-ії). Наведені нижче пари олігонуклеотидів застосовувались для введення N-з'язаних сайтів глікозилювання:

Таблиця 2

## Олігонуклеотиди

Субодиниця	Мутація	Олігонуклеотид	ПОСЛІДОВНІСТЬ №
$\alpha$	H83N	cacacggcgtgcaactgcagtgacttg	5
$\alpha$	H83N	caagtactgcagttgcacgcgctgtg	6
$\beta$	E55N, V57T	gcactctcactgtttcatatgtcaggttctgaaggtacatgtttctg	7
$\beta$	E55N, V57T	cagaaaacatgtacctcaagaacctgacatatgaacagtgagagtgc	8

Послідовність мутантів було підтверджено за допомогою набору для секвенування ABI PRISM BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit з подальшим аналізом за допомогою генетичного аналізатора ABI PRISM 310.

Мутанти  $\alpha$ H83N і  $\beta$ E55N/V57T субклонували у модифікованому експресійному векторі pCI за методикою клонування Gateway™ (фірма Invitrogen) з одержанням плазмід p13251 і p13252, як показано на Фіг.1 і Фіг.2. Експресійний вектор pCI ссавців (фірма Promega) попередньо перетворили на вектор цілеспрямованої доставки GATEWAY за допомогою системи перетворення векторів GATEWAY (фірма Invitrogen). Експресійний вектор pCI містить передранній енхансер/промотор людського цитомегаловірусу для регулювання експресії вставленого гена, інтрон у зворотному напрямку відносно гена для стимулювання експресії і пізній сигнал поліаденілування мавпячого вірусу SV 40 у прямому напрямку відносно введеного гена для термінації транскрипції.

Мутант  $\alpha$ H83N також субклонували у векторі D $\alpha$  з одержанням плазмід p13538, як показано на Фіг.3. Вектор D $\alpha$  є похідною pCLN3AXSV2DNFR. Вектор модифікували для включення гетерологічного інтрону із синтетичним донором сплайсованого фрагмента з інтрону A гена  $\alpha$ -субодиниці гонадотропіну (що містить акцептор сплайсованого фрагмента) у зворотному напрямку відносно 2 тис. п.н. фрагмента XbaI-PstI. Гетерологічний інтрон розміщується між промотором та сайтом клонування XhoI, завдяки чому він опиняється на 5' не-трансльованій ділянці транскрипту ДНК. Докладніше вектор D $\alpha$  був описаний Келтон (Kelton) та іншими, Mol. Cell Endocrinol, 89: 141-151 (1992).

## Приклад 4

## Експресія мутантного FSH

GM-1, глікозиляційний мутант FSH, вперше одержали ("GM-1, партія 1") шляхом котрансфекції

p13251 ( $\alpha$ H83N) і p13252 ( $\beta$ E55N/V57T) для тимчасової експресії гонадотропіну у безсироватковому культуральному середовищі. Для ліпофектації опосередкованої трансфекції у промислових масштабах (12-24 колб T175) клітини CHO-Dukx висівали ( $1,3 \times 10^7$  клітин/колбу) на культуральне середовище (MEM  $\alpha$ (+) (мінімальне підтримувальне середовище), 10% FBS (сироватка зародка великої рогатої худоби), 1% L-глутаміну) за 18-24 год. до трансфекції. Для трансфекції клітин готували як основну кількість суміші ліпофектаміну 2000/середовища Оптімем (1:17,6), так і суміш ДНК/Оптімем за таким прописом: 33 мкг ДНК на кожну субодиницю (у загальній кількості 66 мкг) на колбу T175. Через 20 хв. після змішування ошімем/ДНК та оптімем/ліпофектаміну, комплекси ДНК/ліпофектамін у середовищі оптімем наносили (-10 мл/колбу) на нещодавно підживлені (43,8 мкл/колбу) клітинні моношари. Після 4-6 год. При температурі 37°C клітинні моношари підживлювали 50 мл середовища для вирощування. Приблизно через 24 год. після трансфекції клітини переносили до виробничого живильного середовища (Sigma CHO PFM, доповненого L-глутаміном або до запатентованого фірмою Serono середовища Sigma CHO PFM C0234). Клітини з кондиціонованого виробничого середовища збирали через 48 год.

