

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4719357号
(P4719357)

(45) 発行日 平成23年7月6日(2011.7.6)

(24) 登録日 平成23年4月8日(2011.4.8)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 38/24 (2006.01)	A 6 1 K 37/38 Z N A
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08

請求項の数 10 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2000-560906 (P2000-560906)	(73) 特許権者	504238862
(86) (22) 出願日	平成11年7月15日 (1999.7.15)		アレス トレイディング ソシエテ アノ ニム
(65) 公表番号	特表2002-521342 (P2002-521342A)		スイス ツェーハー 1 1 7 0 オーボンヌ ゾーヌ アンデュストリエル ド ルー リエッタ
(43) 公表日	平成14年7月16日 (2002.7.16)	(74) 代理人	100068526
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/016031		弁理士 田村 恭生
(87) 国際公開番号	W02000/004913	(74) 代理人	100100158
(87) 国際公開日	平成12年2月3日 (2000.2.3)		弁理士 鯨島 睦
審査請求日	平成18年7月4日 (2006.7.4)	(74) 代理人	100126778
(31) 優先権主張番号	60/093, 906		弁理士 品川 永敏
(32) 優先日	平成10年7月23日 (1998.7.23)	(74) 代理人	100150500
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森本 靖
(31) 優先権主張番号	60/094, 611		
(32) 優先日	平成10年7月30日 (1998.7.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F S H及びF S H変異体の製剤、製品及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水性希釈剤中に、及びサブユニットを含むF S H又はF S H変異体（該F S H変異体はF S Hのカルボキシ末端欠失をもつサブユニットを有する）、並びにm-クレゾール、ベンジルアルコール、およびそれらの混合物よりなる群から選択される保存剤を含み、単一の溶液バイアルの形態であることを特徴とする、ヒト治療用の多数回使用製剤。

【請求項 2】

F S H又はF S H変異体の濃度が $1.0 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \text{mg}/\text{ml}$ であり、該製剤が更に等張剤および生理学的に受容できる緩衝剤を含む請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 3】

F S H又はF S H変異体の濃度が $5.0 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 2 \text{mg}/\text{ml}$ であり、等張剤が塩化ナトリウムであり、生理学的に受容できる緩衝剤がリン酸塩緩衝剤である請求項 2 に記載の製剤。

【請求項 4】

F S H又はF S H変異体が以下のものよりなる群から選択される少なくとも1つの化合物である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の製剤。

【化 1】

(a) : α -サブユニット : (配列番号 1)FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKN
ITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCYHKS β -サブユニット : (配列番号 2)RSCELTNITITVEKEECGFCISINTTWCAGYCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCSKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFREIKE(b) : α -サブユニット : (配列番号 3)FPDGEFTTQDCPECKLRENKYFFKLGVPPIYQCKGCCFSRAYPTPARSRKTMLVPKN
ITSESTCCVAKAFIRVTVMGNIKLENHTQCYCSTCYHHKI β -サブユニット : (配列番号 4)NSCELTNITIAVEKEGCGFCITINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATAACHGKCNDSSTDCTVRGLGPSYCSFGDMKE(c) : α -サブユニット : (配列番号 5)APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS β -サブユニット : (配列番号 6)NSCELTNITIAIEKEEFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMKE(d) : α -サブユニット : (配列番号 7)FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKLGAPIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKN
ITSEATCCVAKAFTKATVMGNARVENHTECHCSTCYHKS β -サブユニット : (配列番号 8)NSCELTNITITVEKEECNFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFSEMKE

10

20

30

【化 2】

(e) : α -サブユニット : (配列番号9)FPDGEFTMQGCECKLKENKYFSKPDAPYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMMLVPKN
ITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCYHKS β -サブユニット : (配列番号10)RSCELTNITITVEKEECSFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKACTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFS DIRE(f) : α -サブユニット : (配列番号5)APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS β -サブユニット : (配列番号11)NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGE

10

(g) : α -サブユニット : (配列番号5)APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS β -サブユニット : (配列番号12)NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEM

20

(h) : α -サブユニット : (配列番号5)APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS β -サブユニット : (配列番号13)NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMK

30

【請求項 5】

F S H 変異体を含む請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 6】

化合物 :

(f) : α -サブユニット : (配列番号5)APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS β -サブユニット : (配列番号11)NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKE
LVYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGE.

40

である F S H 変異体を含む請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 7】

ヒト F S H :

(c) : α -サブユニット: (配列番号5)

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

β -サブユニット: (配列番号6)

NSCELTNITIAIEKEECRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKE
LVYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMK
E.

10

を含む請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 8】

不妊症を処置するための請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の多数回使用製剤を製造する方法であって、FSH又はFSH変異体(該FSH変異体はFSHのカルボキシ末端欠失をもつサブユニットを有する)、及びm-クレゾール、ベンジルアルコール、およびそれらの混合物よりなる群から選択される保存剤を水性希釈剤中で混合することを特徴とする方法。

【請求項 10】

包装材料、および請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の製剤を含むバイアルからなるヒトの医薬用途の製品であって、該包装材料は、該溶液が24時間以上の期間にわたって保持され得ることを示すラベルを含む製品。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

クロスレファレンス

本出願は1998年7月23日に出願された米国仮出願60/093906号、1998年7月30日に提出された60/094611号、1998年7月31日に提出された60/094767号、1998年9月1日に提出された60/098711号、1998年9月17日に提出された60/100696号の利益を請求し、それらの出願のそれぞれは全体が本発明細書の一部を構成する。

30

【0002】

発明の分野

本発明は、濾胞刺激ホルモン(FSH)または当業界で知られた濾胞刺激ホルモン変異体(FSH変異体)の生成物を用いる新規な製剤、製品および方法に関する。本発明は、以前には治療用に存在しなかった、有益な、多数回使用(multi-use)の安定な溶液および製剤並びに医薬製品をも提供する。これらの製剤および製品は処置の期間にわたってFSHまたはFSH変異体の血清レベルを増加させるための治療レジメに特に有用である。従って、本発明は、特にFSHまたはFSH変異体を含む、便利で安定な保存溶液、製剤および製品の必要性および不妊症の治療におけるこれらの製剤および製品を用いる必要性を満たす。

40

【0003】

発明の背景

FSHは不妊症で使用される。患者は毎日または1日2回筋肉内(「IM」)または皮下(「SC」)注射により投与され、用量は反応に対し調節され、通常75~300IU/日の範囲である。FSHの短い半減期のため、患者はその卵巣または精巣の反応に応じて、数日に渡って1日一度または二度注射されねばならない。FSHまたはFSH変異体より安定な製剤は治療用途のための改良を提供するであろう。

【0004】

FSHは、IMまたはSC以外の承認された投与様式により以前には投与されなかったが、他の治療タンパク質は長い日数に渡って投与されることが期待されている。長期にわた

50

る正規のSCまたはIM注射、経皮パッチ、移植、浸透ポンプ、マイクロポンプ、カートリッジ、肺運搬システム等を含む様々な運搬方法は、例えば、不愉快を減少させ、または投与を容易にする患者のコンプライアンスの促進に有用であろう。これらの長期の治療レジメは一般に安定な溶液または製剤中の保存剤を必要とする。

一態様において保存剤は、製剤中の有害な微生物の混入を防止し、または最小にする。従来の非タンパク質治療剤の場合、クロロヘキシジン、フェノール、ベンジルアルコール、m-クレゾール、o-クレゾール、p-クレゾール、クロロクレゾール、フェニルマーキュリックナイトレート、チメラロサル、安息香酸、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デハイドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサルおよびそれらの様々な混合物等の抗微生物性の保存剤が、
10
貯蔵期間および/または多数回使用レジメの間の無菌性を保証するため液体製剤にしばしば加えられる（Akers, MJ, Pharm. Technol. 8, 36-46, 1984; Gennaro, AR., Romington's Pharmaceutical Sciences, 17版, Mack, Easton, PA., 1278-1280, 1985）。しかしながら、これらの保存剤はタンパク質の安定性に有害である傾向がある。例えば、非常に有効な保存剤であるm-クレゾールは、一般にタンパク質と結合し、変成させることが報告されている（Development of Pharmaceutical Parenteral Dosage Forms, Bontempo編, Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 118-119頁, 1997）。それはヒト成長ホルモン等のホルモンの溶液安定性についての特別の困難をも示す（Maa YF および Hsu C, International Journal of Pharmaceutics, 140, 155-168頁, 1996）。

【 0 0 0 5 】

FSHはヘテロダイマーのグリコプロテインホルモンファミリーのメンバーであり、そのファミリーには甲状腺刺激ホルモン（TSH）、織毛性性腺刺激ホルモン（CG）、および黄体形成ホルモン（LH）が含まれる（Pierce JG および Parsons TF, Annu. Rev. Biochem., 50, 465-495, 1981; Baenziger および Green, Biochim. Biophys. Acta, 947, 287-306, 1988）。このファミリーのメンバーは、一般には2つの異なるサブユニット間の非共有結合的相互作用により結合しているヘテロダイマーである。ヒトのFSH（hFSH）ヘテロダイマーは、(i)成熟の92のアミノ酸のサブユニット（これは他のヒトのファミリーメンバー、すなわち織毛性性腺刺激ホルモン（CG）、黄体形成ホルモン（LH）および甲状腺刺激ホルモン（TSH）に共通である）；および(ii)FSHに独自の成熟の111のアミノ酸のサブユニットからなる（Shome 等, J. Clin. Endocrinol. Metab., 39: 187-205(1974); Shome 等, J. Prot. Chem., 7: 325-339, 1988）。その
20
およびサブユニットは非共有結合的に結合し、従って、その結合はタンパク質の脱安定化剤により感受性である。

【 0 0 0 6 】

天然のヒトおよび他の哺乳動物のFSHの および アミノ酸配列並びにこれらの配列のある変異体は1982年前に当業界によく知られており、哺乳動物細胞における活性なヒトおよび他の哺乳動物のFSHのクローニングおよび発現は1985年前に成し遂げられた。その共通のゴナドトロピン（またはFSH）サブユニットは精製されたタンパク質から配列決定され（Bellisario 等, J. Biol. Chem., 248: 6796(1973); Morgan 等, J. Biol. Chem., 250: 5247(1975)）、後者はクローニングされ、発現された（Fiddes 等, Nature 281: 351(1979); Nature 286: 684(1981); J. Molec. Appl. Genet., 1: 3-18(1981)）。FSH サブユニットは精製されたタンパク質から配列決定された（Shome等, J. Clin. Endocrinol. Metab., 39: 187(1974); Saxena等, J. Biol. Chem. 251: 993(1976); Sairam 等, Biochem. J. 197: 541(1981); Fujiki, Biochem. Biophys. Acta, 624: 428(1980)）。組込み遺伝学はヒトCGの組換的発現を報告し（Biotechnology Newswatch（3頁、1983年6月20日）；Chemical and Engineering News 61: 41(1983年11月21日）；Genetic Technology News 3: 9(1983年12月12日）；および活性形（Biotechnology Newswatch, 1984年1月16日））、彼らはFSHのクローニングの成功（Genetic Engineering Newsletter 4: 4(1984年8月10日)）および哺乳動物細胞で製造した活性形の組換えFSH（DNA 4: 76、1985年1月16日発行）をも報告した。Amgen はCHO細胞中の活性なウシの
40
50

LHの発現をも報告した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7280(1985年11月))。

【0007】

ヘテロダイマーのタンパク質ホルモンが生理学的または酸性条件下に解離し得ることを示すかなりな証拠が文献にある (Ryan, R. J. 等, Recent Prog. Hormone Res., 26: 105-137, 1970; Strickland, TW およびPuett, D.J., J. Biol. Chem., 257: 2954-2960, 1982; Reichert LE およびRamsey RB, J. Biol. Chem., 250: 3034-3040, 1975)。無傷のダイマーが生物学活性に必須であり、FSHの分泌に不可欠である (Baenziger JU およびGreen ED, Biochem. Biophys. Acta, 947: 287-306, 1988; Corless 等, J. Cell Biol., 104: 1173-1181, 1987)。FSHの不安定性に対抗する試みには、一本鎖分子を製造し、1つの安定な分子中に2つのサブユニットを導入する試み、および更なるジサルファイド結合を作り、2つのサブユニット間の相互作用を安定化させる試みがある (Sughara T.等, J. Biol. Chem., 271: 10445-10448, 1996; Heikoop J. C. 等, Nature Biotech, 15: 658-62, 1997)。

10

【0008】

Donaldson (米国特許第5,162,306号)はFSHおよびLHを含む獣医組成物に関する。これらの組成物はチモール(5-メチル-2(1-メチルエチル)フェノール)中で安定であることが示されている。Donaldsonは、チモールは、開示されたSUPEROV製剤中でグリコプロテインホルモンを損なわないであろう(米国特許第5,162,306号)U.S.P. XXIの保存剤のリスト中の1つの保存剤であることを報告する。