## Приклад 5

## Клони мутантного FSH

## Протоклони

Котрансфектування клітин CHO-DUKX  $\alpha$ H83N у D $\alpha$  (плазмід №13538) та  $\beta$ E55N/V57T/ у ClattR (плазмід №13252) у співвідношенні 1:3 здійснювали за стандартним кальційфосфатним методом. Протоклони одержували через 48 год. після трансфекції шляхом висівання клітин на селекційне середовище (MEM $\alpha$ (-), 10% dFBS, 4 мМ розчин

L-глутаміну) (10000 клітин/лунку) у 96-лункових планшетах (загалом 1596 лунок). Приблизно через 2 тижні протоклони розділяли 1:8 на селекційному середовищі, що містило 0,02мкМ МТХ (метотрексат). Згаданий процес розділення повторювали шляхом підвищення концентрації метотрексату (0,1 мкМ (192 лунки), 0,5мкМ, 1,0мкМ (116 лунок)) впродовж 6-8 тижнів з 116 протоклонами, які вижили при 1,0мкМ концентрації метотрексату.

Експресію 116 протоклонів оцінювали за допомогою DSL ELISA (безпосередній мономаркерний твердофазний імуоферментний аналіз) із застосуванням проб 24год. експресії з 96-лункових планшетів (у 1,0мкМ МТХ і 10% FBS). Експресія коливалась у межах від рівня, що не піддавався визначенню, до 3,72мкг/мл. Сімнадцять протоклонів із найвищим рівнем експресії висівали на 24 лункові планшети та у колбі T25 із подальшим збереженням на холодод кожної культури у вигляді набору з 3 флаконів. Два протоклони з максимальним рівнем експресії відтаювали і висівали для підтвердження рівня експресії у колбах T25. Об'ємна продуктивність GM1-21 і GM1-22 становила 1,74мкг/мл і 0,74мкг/мл, відповідно, з питомою продуктивністю 5,06 відносного відсотка густини і 1,28 відносного відсотка густини, відповідно. На основі цих результатів, GM1-21 відібрали для клонування і продукування другої партії GM-1 у бугелях, вміст яких перемішується під час обертання, як описано у Прикладі 6.

#### Клони

Клонування з кінцевим розведенням розпочинали шляхом інокуляції 96-лункових планшетів 0,25, 0,5, 1,0 та 2,0 клітинами GM-1-21/лунку, відповідно. Клонувальне середовище являло собою DMEM (модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла)/F12, що містило 10% cFBS та 1% L-глутаміну за відсутності МТХ. Усі лунки перевіряли за допомогою мікроскопа і будь-які лунки, що містили численні клітини, ліквідували.

Після вирощування впродовж приблизно 2 тижнів, популяцію клітин пересівали на 24 лункові планшети і, зрештою, у колби T25. Після досягнення клітинами рівня 80-100% злиття, об'ємну продуктивність визначали за допомогою DSL FSH ELISA (проби містили 10% FBS). 8 найкращих клонів пересівали у колби T75 для визначення 24год. об'ємної та питомої експресії. Проби кожного клону (у вигляді набору з 3 флаконів) зберігали на холоді у середовищі DMEM/F12, що містило 10% cFBS, 1% L-глутаміну і 10% DMSO (диметилсульфоксид). CHO-B1-GM1-21-98 демонстрували об'ємну продуктивність 7,21мкг/мл із питомою продуктивністю 6,25 відносного відсотка густини. У протилежність до цього, CHO-B1-GM1-21-107 демонстрували найвищу питому продуктивність (7,71 відносного відсотка густини) у поєднанні з об'ємною продуктивністю, яка становила 5,81мкг/мл.