【0009】

閉経後の女性からの尿由来のFSH(hMG. Organonにより Menotropin または Humagon として、および Serono により urofollitropin または Metrodin として市販)が、Assisted Reproductive Technology (ART)プログラムに参加した排卵患者における多数の小胞の発育のため、および無排卵の不妊患者における排卵の誘発のため30年以上の間注射物として用いられている (Fauser BCJM および Van Heusden AM, Endocrine Rev., 18, 71-106, 1997)。より最近、CHO細胞由来の組換えヒトFSH(rhFSH)が入手可能となった (Keene J. L. 等, J. Biol. Chem., 264: 4769-4752, 1989; Loumaye E. 等, Human Reprod. Update, 1: 188-1999, 1995; Olijve W. 等, Mol. Hum. Reprod., 2: 361-369, 1996)。

20

【0010】

治療用FSH(hMGまたはrhFSH)は、75IU/バイアルおよび150IU/バイアルのアンブル中の凍結乾燥した形で現在提供されており、2~25で貯蔵する場合、1.5年~2年の貯蔵寿命を有する。75IUまたは150IUの出発用量を用いる毎日の注射によって、単一用量投与後の濃度より1.5~2.5倍大きい定常状態濃度に到達するため、10日までの間注射することが推奨されている。この投与レジメは、FSHが閾値機構により作用するので、治療的有効性に必要な濃度を生じる (Schoemaker J. 等, Ann. NY. Acad. Sci., 687: 296-299, 1933)。患者の反応によって、FSHの容量を増加させる3サイクルまでの治療を用いることができる。患者およびパートナーは、日ベースで、希釈剤を用いて凍結乾燥した物の新しいバイアルを再構築し、再構築後直ちにそれを投与する必要がある (Serono Laboratories, Inc., Randolph, MA による皮下注射用の Fertinex (注射用ウロホリトロピン、精製)について1996年1月に公開されたパッケージインサート N1700101A)。使用されなかった物質は捨てられる。

30

40

【0011】

従って、FSHまたはFSH変異体タンパク質の安定な製剤および保存製剤、並びに関連する製品の開発により患者のコンプライアンスを増加させる当業界での必要が残っている。これらの安定な製品は、FSHによる妊娠治療等の、長期間の処置が必要であるか、または勧められる場合特に必要である。24時間またはそれ以上の期間にわたる複数回使用のために用いることができ、承認されるFSHまたはFSH変異体製品を提供する必要もある。本発明は、24時間またはそれ以上の期間にわたる使用のために用いることもでき、承認される、FSHおよびFSH変異体の新規な安定な溶液および製剤並びに保存溶液

50

および製剤、並びに関連する製品をも提供する。

【0012】

発明の概要

本発明は、F S HまたはF S H変異体の新規な製剤、それらの製造、妊娠障害の処置における医薬的または獣医的使用、および関連する製品を提供する。

一態様において、本発明は、F S HまたはF S H変異体、および少なくとも一つのフェノール、m - クレゾール、p - クレゾール、o - クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサルよりなる群から選択される保存剤又はそれらの混合物を水性の希釈剤中に含む保存溶液および製剤を提供する。場合により、保存溶液または製剤は選択された緩衝剤および塩を含む。

10

【0013】

他の態様において、本発明は、F S HまたはF S H変異体および選択した緩衝剤を含む安定な溶液および製剤を提供し、該緩衝剤は食塩または選択された塩と共に、リン酸塩緩衝剤である。

【0014】

他の態様において、本発明は不妊症の処置方法を提供し、その方法は、その必要のある患者に、フェノール、m - クレゾール、p - クレゾール、o - クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムよりなる群から選択される少なくとも一つの保存剤、少なくとも一つのそれらの誘導體、またはそれらの混合物を含む溶液中のF S HまたはF S H変異体の変異体の保存溶液を投与することを含む。

20

【0015】

他の態様では、本発明は不妊症の処置方法を提供し、その方法は安定溶液中のF S HまたはF S H変異体の安定製剤をその必要のある患者に投与することを含み、その安定溶液は好ましくは、食塩または選択された塩を有するリン酸塩緩衝液である。

【0016】

本発明の他の態様では、F S HまたはF S H変異体の少なくとも一つの多数回投与(multi-dose)製剤を製造する方法を提供し、その方法はF S HまたはF S H変異体、およびフェノール、m - クレゾール、p - クレゾール、o - クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサルよりなる群から選択される少なくとも一つの保存剤、それらの誘導體、またはそれらの混合物を水性希釈剤中で混合することを含む。

30

【0017】

本発明の他の態様は、F S HまたはF S H変異体の少なくとも一つの安定な製剤を製造する方法を提供し、その方法は安定な溶液または製剤中でF S HまたはF S H変異体を混合することを含み、好ましくはその安定な溶液または製剤は食塩または選択された塩を有するリン酸塩緩衝液である。

40

【0018】

本発明のヒトの医薬用途のための製品をも提供し、その製品は包装材料、並びにF S HまたはF S H変異体および保存剤の溶液を含むバイアルを含み、該包装材料は、そのような溶液が使用のために24時間以上の期間にわたって保持され得るということを示すラベルを含む。本発明は更にヒトの医薬用途のための製品を提供し、その製品は包装材料、凍結乾燥したF S HまたはF S H変異体を含む第1バイアル、および保存剤を含む第2バイアルを含み、該包装材料は、本明細書で更に記載する条件下での使用のため24時間以上の期間保ち得る溶液を形成するため、保存剤溶液中でF S HまたはF S H変異体を再構築することを患者に指示することを示すラベルを含む。

【0019】

50

本発明はヒトの医薬用途のための製品をも提供し、その製品は、包装材料並びに F S H または F S H 変異体の溶液および安定な溶液または製剤を含むバイアルを含み、その安定な溶液または製剤は好ましくは食塩または選択された塩を有するリン酸塩緩衝液であり、該包装材料はそのような溶液は 2 4 時間以上使用のため保ち得ることを示すラベルを含む。

【 0 0 2 0 】

本発明は更にヒトの医薬用途のための製品をも提供し、その製品は包装材料、凍結乾燥した F S H または F S H 変異体を含む第 1 バイアル、および保存剤を含む第 2 バイアルを含み、該包装材料は、患者に F S H または F S H 変異体を保存剤溶液中で再構築し、本明細書で更に記載する条件下で使用のため 2 4 時間以上の期間にわたって保ち得る溶液を形成することを指示するラベルを含む。

10

【 0 0 2 1 】

本発明はヒトの医薬用途のための製品をも提供し、その製品は、包装材料、及び凍結乾燥した F S H または F S H 変異体及び好ましくは食塩または選択された塩を有するリン酸塩緩衝液である第 2 の安定溶液または製剤を含むバイアルを含み、その包装材料は患者がその安定な溶液中で F S H または F S H 変異体を再構築し、本明細書で更に記載する条件下で使用のため 2 4 時間以上の期間にわたって保ち得る溶液を形成することを指示するラベルを含む。

【 0 0 2 2 】

発明の詳細な記述

本発明は一態様において、長期間の、または多数回使用のための、予期せぬほど安定な、そして / または適した、組換えおよび / または精製または単離した F S H または F S H 変異体の溶液および製剤、製品、使用または処置方法および医薬製品を提供する。

20

【 0 0 2 3 】

有用性

改良された、またはより適した性質または安定性を有する、これらの F S H または F S H 変異体の溶液および製剤、製品、F S H または F S H 変異体を用いる使用および処置方法は、女性および / または男性の不妊治療に有用である。これらの製剤、製品は、注射による運搬、および別の運搬システム、例えば (限定するものではないが) 鼻の、肺の、経粘膜の、経皮の、経口の、皮下の、筋肉内の、または非経口持続放出、乾燥の、または液体製剤での使用にさらに適している。その F S H または F S H 変異体の溶液および製剤は、単独でか少なくとも一つの更なるゴナドトロピンと組合せて、活性または安定性の損失を防止するか減少させることにより、または投与の有効性または望ましさのいずれかの側面を改良することにより、例えば様式、頻度、用量、快適さ、使用の容易性、インビトロおよびインビボの生物学的活性等の少なくとも一つにより、公知の商業的製品に比べてインビボの力価を増加させ得る。

30

【 0 0 2 4 】

引用

本明細書で引用するすべて刊行物および特許は、それらが本発明時、または引用した関連特許出願の出願時における技術水準を示すので、本明細書の一部を構成する。以下の文献は全体が本明細書の一部を構成する : Ausbel 等編, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY (1987-1989); Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2版, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow および Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan 等編, Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons, N.Y.(1994-1999); Colligan 等編, Current Protocols in Protein Science, John Wiley and Sons, N.Y.(1998-1999)。

40

【 0 0 2 5 】

定義

濾胞刺激ホルモン「 F S H 」 (組換的に製造されたものであろうと単離されたものであろうと)、および濾胞刺激ホルモン変異体は当業界でよく知られている。本明細書で用いる「 F S H 」は完全長の成熟タンパク質として製造された F S H を指し、組換的に製造さ

50

れたかまたはヒトの源から単離されたかにかかわらず、ヒトの F S H すなわち「h F S H」を含むが、これに限定されない (Shome B. 等, J. Prot. Chem., 7: 325-339, 1988; Saxena B.B. および Rathnam P., J. Biol. Chem., 251: 993-1005, 1976; Watkins 等, DNA, 6: 205-212, 1987; Shome B. および Parlow A.F., J. Clin. Endocrinol. Metab., 39(1): 203-205, 1974; および Beck 等, DNA, 4: 76, 1985; 米国特許第5,405,945号および同第5,639,640号を参照。これらは本明細書の一部を構成する)。ヒト F S H サブユニットのタンパク質配列を配列番号 5 に示し、ヒト F S H サブユニットのタンパク質配列を配列番号 6 に示す。更に、様々な F S H 変異体が当業界で知られ、または理解されている (Shome, J. Clin. Endocrin. Metab, 39: 187 (1974); Saxena, J. Biol. Chem., 251(4): 993-1005 (1976); 1978; Sairam 等, Biochem. J., 197: 541 (1981); Closset . Eur. J. Biochem. 86: 115-120; Fujiki, J. Biol. Chem., 253: 5363-5368 (1978); Sairam, Biochem. J., 197: 541-552 (1981) を参照。それぞれは独立に本明細書の一部を構成する)。先行技術の F S H サブユニットは、Saxena 配列、そしてまた、(a)進化的に保存された配列、または(b)周知の確認された配列決定の誤りについての Sairam の議論に関連する配列のジーンズを含む。更に、当業者は、先行技術が同定したアミノ酸の(i)化学的に類似のアミノ酸、または(ii)進化的に保存されたアミノ酸により置換は、このように改変された h F S H サブユニットからなる F S H ヘテロダイマーの生物学的活性に認知できる影響を有しないであろうことを認識する。

【 0 0 2 6 】

特に、Saxena h F S H 配列についての Sairam's の注釈、そしてまた機能的な F S H 分子間で同定されるアミノ酸置換についての彼の議論は先行技術における F S H 鎖配列のジーンズを定義する。より具体的には、1981年の Sairam の刊行物は、Saxena 等、Shome 等、Closset 等および Fujiki 等を引用して保存されたアミノ酸配列を同定する。Sairam, Biochem J. 197: 541, 551 (1981)。先行技術は、(1) Saxena の F S H 鎖配列の Shome のそれに対する優先性を明白にし、(2)カルボキシ末端の不均一性 (heterogeneity) の問題に向け、(3) 該ホルモンの活性に必須でない種間の相異により影響される分子の部分を述べ、(4)種間並びにその3つのヒトグリコプロテインホルモン、F S H、L H および T S H の 鎖間の相同性から引き出されたガイダンスを強調する。

【 0 0 2 7 】

C 末端の不均一性はブタの F S H のそれを除いてすべての公開された配列について報告されている。ブタの F S H ではグルタミン酸が唯一の C 末端残基であった。位置 27 について、この位置に Saxena は一つのトリプトファン残基を割り当て、すべての先行技術の種類の中で、F S H - B についての位置 24 でのトリプトファンについて証明された進化的な保存に支持を見出した。位置 44 および 46 について、位置 44 で残基はリジンではなくアルギニンであるべきであり、位置 46 ではアルギニンではなくリジンであるべきことを Saxena は示す。豚、馬および羊の配列も位置 44 でアルギニンを保存する進化的圧力を反映する。3つの位置 21、21 および 44 での変化は、構造的に保存的な、または進化的保存的(「ホモロガス」)置換を含み、そのそれぞれは生活性を有する。

【 0 0 2 8 】

Sairam, Shome および Closset の文献のそれぞれは位置 21 - 22 における残基イソロイシン、セリンを開示し、一方、Saxena はロイシン、スレオニンを開示し、Fujiki はこれらの位置でイソロイシン、スレオニンを開示する。これらの開示のそれぞれは進化的に保存的な置換であるのみならず、構造的に保存的な置換でもある。Sairam, Shome, Closset および Fujiki により開示されたアスパラギン酸、および Saxena, Closset および Sairam により開示されたアスパラギン間の、位置 41 における変化は2つの進化的に保存された残基を含み、そのそれぞれは生活性を提供する。保存的な置換および進化的に保存された置換についてのこれらの開示は、当業者が h F S H - B 鎖ジーンズ内で F S H 鎖バリエーションを区別するためのガイドを与える。

【 0 0 2 9 】

本明細書でいう F S H 変異体は、配列番号 6 の完全長成熟タンパク質より短い サブユニ

10

20

30

40

50

ットのカルボキシ末端削除物である。鎖のカルボキシ末端バリエーションは公知のサブユニットとダイマーを形成し、F S H変異体ヘテロダイマーを形成することが理解される。更に、多くの種のF S Hが知られており、以下のものを含むがこれらに限定されない。ブタのF S H（配列番号7および8）、ウマのF S H（配列番号3および4）、ウシのF S H（配列番号1および2）、ヒツジのF S H（配列番号9および10）、および Combarnous Y., Endocrine Reviews, 13 (4), 670-691 (1992)（本明細書の一部を構成する）に引用されたもの。本明細書に更に提供される与えられた種から、他のカルボキシ末端変異体を当業者が作り、製造することができるであろうことが理解される。

【0030】

F S HヘテロダイマーまたはF S H変異体ヘテロダイマーは、組換えなどの適当な方法により、場合に応じ天然源からの単離または精製により、若しくは化学的合成により、またはそれらの組合せにより製造できる。1つのサブユニットと1つのサブユニットを含むF S HヘテロダイマーおよびF S H変異体ヘテロダイマーの非限定的な例には以下のものを含むが、それらに限定されない。

【化7】

(a) : α -サブユニット：(配列番号1)

FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKN
ITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCYHKS

β -サブユニット：(配列番号2)

RSCELTNITITVEKEECGFCISINTTWCAGYCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCSKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFREIKE

(b) : α -サブユニット：(配列番号3)

FPDGEFTTQDCPECKLRENKYFFKLGVPYIYQCKGCCFSRAYPTPARSRKTMLVPKN
ITSESTCCVAKAFIRVTVMGNIKLENHTQCYCSTCYHHKI

β -サブユニット：(配列番号4)

NSCELTNITIAVEKEGCGFCITINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATACHCGKCNDSSTDCTVRGLGPSYCSFGDMKE

(c) : α -サブユニット：(配列番号5)

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

β -サブユニット：(配列番号6)

NSCELTNITIAIEKEECRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMKE

(d) : α -サブユニット：(配列番号7)

FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKLGAPIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKN
ITSEATCCVAKAFTKATVMGNARVENHTECHCSTCYHKS

β -サブユニット：(配列番号8)

NSCELTNITITVEKEECNFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFSEMKE

【化8】

(e) : α -サブユニット : (配列番号9)

FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKN
ITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号10)

RSCELTNITITVEKEECSFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKACTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCGKCDRDSTDCTVRGLGPSYCSFSDIRE

(f) : α -サブユニット : (配列番号5)

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号11)

NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGE

(g) : α -サブユニット : (配列番号5)

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号12)

NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEM

(h) : α -サブユニット : (配列番号5)

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号13)

NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMK

【0031】

用語「組換」とは、組換えDNA技術の使用によるF S HまたはF S H変異体の組換的製造を言う(例えば、Boine等, Seminars in Reproductive Endocrinology 10, 45-50, 1992 および本明細書で一般的に更に与えられ、例示されるもの)。ゲノムおよびcDNAクローンの配列は、数種のおよびサブユニットについて知られている(Fiddes, J.C.等, J. of Mol. and Applied Genetics, 1: 3-18 (1981); Esch F. S.等, DNA 5: 363-369 (1986); Watkins P. C.等, DNA 6: 205-212 (1987); Hirai T.等, J. Mol. Endocrinol. 5: 147-158 (1990); Maurer, R. A.等, Mol. Endocrinol. 1: 717-723 (1987); Guzman K.等, DNA Cell Biol. 10: 593-601 (1991); Kumar T.R.等, Gene. 1995年12月12日; 166 (2): 335-6; Kumar T.R.等, Gene. 1995年12月12日; 166 (2): 333-4、それぞれの文献は本明細書の一部を構成する)。およびサブユニットについてのDNA配列のいくつかを配列番号14-20として提供する。さらに、1つのベクターに、または別のプロモーターを有する、各ユニットについての2つのベクターに提供された、およびサブユニットをコードDNA配列で真核生物細胞を形質転換するか、または当業界で理解される他の方法により無傷のダイマーを提供することができる。

【0032】

本発明に従って用いるF S HまたはF S H変異体は、哺乳動物細胞またはトランスジェニ

10

20

30

40

50

ック調製物を含む組換的手段により製造されるばかりではなく、尿源等の他の生物学的源から精製してもよい。受容できる方法は、Hakola, K., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 127: 59-69, 1997; Keene 等, *J. Biol. Chem.*, 264: 4769-4775, 1989; Cerpa-Poljak 等, *Endocrinology*, 132: 351-356, 1993; Dias 等, *J. Biol. Chem.*, 269: 25289-25294, 1994; Flack 等, *J. Biol. Chem.*, 269: 14015-14020, 1994; および Valove 等, *Endocrinology*, 135: 2657-2661, 1994 並びに米国特許第3,119,740号に記載されたものを含み、これら文献は本明細書の一部を構成する。

【0033】

ペプチドまたはタンパク質に関して用いる「実質的に純粋」とは、他のタンパク質分子を含む他の細胞性および非細胞性分子からの分離を意味する。実質的に純粋な調製物は、およそ少なくとも85%純粋；好ましくはおよそ少なくとも95%純粋である。「実質的に純粋」なタンパク質は、例えば高速液体クロマトグラフィ（HPLC）を含む当業者に周知の様々な技術により製造することができる。

10

【0034】

「投与する」という語は、病気または状態を処置するために本発明の製剤をその必要のある患者の身体に導入することを意味する。

【0035】

「患者」という用語は、病気または状態について処置される哺乳動物を意味する。患者は、これに限るものではないが、次の起源のものである；人、羊、豚、馬、牛、ウサギ等。

【0036】

「アルキルパラベン」という用語は、抗微生物剤として有用な生理学的に許容されるC1-C6アルキルパラベンをいう。非限定的な例には少なくとも1つのメチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベンおよびブチルパラベンが含まれる。

20

【0037】

「水性希釈剤」という用語は、水を含む液体の溶媒をいう。水性の溶媒系は水のみから、または水と1以上の混和性溶媒よりなってもよく、糖または他の賦形剤等の溶解した溶質を含んでもよい。より一般的に用いられる混和性溶媒は、メタノール、エタノール、プロパノール等の短鎖の有機アルコール、アセトン等の短鎖ケトン、グリセロール等のポリアルコールである。

【0038】

「等張剤」は、生理学的に許容され、製剤に適当な等張性を与えて製剤に接触している細胞膜を横切る正味の水の流れを防止する化合物である。グリセリン等の化合物がそのような目的に公知の濃度で一般的に用いられる。限定するものではないが、他の適当な等張剤にはアミノ酸またはタンパク質（例えばメチオニンまたはアルブミン）、塩（例えば塩化ナトリウム）、および糖（例えばデキストロース、シュクロースおよびラクトース）、および当業界で周知の多くの他のものが含まれる。

30

【0039】

「保存剤」という用語は、抗微生物剤、抗真菌剤、抗マイコプラズマ剤、抗ウイルス剤、抗プリオン剤および/または抗細菌剤として作用する化合物または組成物をいう。本発明のF S HまたはF S H変異体を含む保存製剤は、商業的に利用できる多数回使用製品であるための保存的有効性についての法的または規則ガイドラインを満足する。適当な保存剤は、限定されるものではないが、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、クロロヘキシジン、フェノール、m-クレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン等）、デヒドロ酢酸ナトリウム、o-クレゾール、p-クレゾール、クロロクレゾール、フェニルマーキュリックナイトレート、チメロサル、安息香酸のうちの少なくとも1つ、および1以上の保存剤の混合物が含まれる。例えば、Wallhauser, K., *Develop. Biol. Standard*, 24, 9-28 頁 (Basel, S. Krager, 1974) を参照。

40

【0040】

「リン酸塩緩衝液」という用語は、リン酸塩イオンを含む賦形剤をいう。一般的にリン酸

50

塩緩衝液は、リン酸またはナトリウムおよびカリウム塩を含むリン酸の塩から製造する。リン酸のナトリウムおよびカリウム一塩基性、二塩基性および三塩基性の塩等の、リン酸のいくつかの塩が知られている。リン酸の塩は生じた塩の水和物として生ずることも知られている。リン酸塩緩衝液は、約pH 4 ~ 約pH 10等の広い範囲のpHにわたり得、好ましくは約pH 5 ~ 約pH 9の範囲であり、最も好ましくは約6 ~ 約8の範囲である。好ましくは本発明の製剤は約6.8 ~ 約7.8のpHを有し、約pH 7.0、7.2および7.4を含む。好ましいイオンはナトリウムおよびカリウムイオンであり、単独でか、または、例えばリン酸緩衝食塩水(PBS)の場合のように溶液中に共に存在する。リン酸塩食塩水緩衝液は、Dulbeccoのリン酸塩で緩衝化された食塩水等、当業界で周知である。全溶液中の塩濃度は、約5mM, 9.5mM, 10mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mMおよび500mMの間で変り得る。好ましくは、イオン濃度は10mM以上、または50mM以上、または100mM以上である。

10

【0041】

「バイアル」という用語は、含まれた無菌の状態でFSHおよび希釈剤を保持するのに適した容器である。本明細書で用いるバイアルの例には、アンプル、カートリッジ、プリスターパッケージ、またはポンプ(浸透ポンプを含む)、カテーテル、経皮パッチ、カートリッジ、肺運搬、経粘膜運搬、または非経口運搬により患者にFSHを運搬するのに適した他のものを含む。非経口、肺、経粘膜、または経皮投与のための包装製品に適したバイアルは当業界で周知であり、認識されている。

【0042】

製剤の「安定」な製剤(好ましくは食塩または選択した塩を含むリン酸塩緩衝液である)は、その中のタンパク質の分解、改変、凝集、生物学的活性の損失の程度が、許容可能に調節でき、時間と共に非許容性を増加させないものである。安定性は当業界で周知の方法で評価でき、その方法は試料の光散乱、光の見かけの減衰(吸収、または光学密度)、サイズ(例えばサイズ排除クロマトグラフィー)、インビトロまたはインビボの生物学的活性および/または示差走査熱量測定(DSC)を含む。安定性を評価する他の方法はよく知られており、本発明に従って用いることができる。

20

【0043】

「処置する」という用語は、濾胞または精巣刺激またはFSHにより制御されるいずれかの他の生理学的反応の目的に、FSH投与が望ましい、患者のための投与、追跡検査、管理および/またはケアをいう。従って処理には、限定するものではないが、精子また濾胞の発育の誘導または改良のための、または排卵誘導のためのFSHの投与が含まれる。更に、正常な精子形成を回復するための処置が男性の場合意図される。

30

【0044】

「塩」はFSHの生理学的に受容し得る塩である。そのような塩はタンパク質中のいずれかの1以上の荷電基と生理学的に許容し得る非毒性のカチオンまたはアニオンの間に形成される。有機および無機塩には、例えば、塩酸、硫酸、スルホン酸、酒石酸、フマル酸、臭化水素酸、グリコール酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸、コハク酸、酢酸、硝酸、安息香酸、アスコルビン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ナフタリンスルホン酸、プロピオン酸、炭酸等の酸から製造したもの、または例えばアンモニウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムまたはマグネシウム塩がある。更なる、適当な塩は公知で、本明細書に含まれる。

40

【0045】

「緩衝剤」または「生理学的に受容し得る緩衝剤」という用語は、製剤中の医薬的または獣医的に使用に安全であることが知られており、製剤に望まれるpH範囲の製剤のpHを維持し、または調節する効果を有する化合物をいう。中くらいの酸性~中くらいの塩基性のpHに、pHを調節する受容し得る緩衝剤には、限定するものではないが、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、アルギニン、TRISおよびヒスチジンを含む。「TRIS」とは2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール、および医薬的に受容し得るいずれかのその塩をいう。好ましい緩衝剤は食塩または受容し得る塩と共にリン酸塩緩衝