CHO-B1-GM1-21-98 і CHO-B1-GM1-21-107 пересівали у чотири колби T175. Приблизно при 90% рівні злиття перед-MCB (25 флаконів кожного клону) зберігали на холоді у середовищі DMEM/F12, що містило 10% FBS, 1% L-глутаміну і 10% DMSO. Культура GM1-21-98 (7 пасаж) містила 3,26млн. клітин/флакон, а культура GM1-21-07 (6 пасаж)

містила 6,1млн. клітин/флакон. Флакон із пробом кожної культури пересілали до фірми Charles River Laboratories (Malvern, штат Пенсільванія) для перевірки на відповідність вимогам доброякісної медичної практики. Тести включали: виявлення фактора IX мікоплазм, перевірку стерильності, провокаційну пробу на вірус лімфоцитарного хориоменінгіту з мітогенактивованою протеїнкіназою, реакцію гемаглютинації, довгостроковий аналіз in vitro індукування клітинних фокусів для виявлення ксенотропного вірусу лейкемії мишей, довгостроковий вірусологічний тест бляшкоутворення для виявлення вірусу лейкемії мишей та ізоферментний аналіз. Кожну пробу піддавали перевірці усіма тестами.

#### Приклад 6

##### Додаткова експресія мутантного FSH

GM-1 продукували шляхом вирощування протоклону GM1-21, який було описано у Прикладі 5, у двох 850см<sup>2</sup> бугелях, вміст яких перемішувався під час обертання ("GM-1, партія 2"). Об'єм безсироваткового виробничого середовища (DMEM-F12+IFCS), кондиціонованого у цій серії, дорівнював 2600мл. Невелику кількість (13мл) концентрованого культурального супернатанту, що містила приблизно 0,2мг GM-1, залишили на збереженні при температурі -80°C у 'середовищі SRBI, оскільки 36мл аліквоту концентрованого культурального супернатанту втратили під час перенесення шляхом діалізу. Кількісне визначення здійснювали за допомогою DSL Active® FSH ELISA із застосуванням перевідного множника 1МОД=138нг FSH.

#### Приклад 7

##### Очищення мутантного FSH

##### Одержання проби

Виробничі середовища, що містили мутантний FSH, збирали, фільтрували за допомогою 0,22мкм фільтрувальних блоків і заморожували при температурі -70°C. Цільові білки у середовищах відтаювали впродовж ночі при температурі 4°C і концентрували шляхом ультрафільтрації із застосуванням приладу Ultrasette Screen Channel TFF, мембрани 10 K Omega, P/N 0S010C70 (фірма Pall Life Science). Осад на мембранах збирали і діалізували впродовж ночі проти 0,1М розчину трис-буфера (pH7,4), що містив 0,5М розчин NaCl (3×5л). Діалізований білок збирали, фільтрували (0,22мкм) і негайно очищали або зберігали при температурі -70°C до очищення.

Очищення шляхом імуоафінного хроматографування

Глікозилований мутант GM-1 очищали на анти-FSH імуоафінній смолі B5 (фірма Serobio), що містила 2,2мг анти-FSH антитіла на 1мл смоли. Колонка OmniFit (1,5см×10см) містила шар об'ємом 10,2мл. Для попереднього врівноваження смоли застосовували 0,1М розчин трис-буфера (pH7,4), що містив 0,5М розчин NaCl. Діалізований неочищений білок завантажували в колонку із розрахунку 1мл/хв. Колонку послідовно промивали (п'ять об'ємів колонки) 0,1М розчином трис-буфера (pH7,4), що містив 0,5М розчин NaCl, 100мг розчином бікарбонату амонію (pH7,6) (п'ять об'ємів колонки) і цільовий білок елюювали (18-20 об'ємів колонки) 1М розчином NH<sub>4</sub>OH. Фракції, що містили

елюйований білок, змішували, нейтралізували льодяною оцтовою кислотою і концентрували шляхом ультрафільтрації у кюветі з перемішуванням (фірма Amicon) із застосуванням мембрани YM 10 (фірма Amicon). Осад на мембрані піддавали діалізу на діалізаторі Pierce Snakeskin зі смугою пропускання 10кДа проти 4х5л води впродовж 24год. Діалізований білок збирали і концентрували на Centrifer YM 10 зі зменшенням об'єму до приблизно одного мл.