50

剤である。生理学的に受容し得、所望のレベルにpHを調節するに適した他の緩衝剤は当業者に知られており、本明細書に含まれる。

【0046】

F S HおよびF S H変異体をコードする核酸

公知のF S H配列をコードするクローンを得るために、ポリヌクレオチド、または公知の核酸の配列をベースとするプローブを用いてcDNAまたはゲノムライブラリーをスクリーニングできる。ゲノムDNAまたはcDNAとハイブリダイズさせ、同じ、または異なる生物中の相同なDNA配列を単離するためプローブを用いる得る。当業者は、様々な程度のハイブリダイゼーションのストリンジェンシーがアッセイで用い得ること、ハイブリダイゼーションまたは洗浄媒体がストリンジェントであり得ることを理解するであろう。ハイブリダイゼーションの条件がよりストリンジェントになるに従い、二本鎖形成が生ずるためにはプローブと標的間のより大きい度合いの相補性がなければならない。ストリンジェンシーの程度は、温度、イオン強度、pH、およびホルムアミドのような部分的変性溶媒の存在により調節できる。例えば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、例えばホルムアミドの濃度を0～50%の範囲内で操作することにより、反応溶液の極性を変化させることにより便利に変化させる。検出可能な結合に必要な相補性の程度（配列同一性）は、ハイブリダイゼーション媒体および/または洗浄媒体のストリンジェンシーに従って変るであろう。相補性の程度は至適には100%であろうが、プローブおよびプライマーの僅かな配列の変化は、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄媒体のストリンジェンシーを減少させることにより相殺されることを理解すべきである。

10

20

【0047】

RNAまたはDNAの増幅方法は周知であり、過度な実験の必要なしに、本明細書に示した教示およびガイドラインに基づいて、本発明に従い用い得る。PCRによる選択的な増幅方法は、F S H変異体の鎖をコードするもののような核酸配列の小さいセグメントの加工を可能にする。そのような増幅技術は、便利な末端シグナル、制限部位等を増幅された配列に付加することを可能にする。

【0048】

DNAまたはRNA増幅の公知の方法には、限定するものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および関連する増幅方法（例えば、米国特許第4,683,195号、4,683,202号、4,800,159号、4,965,188号（Mullis等）；4,795,699号、および4,921,794号（Tabor等）；5,142,033号（Innis）；5,122,464号（Wilson等）；5,091,310号（Innis）；5,066,584号（Gyllensten等）；4,889,818号（Gelfand等）；4,994,370号（Silver等）；4,766,067号（Biswas）；4,656,134号（Ringold）参照）、並びに二本鎖DNA合成のテンプレートとして標的配列に対するアンチセンスRNAを用いるRNA媒介増幅（米国特許第5,130,238号（Malek等）（商標名NASBA）, Ausubel 上記；Colligon 上記、Sambrook 上記参照）が含まれる。これらの特許の全内容は本明細書の一部を構成する。

30

【0049】

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を用いて、ポリヌクレオチド配列および関連するDNA配列を、ゲノムDNAまたはcDNAライブラリーから直接増幅できる。PCRおよび他のインビトロ増幅方法は、発現されるタンパク質をコードする核酸配列をクローニングするために、例えば、与えられたF S HまたはF S H変異体のいずれかを得るため、試料中の所望のmRNAの存在を検出するための、核酸の配列決定をするための、また他の目的のためのプローブとして用いる核酸を作るために有用である。インビトロ増幅法による当業者を指導するのに十分な技術の例は、Berger, Sambrook および Ausubel 上記、そしてまた Mullis 等、米国特許第4,683,202号（1987）；および Innis 等、PCR Protocols A Guide to Methods and Application, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990) に見出される。ゲノムPCR増幅のための商業的に入手できるキットは当業界で公知である。例えば、Advantage GC Genomic PCR Kit (Clontech) を参照。T4 遺伝子32タンパク質（Boehringer Mannheim）を用いて、長いPCR産物の収量を改良できる。

40

50

【 0 0 5 0 】

与えられた F S H または F S H 変異体のいずれかを発現させるに必要な核酸は、Narang 等、Meth. Enzymol. 68: 90-99 (1979) のホスホトリエステル法 ; Brown 等、Meth. Enzymol. 68: 109-151 (1979) のホスホジエステル法 ; Beaucage 等、Tetra. Letts. 22: 1859-1862 (1981) のジエチルホスホルアミダイト法 ; 例えば、Needham VanDevanter 等 ; Nucleic Acids Res. 12: 6159-6168 (1984) に記載の自動合成機を用いる Beaucage および Caruthers, Tetra. Letts. 22 (20): 1859-1862 (1981) により記載された固相ホスホルアミダイトトリエステル法 ; および米国特許第4,458,066号の固体支持法による直接化学合成によっても製造できる。化学合成では一般に一本鎖オリゴヌクレオチドが製造され、相補配列とのハイブリダイゼーションにより、またはその一本鎖ストランドをテンプレートとして用いる DNA ポリメラーゼによる重合により、それを二本鎖 DNA に変換し得る。当業者は、DNA の化学合成は約 100 塩基の配列に限定されるが、より長い配列は短い配列の結合により得られ得ることを理解するであろう。

10

【 0 0 5 1 】

組換え発現カセット

当業界で知られるように、組換え発現カセットを用いて、公知の F S H または F S H 変異体についての公知のコード化された核酸を発現させることができる。核酸配列、例えば完全長のサブユニットをコードする cDNA またはゲノム配列を用いて、所望の宿主細胞中に導入できる組換え発現カセットを構築できる。しかしながら、機能的ヘテロダイマーを得るために、一つのプラスミドから、または別のプラスミドに導入し、両方のサブユニットを発現させねばならないことが理解されるであろう。組換え発現カセットは、各サブユニットについて意図する宿主細胞中でのポリヌクレオチドの転写を指揮する転写開始調節配列に作動可能に結合したポリヌクレオチドを典型的には含むであろう。そのような方法は F S H を発現させるために当業界でよく知られている (例えば、CHO 細胞由来組換えヒト F S H (rhF S H) ; (Keene J.L. 等, J. Biol. Chem., 264: 4769-4752, 1989; L'oumaye E. 等, Human Reprod. Update, 1: 188-1999, 1995; Olijve W. 等, Mol. Hum. Reprod., 2: 361-369, 1996))。

20

【 0 0 5 2 】

異種および非異種 (すなわち内在性) プロモーターの両方を、F S H または F S H 変異体サブユニットをコードする核酸を発現させるため用いることができる。組換え技術による一般的な製造方法は、当業界で周知である。Sambrook 等, 1989; Ausubel 等, 1987-1989 を参照。それぞれはその全体が本明細書の一部を構成する。

30

【 0 0 5 3 】

ベクターおよび宿主細胞

F S H または F S H 変異体の および サブユニットについてコードされたポリヌクレオチドは、宿主中での増殖のための選択可能なマーカーを含むベクターに結合し得る。一般に、一つのプラスミドベクター (または および サブユニットが別の発現ベクターに含まれるなら複数のベクター) を、リン酸カルシウム沈澱のような沈澱物中に、または荷電した脂質との複合体中に導入する。ベクターがウイルスであるなら、それは適当なパッケージング細胞系を用いてインビトロでパッケージングし、次に宿主細胞に形質導入できる。

40

【 0 0 5 4 】

各サブユニットについての DNA 挿入物は、SV40 初期および後期プロモーターおよびレトロウイルスLTRのプロモーター等の適当なプロモーターに作動可能に結合すべきである。他の適当なプロモーターは当業者に公知であろう。発現構築物は、転写開始、終了部位、並びに転写領域における翻訳のためのリボソーム結合部位を更に含むであろう。該構築物により発現される成熟転写物のコード化部分は好ましくは転写されるべき mRNA の末端に適当に位置する開始における翻訳開始コドンおよび終了コドン (例えば UAA、UGA または UAG) を含むであろう。

【 0 0 5 5 】

50

発現ベクターは少くとも1つの選択マーカーを好ましくは含むであろう。そのようなマーカーには例えば、真核細胞培養の場合、ジヒドロ葉酸リダクターゼまたはネオマイシン耐性、E. coliまたは他の細菌中での培養の場合、テトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む。適当な宿主の代表的な例には、限定するものではないが、酵母細胞等の真菌細胞；Drosophila S 2 および Spodoptera S 5 9 細胞等の昆虫細胞；限定するものではないが CHO、COS、AV-12、HEPG2、NIH3T3 および Bowesメラノーマ細胞および植物細胞が含まれ、CHO細胞が好ましい。上記宿主細胞についての適当な培地および培養条件は周知である。適当な真核性ベクターには Stratagene から入手可能な pWLN EO、pSV2CAT、pOG44、pXT1 および pSG、並びに Pharmacia から入手可能な pSVK3、pBPV、pMSG および pSVL がある。他の適当なベクターは当業者に明らかであろう。

10

【0056】

宿主細胞へのベクター構築物またはベクター（複数）の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、または他の方法により行い得る。そのような方法は、Sambrook、(上記) 1-4 および 16-18 章；Ausubel (上記) 1, 9, 13, 15, 16 章等の多くの標準的な研究室マニュアルに記載されている。

【0057】

FSH または FSH 変異体サブユニットが、融合タンパク質などの修飾された形態で発現し得ること、分泌シグナルばかりでなく更なる異種の機能的な領域をも含み得ることは予想される。例えば更なるアミノ酸、特に荷電したアミノ酸の領域をポリペプチドのN末端に付加して、精製中、またはその後の取扱および貯蔵中の安定性および宿主細胞での持続性を改良できる。またペプチド部分をポリペプチドに付加して、精製を促進することもできる。そのような領域は所望の FSH または FSH 変異体の最終的な製造前に除去できる。そのような方法は、Sambrook (上記)、17.29-17.42 および 18.1-18.74；Ausubel (上記)、16、17 および 18 章等の多くの標準的な実験室マニュアルに一般的に記載されている。

20

【0058】

宿主細胞中でのタンパク質の発現

本明細書で提供され、または公知の核酸配列を用いて、哺乳動物細胞等の組換え的に操作された真核細胞中で FSH または FSH 変異体の および サブユニットを発現し得る。2つのサブユニットを含むタンパク質をコードする核酸の発現のために利用可能な多くの発現システムを当業者は知り得ることが予期される。真核細胞中でのタンパク質の発現について公知の様々な方法を詳細に記載する試みは行わないであろう。

30

【0059】

簡単に要約すると、公知の FSH または FSH 変異体をコードする単離した核酸の発現は、サブユニットおよび サブユニット DNA または cDNA をプロモーター（構成性または誘導性である）に別々に作動可能に結合し、発現ベクターに導入することにより、典型的には達成されるであろう。或いはその DNA を挿入することによりベクターは適当なプロモーターを提供するであろう。そのベクターは真核細胞中での複製および組込みに適当であり得る。典型的な発現ベクターは転写および翻訳ターミネーター、本発明のタンパク質をコードする DNA の発現の制御に有用な開始配列およびプロモーターを含む。クローニングされた遺伝子の高レベルの発現を得るために、転写を指揮する強力なプロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写/翻訳ターミネーターを最小でも含む発現ベクターを構築するのが望ましい。当業者は生物学的活性を減ずることなく改変をなし得ることを認識するであろう。いくつかの改変は、クローニング、発現または標的分子のゲノムへの導入を促進するためになされ得る。そのような改変は当業者によく知られており、例えば、便利に位置する制限部位または終了コドンまたは精製配列を提供することを含む。

40

50

【 0 0 6 0 】

或いは、所望の および サブユニットをコードする内在性のDNAを含む宿主細胞中でターンオンする（操作する）ことにより核酸を宿主細胞中で発現し得る。そのような方法は、米国特許第5,580,734号、5,641,670号、5,733,746号、および5,733,761号に記載されているように周知であり、これら特許は全体が本明細書の一部を構成する。

【 0 0 6 1 】

真核生物中での発現

哺乳動物細胞等の多くの真核性発現システムは当業者に知られている。下に簡単に説明するように、公知のFSHまたはFSH変異体の および サブユニットをコードする核酸をこれらの真核システムで発現できる。

10

【 0 0 6 2 】

酵母中での異種タンパク質の発現は周知である。F. Sherman等, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) は、酵母中でタンパク質を製造するのに利用できる様々な方法を記載するよく知られた著作である。真核性のタンパク質の製造のために広く用いられる酵母は *Saccharomyces cerevisiae* および *Pichia pastoris* である。 *Saccharomyces* および *Pichia* 中での発現のためのベクター、株およびプロトコールは公知であり、商業的提供者（例えば Invitrogen）から入手できる。適当なベクターは、3-ホスホグリセレートキナーゼまたはアルコールオキシダーゼを含むプロモーター等の発現調節配列、複製起点、末端配列および所望により他のものを通常有する。