#### Визначення характеристик

Середнє виділення очищеного білка шляхом цього одностадійного процесу імуноафінного хроматографування становить 31,4-52,9% із чистотою гетеродимеру від 73,8% до 80,6%, де концентрацію білка визначали шляхом аналізу амінокислотного складу, а формульна маса, за попереднім визначенням, становила 35000 Да за розподілом глікозилованих субодиниць, який визначали за допомогою MALDI-TOF.

Ідентичність білка підтвердили секвенуванням N-кінцевого пептиду. Усі N-кінцеві послідовності, які могли бути ідентифіковані у GM-1, є кінцями  $\alpha$ - або  $\beta$ -субодиниць FSH. Незважаючи на те, що ідентичність однієї смуги білка малого відносного вмісту, виявленої забарвленням сріблом, встановити не вдалось, дані відповідають >80% рівню чистоти субодиниць.

#### Приклад 8

##### Морфологія мутантного FSH

Для визначення розподілу глікозилованих форм очищеного білка, GM-1 і Gonad-F піддавали MALDI-TOF мас-спектрометрії. Мас-спектральний аналіз, зображений на Фіг.4, показує 26% зростання відносного вмісту масових класів, що містять гіперглікозовані форми у GM-1, порівняно з Gonad-F, де вони становлять 36,8% від загального обсягу глікозилованих субодиниць, у протилежність до 29,2% глікозилованих субодиниць у Gonad-F. Різниця MALDI-TOF мас-спектрів Gonad-F і GM-1 відповідає зсувам розподілу середніх молекулярних мас субодиниць і гетеродимерів, виявлених PAGE із забарвленням сріблом та вестерн-блотингом (Фіг.4B).

За даними MALDI-TOF мас-спектрометрії, GM-1, як видається, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, зберігає гетеродимерну конформацию  $\alpha\beta$ , зображену на Фіг.4C, у протилежність до довільного розподілу димерів  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  і  $\beta\beta$ , що спостерігається у Gonad-F. Це дозволяє висунути припущення про менший рівень дисоціації GM-1, порівняно з Gonad-F, за умов піддання проб MALDI-TOF мас-спектрометрії, і відповідає припущенню можливості більш високої термодинамічної або кінетичної стабільності гетеродимеру GM-1. Модель глікозилювання GM-1 обчислювали як біноміальний розподіл довільного ступеню заповнення шести сайтів розгалуженими (з 2 ланцюгами), фукозилованими, дисіалілованими, глікозилованими формами без класів для повністю неглікозованих субодиниць і порівнювали з фактичними мас-спектрами. Результати свідчать про більш високий (0,021 проти 0,0), порівняно з прогнозованим, ступінь заповнення крайнього класу ( $\alpha 0$ ), більш низький (0,095 проти 0,214) ступінь

заповнення ( $\alpha 1$  або  $\beta 0$ ) класу, більш високий (0,516 проти 0,428) ступінь заповнення ( $\alpha 2$  або  $\beta 1$ ) класу, більш високий (0,312 проти 0,285) ступінь заповнення ( $\alpha 3$  або  $\beta 2$ ) класу і більш низький (0,056 проти 0,071) ступінь заповнення  $\beta 3$  класу.

#### Приклад 9

##### Аналіз мутантного FSH

##### In vitro зв'язування мутантного FSH

Ефективність GM-1, партія 1 і GM-1, партія 2 визначали аналізом продукування FSHR-сполученого цАМФ. Вирощували великі партії клітин CHO, які забезпечували рекомбінантне експресування рецептора людського FSH або рецептора людського LH, і руйнували їх азотною кавітацією (20хв. врівноважування до 900фунтів/дюйм<sup>2</sup> (6,2МПа)) з різким зниженням тиску у 0,025M розчині трис-буфера (pH7,4), що містив 0,25M розчин цукрози, 10мм розчин MgCl<sub>2</sub>, 1мм розчин EDTA і одну частину на тисячу суміші інгібітора протеаз фірми Sigma (p8350). Після попереднього просвітлення (10хв×1000хг при температурі 4°C) мембранні фракції осаджували (60хв×100000хг при температурі 4°C) шляхом ультрацентрифугування. Мембранні фракції ресуспендували у зв'язувальному буфері (0,01M розчин трис-буфера (pH7,4), що містив 5мм розчин MgCl<sub>2</sub>), визначали концентрацію білка за допомогою реакції на білок Bradford (фірма BioRad) і зберігали у замороженому стані при температурі -80°C до майбутнього застосування. Конкурентному аналізу, як правило, піддавали 15мкг мембранного білка/лунку, який ніс, відповідно, FSHR або LHR (рецептор лютеїнізуючого гормону).

Зв'язування радіоліганду визначали на 96-лункових планшетах (100мкл/лунка з пробой). Як аналітичний буфер застосовували 0,01M розчин трис-буфера (pH7,4), що містив 5мм розчин MgCl<sub>2</sub>, 0,1% розчин BSA, 0,3нМ розчин <sup>125</sup>I-hCG (для LHR) або 0,4нМ розчин <sup>125</sup>I-FSH (для FSHR). Конкурентний GM-1 розбавляли аналітичним буфером і змішували з лігандом, міченим радіоактивним ізотопом, перед доданням мембран, що несли рецептор. Неспецифічне зв'язування визначали у присутності 500нМ розчину неміченого hCG або FSH. Зв'язувальну реакційну суміш витримували до врівноважування впродовж 90хв. при температурі 37°C зі збовтуванням. Реакцію зв'язування закінчували фільтрацією через мембрану з низьким зв'язуванням білка (дурапор) (фірма Millipore Multiscreen), попередньо інкубовану у аналітичному буфері. Лунки фільтра тричі промивали зв'язувальним буфером, що мав температуру танення льоду (аналітичний буфер без сироваткового альбуміну великої рогатої худоби), сушили і вирізали. Рівень зв'язаної радіоактивності визначали за допомогою гамма-лічильника HP Cobra II із застосуванням попередньо запрограмованого вікна детектування, специфічного для випромінювання <sup>125</sup>I. Дані аналізували за допомогою односайтової моделі і програми Graph Pad Prism.

##### In vitro функціонування мутантного FSH

Функцію GM-1, партія 1 і GM-1, партія 2 визначали за допомогою дозозалежних кривих продукування цАМФ у клітинах CHO, трансфікованих рецептором гонадотропіну, які описувались вище.

Кваліфікаційні дані щодо виділення двома партіями згаданого білка наведені у поданій нижче Таблиці 3:

Таблиця 3

In vitro функціональні та рецепторзв'язувальні характеристики GM-1

Білок/Партія	FSHR $EC_{50}$	FSHR $K_i$
GM-1/1	$61,2 \pm 4,5 \times 10^{-12} M$	$1,9 \pm 0,3 \times 10^{-9} M$
GM-1/2	$20,9 \pm 2,0 \times 10^{-12} M$	$2,3 \pm 0,6 \times 10^{-9} M$

#### Приклад 10

##### Стабільність мутантного FSH

Стабільність біоактивності GM-1 досліджували впродовж трьох місяців із застосуванням стерильної аліквоти GM-1, яку впродовж трьох місяців витримували при температурі 4°C. GM-1 цієї аліквоти перевіряли на продукування FSHR-сполученого цАМФ у час нуль днів, через сім днів, через 32 дні і через 91 день.  $EC_{50}$  GM-1 впродовж 91-денного збереження при температурі 4°C змінилась менше ніж у два рази. Ці дані вказують на те, що біоактивність GM-1, який зберігається при температурі 4°C, залишається стабільною до трьох місяців.