20

【 0 0 6 3 】

FSHまたはFSH変異体の および サブユニットをコードする配列は、例えば哺乳動物、昆虫または植物起源の細胞培養をトランスフェクトするに用いる様々な発現ベクターにも結合し得る。該ペプチドの製造に有用な細胞培養の例は哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞システムはしばしば細胞の単層の形であろうが、哺乳動物細胞の懸濁液も用い得る。無傷のタンパク質を発現できる多くの適当な宿主細胞系が当業界で開発され、HEK293、BHK21、およびCHO細胞系を含み、LonzaからのCHO-K1等のCHO細胞系が好ましい。これらの細胞のための発現ベクターには、複製起点、プロモーター（例えば、好ましくはCMVプロモーター、HSV tkプロモーター、EF1プロモーター、後期または初期SV40プロモーター、またはpgk（ホスホグリセレートキナーゼ）プロモーター）、エンハンサー（Queen等, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986) 等の発現調節配列、並びにリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位（例えば、SV40ラージTAGポリA付加部位）および転写ターミネータ配列等のプロセス情報部位を含み得る。本発明のタンパク質の製造に有用な他の動物細胞は、例えば American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (7版、1992) から入手可能である。好ましい宿主細胞はCHO-K1等のCHO細胞を含み、好ましいベクターはGSベクターを含み、それぞれは例えば Lonza Biologics PLC (Slough, Berkshire, England, UK) から入手できる。

30

【 0 0 6 4 】

昆虫細胞でのFSHまたはFSH変異体の および サブユニットの発現に適当なベクターは通常SF9バキュロウイルスに由来する。適当な昆虫細胞系にはカの幼虫、カイコ、アワヨトウ、ガ、およびSchneider細胞系等の *Drosophila* 細胞系を含む（Schneider, J. *Embryol. Exp. Morphol.* 27:353-365 (1987) を参照）。

40

【 0 0 6 5 】

酵母についてと同様に、高級動物または植物宿主細胞を用いる場合、ポリアデニル化または転写ターミネータ配列をベクターに典型的には導入する。ターミネータ配列の例はウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアデニル化配列である。転写物の正確なスプライシングのための配列も含み得る。スプライシング配列の例は、SV40からのVP1イントロンである（Sprague等, *J. Virol.* 45:773-781 (1983)）。更に宿主細胞中で複製をコントロールする遺伝子配列を、ウシのパピローマウイルスタイプのベクター

50

ー中に見出されるもの等のベクター中に導入してもよい。M. Saveria - Campo, Bovine Papilloma Virus DNA, a Eucaryotic Cloning Vector in DNA Cloning, 2巻、a Practical Approach, D. M. Glover編, IRL Press, Arlington, VA, 213 - 238頁(1985)。

【0066】

タンパク質の精製

F S HまたはF S H変異体は、発現すると、ライゼートに標準的なタンパク質単離技術を適用することにより細胞から単離できる。精製過程のモニターはウエスタンブロット技術または他の標準的なノムノアッセイ技術のラジオイムノアッセイを用いることにより行い得る。

10

【0067】

およびサブユニットを含むF S HまたはF S H変異体は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法により組換え細胞培養から回収し、精製できる。好ましくは、高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)、カチオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、またはそれらの組合せを精製のために用いる。およびサブユニットを含むF S HおよびF S H変異体には天然の精製した産物、および化学合成法の産物を含み、例えば酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物を含む真核宿主から組換え技術により製造された産物を含む。組換え製造法で用いる宿主に依存して、本発明のポリペプチドはグリコシル化され得、或いはグリコシル化され得ない。好ましいF S HまたはF S H変異体は真核宿主中で起るようにグリコシル化される。更に、本発明のポリペプチドは、宿主媒介プロセスの結果としてのある場合には最初の修飾されたメチオニン残基を含み得る。そのような方法は、Sambrook(上記)、17.37 - 17.42章; Ausubel(上記)、10, 12, 13, 16, 18および20章等の多くの標準的な実験室マニュアルに記載されており、これらの全体は本明細書の一部を構成する。

20

【0068】

F S HまたはF S H変異体およびポリペプチド

公知のF S HまたはF S H変異体には、限定されるものではないが、明細書の配列同定部分に挙げたこれらのタンパク質配列を含む。それらを以下に更に同定する。

30

配列番号 1;	ウシ α サブユニット	- 96	アミノ酸
配列番号 2;	ウシ β サブユニット	-111	アミノ酸
配列番号 3;	ウマ α サブユニット	- 96	アミノ酸
配列番号 4;	ウマ α サブユニット	-111	アミノ酸
配列番号 5;	ヒト α サブユニット	- 92	アミノ酸
配列番号 6;	ヒト β サブユニット	-111	アミノ酸
配列番号 7;	ブタ α サブユニット	- 96	アミノ酸
配列番号 8;	ブタ β サブユニット	-111	アミノ酸
配列番号 9;	ヒツジ α サブユニット	- 96	アミノ酸
配列番号10;	ヒツジ β サブユニット	-111	アミノ酸
配列番号11;	ヒト β 変異体	-108	アミノ酸
配列番号12;	ヒト β 変異体	-109	アミノ酸
配列番号13;	ヒト β 変異体	-110	アミノ酸

40

【0069】

F S HまたはF S H変異体ヌクレオチド配列

F S HまたはF S H変異ヌクレオチド配列には、限定するものではないが明細書の配列同定部分に挙げた または サブユニットをコードするこれらのヌクレオチド配列を含み、それらを以下に更に同定する。

50

配列番号14;	ヒト α cDNA	—	276	ヌクレオチド (92アミノ酸をコードする)
配列番号15;	ヒト β 変異体cDNA	—	324	ヌクレオチド (108アミノ酸をコードする)
配列番号16;	ヒト β 変異体cDNA	—	327	ヌクレオチド (109アミノ酸をコードする)
配列番号17;	ヒト β 変異体cDNA	—	330	ヌクレオチド (110アミノ酸をコードする)
配列番号18;	ヒト β cDNA	—	333	ヌクレオチド (111アミノ酸をコードする)
配列番号19;	ヒト α cDNA	—	276	ヌクレオチド (92アミノ酸をコードする)
配列番号20;	ヒト β 変異体cDNA	—	324	ヌクレオチド (108アミノ酸をコードする)

10

【0070】

配列番号19および20のDNAはライゲートしたオリゴヌクレオチドからデザインし、構築した。配列番号19と配列番号14の相違は、サブユニットタンパク質のコードされたアミノ酸配列を変化させない相違である。同様に配列番号20および配列番号15の相違はサブユニットタンパク質のコードされたアミノ酸配列を変化させない相違である。

20

【0071】

アミノ酸コード

本発明のタンパク質およびポリペプチドを構成するアミノ酸はしばしば短縮形で表される。アミノ酸の名称は、当業界でよく理解されているようにアミノ酸をその1文字コード、その3文字コード、名称、3つのヌクレオチドコドンにより表すことにより示される(A lberts等、Molecular Biology of the Cell, 3版、Garland Publishing, Inc. New York, 1994を参照)

【表1】

1文字コード	3文字コード	名称	3つのヌクレオチドコドン(S)
A	A l a	アラニン	GCA,GCC,GCG,GCU
C	C y s	システイン	UGC,UGU
D	A s p	アスパラギン酸	GAC,GAU
E	G l u	グルタミン酸	GAA,GAG
F	P h e	フェニルアラニン	UUC,UUU
G	G l y	グリシン	GGA,GGC,GGG,GGU
H	H i s	ヒスチジン	CAC,CAU
I	I l e	イソロイシン	AUA,AUC,AUU
K	L y s	リシン	AAA,AAG
L	L e u	ロイシン	UUA,UUG,CUA,CUC,CUG, CUU
M	M e t	メチオニン	AUG
N	A s n	アスパラギン	AAC,AAU
P	P r o	プロリン	CCA,CCC,CCG,CCU
Q	G l n	グルタミン	CAA,CAG
R	A r g	アルギニン	AGA,AGG,CGA,CGC,CGG, CGU
S	S e r	セリン	AGC,AGU,UCA,UCC,UCG, UCU
T	T h r	スレオニン	ACA,ACC,ACG,ACU
V	V a l	バリン	GUA,GUC,GUG,GUU
W	T r p	トリプトファン	UGG
Y	T y r	チロシン	UAC,UAU

10

20

30

40

【 0 0 7 2 】

上記のように、本発明は、好ましくは食塩または選択された塩と共にリン酸緩衝剤を含む安定な製剤、そしてまた保存剤を含む保存溶液および製剤、そしてまた医薬的に受容し得る製剤中にF S HまたはF S H変異体を含む医薬または獣医用途に適した多数回使用の保存製剤を提供する。保存製剤は、水性稀釈剤中に、少くとも1つのフェノール、m - クレゾール、p - クレゾール、o - クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デハイドロ酢酸ナトリウム、チメロサルから選択される少くとも1つ

50

の保存剤またはそれらの混合物を含む。

【0073】

上記のように、本発明は包装材料、および、場合により水性希釈剤中に、上記の緩衝剤および/または保存剤と共にF S HまたはF S H変異体の溶液を含むバイアルを含む製品を提供し、該包装材料はそのような溶液は24時間以上の期間にわたって保持し得ることを示すラベルを含み得る。本発明は更に、包装材料、凍結乾燥したF S HまたはF S H変異体を含む第1バイアル、および上記緩衝剤または保存剤の水性希釈物を含む第2バイアルを含む製品を含み、該包装材料は、患者にF S HまたはF S H変異体を水性希釈剤中で再構築し、24時間以上の期間にわたって保持し得る溶液を形成するよう指示するラベルを含む。

10

【0074】

本発明に従い用いるF S HまたはF S H保存剤は、哺乳動物細胞またはトランスジェニック産物からを含む組換え方法により製造するか、または尿源から等の他の生物学的源から精製してもよい。受容し得る方法には、Hakola, K., Molecular and Cellular Endocrinology, 127: 59 - 69, 1997; Keene等, J. Biol. Chem., 264: 4769 - 4775, 1989; Cerpa - Poljak等, Endocrinology, 132: 351 - 356, 1993; Dias等, J. Biol. Chem., 269: 25289 - 25294, 1994; Flack等, J. Biol. Chem., 269: 14015 - 14020, 1994およびValove等, Endocrinology, 135: 2657 - 2661, 1994および米国特許第3, 119, 740号に記載のものが含まれ、これらの文献は本明細書の一部を構成する。

20

【0075】

本発明の製剤のためにタンパク質を提供する方法は特に問題とされるものではない。好ましくは、F S Hはそれぞれ配列番号5および6で与えられる一つのサブユニットおよび一つのサブユニットを含むヘテロダイマーであり、F S H変異体は、それぞれ配列番号5および11; 5および12; 並びに5および13で与えられる一つのサブユニットと一つのサブユニットを含むヘテロダイマーである。本発明の範囲の適当なF S HまたはF S H変異体には、限定するものではないが少なくとも一つの公知のサブユニット配列および少なくとも一つの公知のサブユニットを含む(公知の および サブユニットについての配列表を参照)。

30

【0076】

F S HまたはF S H変異体の非限定的例には以下のものがある：

【化9】

(a) : α -サブユニット : (配列番号 1)

FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKN
ITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号 2)

RSCELTNITITVEKEECGFCISINTTWCAGYCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCSKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFREIKE

(b) : α -サブユニット : (配列番号 3)

10

FPDGEFTTQDCPECKLRENKYFFKLGVPYQCKGCCFSRAYPTPARSRKTMLVPKN
ITSESTCCVAKAFIRVTFMGNIKLENHTQCVCSTCYHHKI

β -サブユニット : (配列番号 4)

NSCELTNITIAVEKEGCGFCITINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATACHCGKCNDSSTDCTVRGLGPSYCSFGDMKE

(c) : α -サブユニット : (配列番号 5)

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTFMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

20

β -サブユニット : (配列番号 6)

NSCELTNITIAIEKEECRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMKE

(d) : α -サブユニット : (配列番号 7)

FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKLGAPYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKN
ITSEATCCVAKAFTKATVMGNARVENHTECHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号 8)

30

NSCELTNITITVEKEECNFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKTCTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFSEMKE

【化 10】

(e) : α -サブユニット : (配列番号9)

FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVQKNVTSE
ITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVENHTECHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号10)

RSCELTNITITVEKEECSFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKACTFKEL
VYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCGKCDRSDSTDCTVRGLGPSYCSFSDIRE