#### Приклад 11

##### Активність мутантного FSH

На Фіг.5 зображені характеристики GM-1, визначені на моделі дводенної індукції овуляції у нестатевозрілих пацюків. При введенні одноразовою дозою рекомбінантний hFSH не викликав овуляторної реакції, у той час як GM-1 овуляторну реакцію викликав. Більше того, характеристики GM-1, визначені аналізом приросту маси яєчників за Стілменом-Полі (Steelman-Pohley), були порівнянними з відповідними характеристиками Gonad-F (дані не наведені).

Дози, випробувані на Фіг.5, відповідають 6, 12 і 24МОд FSH. При перевірці FSH-CTP (Organon 36286) на цій моделі у одноразовій дозі (10МОд) за схемою введення трьох доз (4×25%, 2×50% і 1×100%), середня кількість яйцеклітин на тварину становила  $16,3 \pm 3,8$ ,  $19,1 \pm 3,6$  і  $21,5 \pm 3,9$ , відповідно (дані не наведені). За вищенаведеними даними, GM-1 у дозі 12МОд (1×100%) викликав середню овуляторну реакцію  $9,4 \pm 2,1$  яйцеклітин на тварину ( $6,8 \pm 1,6$  яйцеклітин на тварину при 6МОд і  $14,6 \pm 3,6$  яйцеклітин на тварину при 24МОд). Дані вказують на можливість того, що GM-1 може виявитись більш придатним "моноовуляторним" засобом або таким, що краще контролюється змінами схеми введення лікарського засобу.

### ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Garone, Louise  
Arkinstall, Steven  
Brondyk, William  
Campbell, Robert  
Jiang, Xuliang  
McKenna, Sean  
Tepper, Mark

<120> Мутант глікозилювання FSH

<130> 05558.00003.PZUS00

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

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

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

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

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

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

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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu  
1 5 10 15

Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys  
20 25 30

Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln  
35 40 45

Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro  
50 55 60

Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr  
65 70 75 80

Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val  
85 90 95

Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu  
 100 105 110

<210> 3

<211> 92

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> мутант альфа-субодиниці H83N

<400> 3

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

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> мутант бета-субодиниці E55N/V57T

<400> 4

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu  
 1 5 10 15

Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys  
 20 25 30

Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln  
 35 40 45

Lys Thr Cys Thr Phe Lys Asn Leu Thr Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro  
50 55 60

Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr  
65 70 75 80

Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val  
85 90 95

Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu  
100 105 110

<210> 5

<211> 26

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> мутагенез, олиго 1 для альфа-H83N

<400> 5

cacacggcgt gcaactgcag tacttg 26

<210> 6

<211> 26

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> мутагенез, олиго 2 для альфа-H83N

<400> 6

caagtactgc agttgcacgc cgtgtg 26

<210> 7

<211> 49

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> мутагенез, олиго 1 для бета-E55N/V57T