(f) : α -サブユニット : (配列番号5)

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号11)

NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEM

(g) : α -サブユニット : (配列番号5)

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号12)

NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEM

(h) : α -サブユニット : (配列番号5)

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

β -サブユニット : (配列番号13)

NSCELTNITIAIEKEECSRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKEL
VYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMK

【0077】

本発明の製品中のタンパク質ホルモンの範囲は、再構築により生じる量、もしウエット/ドライシステムなら、約1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 約50 mg/ml の濃度を含むが、より低い、およびより高い濃度も作用可能であり、意図する運搬ビヒクルに依存する。例えば溶液製剤は、経皮パッチ、肺、経粘膜または浸透若しくはマイクロポンプ法とは異なるであろう。ホルモン濃度は好ましくは約5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 2 mg/ml 、最も好ましくは約5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

【0078】

好ましくは、その水性稀釈剤は、場合により更に医薬的に受容し得る保存剤を含む。好ましい保存剤には、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン(メチル、エチル、プロピル、ブチル等)、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸塩、チメロサル、またはそれらの混合物によりなる群から選択されるものが含まれる。好ましくは保存剤はm-クレゾール、フェノール、クロロクレゾール、またはそれらの混合物であり、m-

10

20

30

40

50

クレゾールが最も好ましい。製剤中で用いる保存剤の濃度は抗微生物効果を生じるに十分な濃度である。そのような濃度は選択した保存剤に依存し、当業者により容易に決定される。例えば、*m*-クレゾールまたはフェノール（単独または組合せて）は一般に約23 mM～約35 mMの濃度である。驚くべきことに、特許請求する製剤で用いる保存剤は、F S HまたはF S H変異体の生物学的活性に悪影響を及ぼさず、多数回使用の投与を可能にする。

【0079】

他の賦形剤、例えば等張剤、緩衝剤、抗酸化剤、保存助剤も稀釈剤に、場合により、そして好ましくは添加し得る。グリセリン等の等張剤は一般に公知の濃度で使用する。グリセリンの濃度は一般に約16 mg/mlである。生理学的に許容される緩衝剤を好ましくは添加し、改良されたpH調節を提供する。製剤は約4～約10等の広いpH範囲をカバーし得、好ましい範囲は約pH5～約pH9であり、最も好ましい範囲は約6.0～約8.0である。好ましくは、本発明の製剤は約6.8～約7.8のpHを有する。好ましい緩衝剤にはリン酸塩緩衝剤が含まれ、最も好ましいのはリン酸ナトリウム、特にリン酸塩で緩衝化された食塩水（PBS）である。

10

【0080】

Tween 20（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）、Tween 40（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノパルミテート）、Tween 80（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート）、Pluronic F68（ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロック共重合体）およびPEG（ポリエチレングリコール）、またはポリソルベート20若しくは80またはポロキサマー184若しくは188、Pluronic polylys、他のブロック共重合体等の医薬的に許容され得る可溶化剤、並びにEDTAおよびEGTA等のキレート剤を場合により製剤または組成物に加え、凝集を減少させてもよい。これらの添加剤は、ポンプ又はプラスチック容器を製剤を投与するために用いるなら特に有用である。医薬的に受容し得る界面活性剤の存在は、タンパク質が凝集する傾向を軽減する。特許請求する製剤は驚くほど安定である。本発明前には、F S Hの保存、マルチユース製剤の製造は不安定のため不可能であると信じられていた。出願人は特許請求する製剤は約2～約40の温度で安全に保存され、そのタンパク質の生物学的活性を、2ヶ月を越え、更に証明する期間保持し得ることを発見した。

20

【0081】

本発明の製剤は、F S HまたはF S H変異体を、フェノール、*m*-クレゾール、*p*-クレゾール、*o*-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサルまたはそれらの混合物を水性稀釈剤中で混合することを含む方法により製造し得る。水性稀釈剤中でのF S HまたはF S H変異体および保存剤の混合は従来の溶解および混合方法を用いて行う。適当な製剤を調製するために、例えば緩衝化溶液中のF S HまたはF S H変異体の計量した量を、緩衝化溶液中の所望の保存剤と、所望の濃度のタンパク質および保存剤を与えるのに十分な量で混合する。この方法の変形は当業者により認識されるであろう。例えば、成分を加える順序、更なる添加剤を用いるかどうか、製剤を調製する温度およびpHはすべて濃度および用いる投与手段のために最適化される因子である。

30

40

【0082】

特許請求する製剤は、透明な溶液として、または保存剤および/または賦形剤、好ましくはリン酸塩緩衝剤および/または食塩および選択された塩を水性希釈剤中に含む第2バイアルで再構築される凍結乾燥したF S HまたはF S H変異体を含むバイアルを含む2つのバイアルとして患者に提供し得る。単一の溶液バイアルまたは再構築を必要とする2つのバイアルは多数回再使用でき、患者処置の単一または多数サイクルに十分であり、従って現在利用できるより便利な処置レジメを提供する。

【0083】

ここに特許請求する製品は24時間以上の期間にわたる投与に驚くほど有用である。本発

50

明の前には、そのような製品は即時使用の場合にのみ適当であり承認されている。患者は使用しない材料を捨てるよう指示され、これは浪費と出費をもたらす。従って、ここに特許請求する製品は患者に大きな利益をもたらす。特許請求する製剤は、約2～約40の温度で安全に貯蔵し得、2月を越える長い期間タンパク質の生物学的活性を保持し得ることを出願人は発見した。したがって溶液が24、36、48、72若しくは96時間、若しくはそれ以上保持され、および/または用い得ることを示す包装ラベルが可能となる。保存希釈剤を用いるなら、そのようなラベルは1年、1.5年～2年までの使用を含み得る。

【0084】

本発明におけるF S HまたはF S H変異体の溶液は水性希釈剤中でF S HまたはF S H変異体を混合すること含む方法で調製し得る。混合は従来の溶解および混合方法を用いて行う。適当な希釈剤を調製するために、例えば水または緩衝液中のF S HまたはF S H変異体の計量した量を、所望の濃度のタンパク質および場合により保存剤を与えるのに十分な量で混合する。この方法の変形は当業者により認識されるであろう。例えば、成分を加える順序、更なる添加剤を用いるかどうか、製剤を調製する温度およびp Hはすべて濃度および用いる投与手段のために最適化される因子である。

【0085】

特許請求する製品は、透明な溶液として、または水性希釈剤を含む第2バイアルで再構築される凍結乾燥したF S HまたはF S H変異体のバイアルを含む2つのバイアルとして患者に提供し得る。単一の溶液バイアルまたは再構築を必要とする2つのバイアルは多数回再使用でき、患者処置の単一または多数サイクルに十分であり、従って現在利用できるより便利な処置レジメを提供する。

【0086】

透明な溶液、または水性媒体を含む第2バイアルで再構築される凍結乾燥したF S HまたはF S H変異体のバイアルを含む2つのバイアルを、薬局、病院、または他のそのような施設に提供することにより、本発明の製品を患者に間接的に提供してもよい。この場合の透明な溶液は、1 lまたはそれ以上までであってもよく、薬局または病院が大きい容器からF S HまたはF S H変異体溶液の少量を小さいバイアルへ移すため1又は数回取り出し、彼らの顧客および/または患者に提供してもよい。この場合の希釈バイアルは1 lまたはそれ以上までであってもよく、大きい容器から希釈剤の少量を凍結乾燥したF S HまたはF S H変異体の再構築のため多数回取り出してもよい。薬局または病院が彼らの顧客および患者に提供する透明溶液または再構築したF S H若しくはF S H変異体溶液は、患者処置の一回また多数サイクルに十分であり、従って現在利用できるものより便利な処置レジメを提供する。

【0087】

これらの一つのバイアル系を含む認められた装置は、Humaject（登録商標）、Novo Pen（登録商標）、B - D Pen（登録商標）、Auto Pen（登録商標）およびOpti Pen（登録商標）等の溶液運搬用のペン - インジェクター装置を含む。2つのバイアル系を含む認められた装置は、Humatro Pen（登録商標）等の再構築溶液の運搬のためにカートリッジ中で凍結乾燥した薬剤を再構築するためのペン - インジェクターシステムを含む。

【0088】

ここに特許請求する製品は包装材料を含む。包装材料は、監督機関により要求される情報の外に、その製品を用い得る条件を提供する。本発明の包装材料は、水性希釈液中でF S HまたはF S H変異体を再構築し、溶液を形成し、その溶液を24時間以上の期間にわたって使用するという指示を患者に与える。1つのバイアルの溶液製品の場合、ラベルはそのような溶液は24時間以上の期間にわたって使用し得ることを示す。ここに特許請求する製品はヒトの医薬的製品使用に有用である。

【0089】

本発明の製剤は、F S HまたはF S H変異体、および好ましくは食塩または選択された塩を含むリン酸塩緩衝剤である選択した緩衝剤を混合することを含む方法により製造し得る

10

20

30

40

50

。水性希釈剤中でのF S HまたはF S H変異体および緩衝剤の混合は従来の溶解および混合方法を用いて行う。適当な製剤を調製するために、例えば水または緩衝液中のF S HまたはF S H変異体の計量した量を、水中の所望の緩衝剤と、所望の濃度のタンパク質および緩衝剤を与えるのに十分な量で混合する。この方法の変形は当業者により認識されるであろう。例えば、成分を加える順序、更なる添加剤を用いるかどうか、製剤を調製する温度およびp Hはすべて濃度および用いる投与手段のために最適化され得る因子である。

【0090】

特許請求する製剤は、透明な溶液として、または保存剤または緩衝剤および賦形剤を水性希釈剤中に含む第2バイアルで再構築される凍結乾燥したF S HまたはF S H変異体のバイアルを含む2つのバイアルとして患者に提供し得る。単一の溶液バイアルまたは再構築を必要とする2つのバイアルは多数回再使用でき、患者処置の単一または多数サイクルに十分であり、従って現在利用できるより便利な処置レジメを提供する。

10

【0091】

本明細書に記載する安定、または保存製剤または溶液中のF S HまたはF S H変異体は、様々な運搬方法により本発明に従い投与し得、その運搬方法には、S CまたはI M注射、経皮、肺、経粘膜、移植、浸透ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプ、経口、および当業界で周知の当業者に理解される他の手段を含む。

【0092】

以下の実施例は本発明の製剤および組成物の製造を更に説明するためにのみ与えられる。本発明の範囲は以下の実施例のみからなると解釈すべきではない。

20

【0093】

【実施例】

核酸 / ポリペプチド実施例

実施例 1

哺乳動物細胞におけるF S HまたはF S H変異体のクローニングおよび発現

典型的哺乳動物発現ベクターは、少なくとも1つのプロモーター因子(mRNAの転写開始を媒介する)、ポリペプチドコード配列、および転写終了および転写物のポリアダニル化に必要なシグナルを含む。しかしながら、機能的なF S HまたはF S H変異体は およびサブユニットの両方を含むので、両サブユニットを発現させる手段が必要であり、それは各サブユニットのための1つのプロモーター要素を含む1つのベクターから両方のサブユニットを発現させることによるか、或いは2つのベクター(第1のサブユニットを発現させるプロモーターを含む第1のベクターおよび第2のサブユニットを発現させるプロモーターを有する第2のベクター)を用いることによる。

30

【0094】

更に、各哺乳動物発現ベクターは1またはそれ以上のベクターに存在し得る因子を有し、その因子にはエンハンサー、Kozak配列、およびRNAスプライシングのため供与および受容部が隣接する介在配列が含まれる。

【0095】

非常に有効な転写は、S V 4 0の初期および後期プロモーター、レトロウイルス、例えばR S V、H T L V I、H I V Iからの長い末端反復配列(L T R S)、およびサイメガロウイルス(C M V)の初期プロモーターを用いて達成され得る。しかしながら、細胞性因子も用い得る(例えばヒトのアクチンプロモーター)。F S HまたはF S H変異体を提供するのに用いる適当な発現ベクターには例えばp I R E S 1 neo、p R e t r o - O f f、p R e t r o - O n、P L X S N、またはP L N C X (C l o n t e c h L a b s , P a l o A l t o , C A)、p c D N A 3 . 1 (+ / -)、p c D N A / Z e o (+ / -)またはp c D N A 3 . 1 / H y g r o (+ / -) (I n v i t r o g e n)、P S V L および P M S G (P h a r m a c i a , U p p s a l a , S w e d e n) p R S V c a t (A T C C 3 7 1 5 2)、p S V 2 d h f r (A T C C 3 7 1 4 6) および p B C 1 2 M I (A T C C 6 7 1 0 9) を含む。用い得る哺乳動物細胞にはヒト H e l a 2 9 3、H 9 および J u r k a t 細胞、マウス N I H 3 T S および C 1 2 7 細胞、C o s 1、C o s 7 および C V 1、ウズラ Q C 1 - 3、マウス L 細胞並びにチャイニーズハムスタ