<400> 7

gcactctcac tgttcatat gtcaggttct tgaaggtaca tgtttctg 49





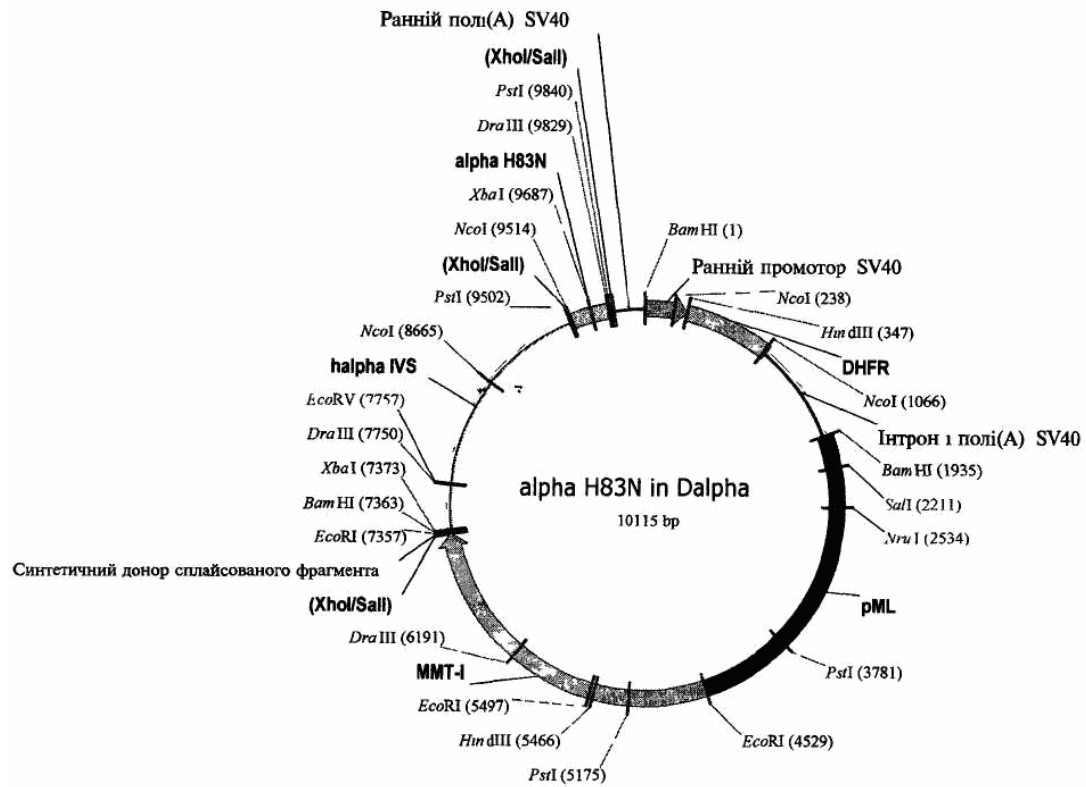
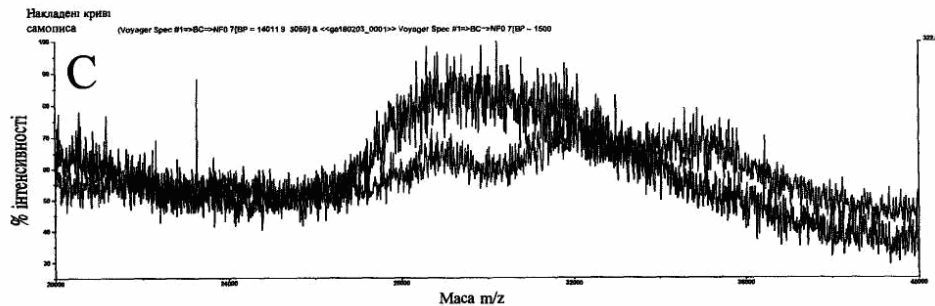