40

50

ー卵巣細胞 (CHO) が含まれる。

【0096】

或いは、 および サブユニットのための望ましいDNA配列は、染色体に組込まれると、各サブユニットを発現するそのDNA配列を含む安定な細胞系で発現し得る。dhfr, gpt、ネオマイシンまたはハイグロマイシン等の選択可能なマーカーとの共トランスフェクションは当業界で知られているようにトランスフェクトされた細胞の同定および単離を可能にする。

【0097】

該サブユニットのトランスフェクトされたDNA配列は大量のコードされたポリペプチドを発現させるため増幅することもできる。DHFR (ジヒドロ葉酸レダクターゼ) マーカーは、問題のDNA配列の数百または数千ものコピーを有する細胞系を発生させるのに有用である。他の有用なマーカーは酵素グルタミンシンターゼ (GS) (Murphy等, Biochem. J. 227: 277-279 (1991); Bebbington Bio/Technology 10: 169-175 (1992)) である。これらのマーカーを用いて哺乳動物細胞を選択培地で培養し、最高の耐性を有する細胞を選択する。これらの細胞系は染色体に組込まれた増幅された遺伝子を含む。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) およびNSO細胞がタンパク質およびポリペプチドの製造にしばしば用いられる。

【0098】

発現ベクター pC1 および pC4 はラウス肉腫ウイルスの強力なプロモーター (LTR) (Cullen等, Molec. Cell. Bio., 5: 438-447 (1985)) およびCMVエンハンサーの断片 (Boshart等, Cell 41: 521-530 (1985)) を含む。例えば制限酵素解裂部位 BamHI、XbaI および Asp718 を有する多重クローニング部位は、問題の および をサブユニットのDNA配列のクローニングを容易にする。そのベクターは更に、ラットプレプロインシュリンの3'イントロン、ポリアデニル化シグナルおよび終了シグナルを含む。

【0099】

実施例 2

CO S または CHO 細胞におけるクローニングおよび発現

FSH または FSH 変異体のための発現プラスミドは、FSH または FSH 変異体サブユニットをコードする cDNA を発現ベクター pcDNA I / Amp または pcDNA I I I (Invitrogen, Inc. より入手し得る) にクローニングすることにより得られる。前述のように、各サブユニットは、別のベクターを宿主細胞に独立に入れるか、或いは および サブユニットの両方を発現するよう単一のベクターを操作することにより、機能性ヘテロダイマーを製造するよう発現することを要する。

【0100】

発現ベクター pcDNA I / amp は、(1) E. coli および他の原核細胞中での発育に有効な E. coli の複製起源; (2) プラスミドを含む原核細胞の選択のためのアンピシリン耐性遺伝子; (3) 真核細胞中での発育のための SV40 複製起源; (4) CMV プロモーター、ポリリンカー、SV40 イントロン; (5) 赤血球凝集素断片 (すなわち精製を容易にするための「HA」タグ)、HIS タグ (例えば Ausbel (上記) 参照)、それに続く終了コドンおよびポリアデニル化シグナルを含み、cDNA が CMV プロモーターの発現調節の下に便利に置かれ、ポリリンカー中の制限部位という手段により SV40 イントロンおよびポリアデニル化シグナルに作動可能に結合するよう配置する。HA タグは Wilson 等, Cell 37: 767-778 (1984) に記載されているインフルエンザ赤血球凝集素ポリペプチド由来のエピトープに対応する。HA タグを標的ポリペプチド (または サブユニット) に融合させると HA エピトープを認識する抗体を用いる組換えポリペプチドの検出および回収を容易にする。pcDNA I I I は更に選択可能なネオマイシンマーカーを含む。

【0101】

FSH または FSH 変異体の および サブユニットをコードする DNA 断片をベクター

10

20

30

40

50

のポリリンカー領域に別々にクローニングして、組換えポリペプチドの発現がCMVプロモーターにより指揮されるようにする。ベクターへの挿入は場合によりHAエピトープと共に、或いはなしである。プラスミド構築戦略は以下のようである。各サブユニットについての寄託されたクローンのF S HまたはF S H変異体のc D N Aを便利な制限部位を含むプライマーを用いて増幅させる。

【0102】

各サブユニットについてのPCR増幅DNA断片およびベクター、p c D N A I / A m p を適当な制限酵素で消化し、次に各サブユニットを消化したベクターに結合する。各ライゲーション混合物をE . coli株S U R E (Stratagene Cloning Systems , 1 1 0 9 9 North Torrey Pines Road , L a Jolla , C A 9 2 0 3 7より入手可能)中に形質転換し、形質転換した培養物をアンピシリン媒地プレート上にプレートとし、そのプレートを次にアンピシリン耐性コロニーの生育を可能にするためインキュベートする。各サブユニットについてのプラスミドDNAを耐性コロニーから単離し、F S HまたはF S H変異体をコードする断片の存在のため制限分析または他の手段により調べる。

10

【0103】

組換えF S HまたはF S H変異体の発現のために、例えばSambrook等, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)に記載されているようにDEAE-デキストランを用いて、上記のように各サブユニットのための発現ベクターで共トランスフェクションする。細胞を、F S HまたはF S H変異体の発現条件下にインキュベートする。

20

【0104】

F S H H AまたはF S H変異体H A融合ポリペプチドの発現は、例えばHarlow等, Antibodies: A Laboratory Manual, 2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NEW YORK (1988)に記載されている方法を用いて、放射標識および免疫沈降により検出される。この目的のために、トランスフェクションの2日後、細胞を35S-システインを含む媒地中で8時間インキュベートすることにより標識する。細胞および媒地を集め、細胞を洗浄し、上に引用したWilson等により記載されているように、洗剤を含むR I P A緩衝液(150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 50mM TRIS, pH 7.5)で溶菌する。タンパク質を細胞溶菌物および培地からH A特異的モノクローナル抗体を用いて沈降させる。沈降したタンパク質を次にSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィにより分析する。予期する大きさの発現生成物が細胞溶菌物中に見られ、負のコントロールでは見られない。

30

【0105】

ベクターp C 4はF S HまたはF S H変異体の各サブユニットの発現のために用いられる。或いは当業者は、単一ベクターからおよびサブユニットの両方を発現させるようp C 4を適応させることができるであろう。プラスミドp C 4はプラスミドp S V 2 - d h f r (A T C C No. 3 7 1 4 6)の誘導體である。そのプラスミドはS V 4 0初期プロモーターの調節下のマウスD H F R遺伝子を含む。およびサブユニットプラスミドで共トランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣細胞またはジヒドロ葉酸活性を欠く他の細胞を、化学治療剤メトトレキセートを補充した選択培地(マイナスMEM、Life Technologies)中で細胞を培養することにより選択できる。メトトレキセート(M T X)に耐性の細胞中のD H F R遺伝子の増幅は十分文献に記載されている(例えば、F.W.Alt等, J. Biol. Chem. 253:1357-1370(1978); J.L.HamlinおよびC.Ma, Biochem. and Biophys. Acta 1097:107-143(1990); およびM.J.PageおよびM.A.Sydenham, Biotechnology 9:64-68を参照)。高濃度のM T X中で生育した細胞は、D H F R遺伝子の増幅の結果として標的酵素D H F Rを過剰に発現することにより薬剤に対する耐性を得る。DNA配列をD H F R遺伝子に結合すれば、それは通常共増幅され、過剰発現する。この方法は増幅された遺伝子の1000を越えるコピーを有する細胞系を発生させるのに用い得ることが知られている。次にメトトレキセートが引き出され時、宿主細胞の1以上の染色体に組込ま

40

50

れた、増幅されたDNA配列を含む細胞系が得られる。

【0106】

およびサブユニットを発現させるために、プラスミドpC4はラウス肉腫ウイルス(Cullen等, Molec.Cell.Biol. 5:438-447(1985)の長い末端反復配列の強力プロモータの後に問題のDNA配列を含み、更に、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)の即時遺伝子のエンハンサーから単離された断片を含む(Boshart等, Cell 41:521-530(1985))。プロモーターの下流にBamHI、XbaIおよびAsp718制限酵素解裂部位があり、DNA配列の組み込みを可能にする。これらのクローニングサイトの後に、プラスミドはラットプレプロインシュリン遺伝子の3'イントロンおよびポリアデニル化部分を含む。他の高効率プロモーター、例えばヒトb-アクチンプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、または他のレトロウイルス、例えばHIVおよびHTLV Iからの長い末端反復配列をも発現のために用い得る。Clontech's Tet-Off および Tet-on遺伝子発現システムおよび類似のシステムを用いて、哺乳動物細胞中で制御された方法でFSHまたはFSH変異体を発現できる(M.Gossen およびH.Bujard, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551(1992))。mRNAのポリアデニル化のため、他のシグナル、例えばヒト成長ホルモンまたはグロビンからのものも用い得る。染色体に組み込まれた および サブユニットのDNA配列を有する安定な細胞系も、gpt、G418 またはハイグロマイシン等の選択可能なマーカーで共トランスフェクトした際に選択できる。1を越える選択可能なマーカー、例えばG418 およびメトトレキセートを用いるのが有利である。

10

【0107】

プラスミドpC4を制限酵素で消化し、次に当業界で知られた方法により仔ウシ腸ホスファターゼを用いる脱ホスホリル化する。ベクターを次に1%アガロースゲルから単離する。

20

【0108】

各サブユニットについての完全長のFSHまたはFSH変異体をコードするDNA配列を遺伝子の5'および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅する。非限定的な例にはFSHまたはFSH変異体の各サブユニットのコード化配列の部分に対応するか、または相補的なヌクレオチドを有する5'および3'プライマーを含む。

【0109】

増幅した断片を適当なエンドヌクレアーゼで消化し、次に1%アガロースゲルで再び精製する。各サブユニットについての単離された断片および脱ホスホリル化したベクターをT4DNAリガーゼを用いて別々にライゲートする。E.coli HB101またはXL-1 Blue細胞を次に別に形質転換し、例えば制限酵素分析を用いて、pC4プラスミドに挿入された断片(またはベクターが および サブユニットの両方を発現するために適応させられているなら複数の断片)を含む細菌を同定する。

30

【0110】

活性なDHF R遺伝子を欠いたチャイニーズスター卵巣(CHO)細胞をトランスフェクションに用いる。5μgの発現プラスミドpC4は、0.5μgのプラスミドpSV2-neoと共にリポフェクチンを用いて共トランスフェクトする。プラスミドpSV2-neoは、主要な選択可能なマーカー、G418を含む抗生物質の群に耐性を与える酵素をコードするTn5由来のneo遺伝子を含む。細胞を1μg/mlのG418を補充したアルファマイナスMEMに接種する。2日後、トリプシン化して、10、25、または50ng/mlのメトトレキセートおよび1ng/mlのG418を補充したアルファマイナスMEM中のハイブリドーマクローニングプレート(Greiner, Germany)に接種する。約10~14日後単一のコロニーをトリプシン化して、異なった濃度のメトトレキセート(50nM、100nM、200nM、400nM、800nM)を用いて、6ウエルペトリ皿または10mlフラスコに接種する。最高のメトトレキセート濃度で生育したクローンをもっと高濃度のメトトレキセート(1mM、2mM、5mM、10mM、20mM)を含む新しい6ウエルプレートに次に移す。同じ方法を100~200mMの濃度で生育す

40

50

るクローンが得られるまで繰り返す。所望の産物の発現を例えば、S D S - P A G E およびウェスタンブロットにより、または逆相 H P L C 分析により分析する。

【 0 1 1 1 】

本発明を先の記述または実施例に具体的に記載した以外のやり方で実施できることは明瞭であろう。

【 0 1 1 2 】

本方法の多くの改変および変形が、Keene J.L.等、J.Biol.Chem., 264:4769-4752, 1989; Loumaye E 等, Human Reprod. Update, 1:188-1999, 1995; Olijve W.等, Mol. Hum. Reprod., 2:361-369, 1996 に記載されたもの、そしてまた他のゴナドトロピンについて知られ、用いられている他の組換え技術を含め、組換えタンパク質発現に対して知られている。