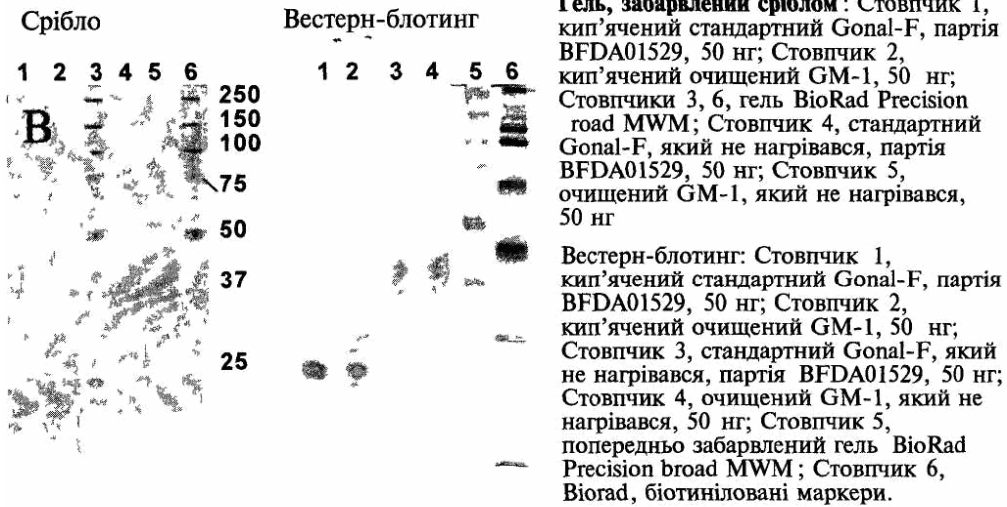
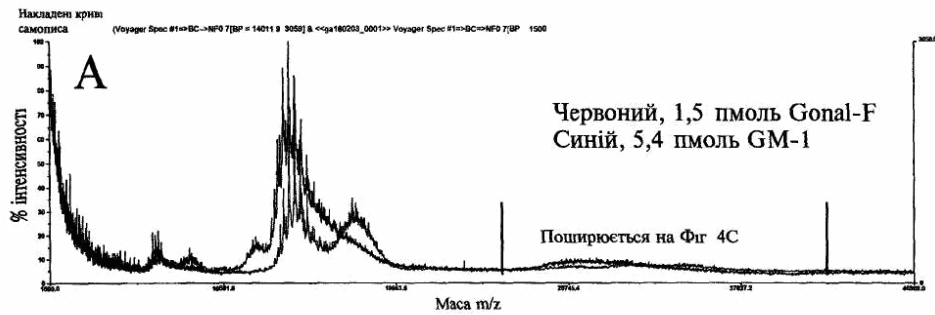
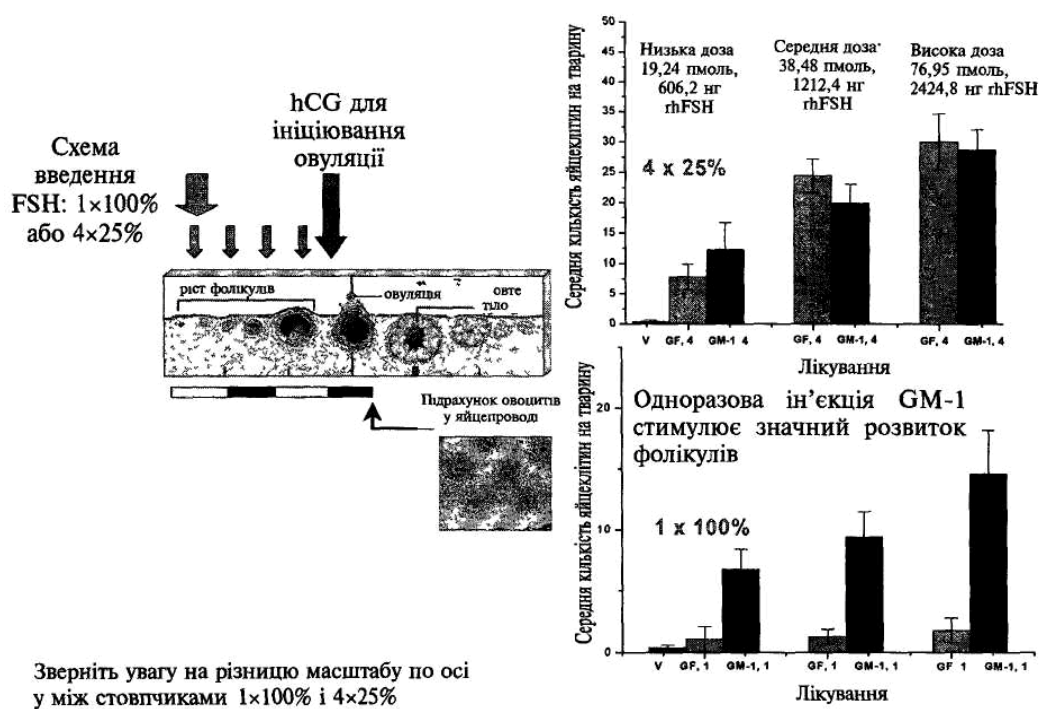


Fig.3



Фіг.4



Фіг.5