10

【 0 1 1 3 】

実施例 3

A V 1 2 細胞中での発現

発現カセットベクター p G T H を A V 1 2 中での サブユニットの発現に用いた。多くの発表された論文が A V 1 2 - 6 6 4 および / または A V 1 2 - R G T 1 8 細胞の使用を記載する (Grinell, B.W.等, Blood 76(12):2546-54, 1990; Burck, P.J.等, J.Biol.Chem. 265(9):5170-7, 1990; Parkinson, J.F.等, J. of Biol.Chem. 265(21):12602-10, 1990; Grinell, B.W.等, J.Biol.Chem. 266(15):9778-85, 1991; Wery, J.P.等, Nature 352(6330):79-82, 1991; Berg, D.T.等, Biotechniques 14:972-9, 1993; Gerlitz, B 等, Biochemical Journal 295(1):131-40, 1993; Kursar, J.D.等, Molecular Pharmacology 46(2):227-34, 1994; Desai, M.A.等, Molecular Pharmacology 48(4):648-57, 1995; Obesity Research 3 Suppl, 4:4441s-4447s, 1995; Desai, M.A.等, British Journal of Pharmacology 118(6):1558-64, 1996; Kumar A.等, Cancer Research 56(23):5397-402, 1996; Boggs, L.N.等, J. of Neurochemistry 57(3):1324-7, 1996; Lucaites, V.L.等, Life Sciences 59(13):1081-95, 1996; Schoepp, D.D.等, Neuropharmacology 35(12):1661-72, 1996; Kumar, A.等, Cancer Research, 57(15):3111-4, 1997; Urology, 49(3):487-93, 1997; Wainscott, D.B.等, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 357(1):17-24, 1998; Wu, S.等, Brain Research-Molecular Brain Research, 53(1-2):88-97, 1988を参照)。同様に、刊行物はプラスミド p G T H の使用 (Grinell等, J.Biol.Chem. 266(15):9778-85, 1991参照) およびプラスミド p G T D の使用を (Biochemical Journal, 295(Pt1):131-40, 1993参照) を記載している。

20

30

【 0 1 1 4 】

簡単に言うと、p G T H は順次にいくつかの要素: S V 4 0 初期プロモーター . ori、E. coli ハイグロマイシン耐性、S V 4 0 スモール「t」抗原プライス部位 / poly A 部位、p B R 3 2 2 クローニングレムナント、B K ウイルス (P 2 株) クローニングレムナント、ポリ-C A 2 0 / G T 2 0 因子 (合成オリゴヌクレオチド)、B K ウイルス (P 2 株) エンハンサー、A D 2 主要後期プロモーター / スプライストリパータイタイター、F S H サブユニット配列のための BclI 挿入部位 (終止コドンを含む)、S V 4 0 「t」抗原プライス部位 / ポリ A 部位 ; および p B R 3 2 2 アンピシリン耐性 / ori を含む。

40

【 0 1 1 5 】

プラスミド構築物 p G T H - を、3 6 2 - b p BclI F S H c D N A 断片をベクターの唯一の BclI 部位 (配列番号 1 9 または 1 4 の配列を参照) にクローニングすることにより、ヒト サブユニット配列 (配列番号 5) を発現させるため作った。F S H c D N A 断片 D N A を、テンプレートとしてシャトルプラスミド p L G D 6 3 7 を用いることにより P C R 増幅により作った (p L G D 6 3 7 は合成 / オリゴヌクレオチド組立 F S H c D N A 配列を含む)。BclI 挿入物のインテグリティを、配列決定および Gen Pept データベースとの比較により確認した。

【 0 1 1 6 】

発現カセットベクター p G T D を用いて、ヒト サブユニット F S H 変異体配列 (配列番

50

号11)を発現させた。pGTDはAV12細胞中での発現のためのいくつかの要素を含む。pGTDは順次に、BKウイルス(P2株)クローニングレムナント、Poly-C₂₀/GT₂₀因子(合成オリゴヌクレオチド)、BKウイルス(P2株)エンハンサー、AD2主要後期プロモーター/スプライストリパータイトリーダー、FSH変異体サブユニットコード配列のためのBcl1挿入部位(終止コドンを含む)、SV40スモール「t」抗原スプライス部位/ポリA部位;SV40初期プロモーター、ori、ネズミジハイドロ葉酸レダクターゼcDNA、SV40スモール「t」抗原スプライス部位/ポリ-A部位、およびpBR322アンピシリン耐性/oriを含む。

【0117】

プラスミド構築物pGTD-bCD3を、393bp BclI FSH-bCD3 cDNA断片をpGTDベクターの唯一のBclI部位にクローニングすることにより、調製した(配列番号20または15を参照)。FSH-cD3 cDNA断片DNAを、テンプレートとしてシャトルプラスミドpLGD638を用いて、PCR増幅により作った(pLGD638は合成/オリゴヌクレオチド組立FSH-cDNA配列を含む)。構築物のインテグリティを、配列決定により確認し、GenPeptデータベースに寄託されているヒトサブユニット配列(アクセシオンナンバー476441)と比較した。

10

【0118】

簡単にいうと、pGTH- およびpGTD-bCD3プラスミドを線状化し、再精製し、次にアドヘレントAV23-RGT18細胞に共トランスフェクトした。200µg/mlのG418と共に、0.25µMのメトトレキサートおよび100µg/mlハイグロマイシンBを培地を用いて選択し、AV12-RGT18細胞のグルタメートトランポーター遺伝子型を維持した後に、個別の安定なクローンを手動によるか、またはフローアシストセルソーティングにより単離した。最大を産生するクローンを、商業的FSH ELISAキットを用いるならし培地の分析により同定した。いくつかのクローンを血清を含まない懸濁液に適應させ、更に精製して単離可能量のFSH変異体ヘテロダイマーを得た。

20

【0119】

実施例4

CHO-K1細胞中の発現

CHO-K1細胞系(LONZA Biologics plc.)を培養して、配列番号5のサブユニット及び配列番号11のサブユニットからなるFSH変異体ヘテロダイマーを製造した。

30

【0120】

発現ベクターカセットは、サブユニット(配列番号5)をコードするDNA、およびサブユニット(配列番号11)をコードするDNAを含み、2つの異なるプロモーターにより調節される: サブユニットについてはCMVおよびサブユニットについてはEF1。それぞれの および サブユニット配列はウシ成長ホルモンpolyAテールを用いる。さらに該ベクターはSV40後期プロモーターにより調節され、SV40ポリAテールを含むグルタミンシンターゼ遺伝子を含み、選択可能なマーカーとして用いる。

【0121】

その細胞系をL-メチオニンスルホキシミンの選択圧下にGibco BRLのCD CHO培地中で培養した。ELISAアッセイを用いてFSH変異体を発現するマスターウエルを同定した。いくつかのマスターウエルをクローニングおよび増幅に付した。これらの実験により適当な力価を有するクローン性細胞系2B6.1C3.25を得た。小スケールの振とうフラスコ(20~60ml)中で行った発現の研究は、この系が7~8日後に30mg/LのFSH変異体を発現することを示した。

40

【0122】

実施例5

CHOまたはAV-12細胞からのFSH変異体の精製

配列番号5のサブユニットおよび配列番号11のサブユニットからなるFSH変異体ヘテロダイマー精製は、CHO-K1若しくはAV12細胞系または適当に利用できる他

50

の製造系の単層または懸濁培養から、文献に記載され、当業界で知られた多くの方法により達成し得る。開示したF S H変異体を、媒地を含む培養物から単離する一つの方法は、培地を、タンパク質を精製するための、カチオン交換クロマトグラフィー、ダイアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過に付すことである。界面活性剤を含む懸濁培養の場合には、Q - Sepharose工程等の更なる精製工程が必要かも知れない。p H、導電性、緩衝液組成および操作条件（カラムの大きさ、流速、等）をクロマトグラフィー工程に更に加え、または最適化し得る。純度および収率は、S D S - P A G Eゲル（クーマシー染色およびウェスタンブロッティングの両方）、E L I S A試験、排除クロマトグラフィーおよび277nmにおけるUV吸収によるタンパク質濃度または他の公知の技術により分析し得る。

10

【0123】

精製およびクロマトグラフィー的分別は、以下の各単離工程についての更なる詳細に従うことにより、達成し得る。単層培養の場合、カチオン交換カラムに適用する前にならし培地を濃縮し、ダイア濾過する。存在し得る洗剤を除去するために、懸濁培養の場合、Q - セファロースバッティング工程を含み得る。

【0124】

1. 濃縮

典型的には、A V 1 2懸濁培養の場合、0.02 ~ 0.04%のPluronic F 68を用い、一方C H O懸濁培養の場合、媒地中に0.1 ~ 0.18%用いる。遠心分離およびチーズクロスを通す濾過を用いて細胞培養群により透明化したならし培地を、S 3 Y M 1 0 スパイラルカートリッジ (Amicon #540633) と共にタンジェンシャルフロー濾過システムProFlux (ProFlux M12, Millipore) を用いて濃縮する。用いたPluronic F 68の量に依存して、媒地を4 ~ 10倍濃縮し、濃縮された媒地中に0.2 ~ 0.4%のPluronic F 68が存在するようにする。濃縮後の最終容積は、C H O - K 1について8Lから、そしてA V 1 2培養物について24Lから出発して、通常2 ~ 3Lである。

20

【0125】

2. Q - Sepharoseを用いるバッティング

濃縮前の出発ならし培地各1リットルに、50mLのFast-Flow Q-Sepharose樹脂 (Pharmacia 17-0510-01、20mM Tris-pH7.4で前平衡化) および200mMの最終伝導度 (約20mS/cm) を得るに十分なNaClを濃縮した媒地に加え、一晩ゆっくりと4で攪拌する。

30

【0126】

3. ダイア濾過

Q - Sepharose樹脂と共に濃縮した媒地を一晩バッティングした後、樹脂を沈降させ、上清をデカントアウトし、Zeta Plus 30 - S Pフィルター (# B 0 4 0 6、Sun Source) および流速170ml/分のMaster flexポンプを有するC U N Oシステムを用いて濾過する。その媒地を次に約800mlまで更に濃縮し、Profluxシステム中で20mM Tris pH 7.4の5 ~ 6容量を用いてダイア濾過する。この時点で、伝導度は約2mS/cmである。pHをI N H C lで5に調節し、溶液をC U N Oシステムで新しいZeta Plus 30 - S Pフィルターを用いて再び濾過し、直ちにカチオン交換樹脂にのせる。

40

【0127】

4. カチオン交換クロマトグラフィー (C E X)

カラム: Pharmacia SP-Sepharose Fast Flow (17 - 0729 - 01) を用い、F S Hの約100 ~ 200mg (全タンパク質約500 ~ 600mg) を50mlのカラムに充填する。緩衝剤はA) 20mMリン酸ナトリウム、pH 5.0; 及びB) 20mMリン酸ナトリウム、pH 5.0、1M NaClである。

【0128】

試料をpH 5.0に調節し、濾過により清澄化し、直ちにカラムにのせ、4カラム容量で5ml/分で流した後、15カラム容量にわたる0% ~ 50%Bのグラジエントを開始する。3分の画分を集める(15ml)。画分を1M Tris - pH 8.0の400ml中に

50

集める。

【0129】

クーマシー染色 SDS PAGEゲルを用い、FSH含有画分を選択して、プールする(典型的にはプールの大きさは50mlカラムに対して200~250mlである)。このプールを20mM Tris pH7.4に対して4で一晚透析して、伝導度を3mS/cm未満まで落とす。

【0130】

5. ダイアフィニティクロマトグラフィー(DAC)

Prometic Biociences Inc.からのMimetic Blue Dye 1 A6XL、0090-0050を約40mgのFSHについて50mlのカラムで用いる。緩衝液は、A) 25mMリン酸塩、pH6.5(伝導度は4.5~5mS/cmである); B) 25mMリン酸塩、150mM KCl、pH6.5; C) 25mMリン酸塩、1M KCl, pH8.0である。

10

【0131】

CExプールの透析の後、pHを6.5に調節し、3ml/分でDACカラムにのせる。100%A~50%Aのグラジエントの後、50%Bを4カラム容量について適用し、次に5カラム容量について100%緩衝液Cで溶出し、3分の画分(9ml)を集める。

【0132】

クーマシー染色 SDS - PAGEゲルを用いてFSH含有画分を選びプールする。典型的にはそのプールの大きさは50mlカラムの場合、90~100mlである。そのプールをMillipore Ultrafree遠心装置(UFV2BCC40、5000 MWCO、2000rpmで回転)を用いて4mlまで濃縮し、ゲル濾過カラムにのせる。

20

【0133】

6. ゲル濾過

カラム: BiPilot Superdex 75 Prep Grade 35/600カラムを、50~100mgのFSHについて用いる。緩衝液は1xPBS(GIBCO 10xPBS、#70011から調製)および100mM NaClである。緩衝液の最終組成は、1mMの一塩基性リン酸カリウム、3mMの二塩基性リン酸ナトリウム、253mMの塩化ナトリウム、pH7.4である。

【0134】

流速3ml/分で上記の1xPBS中のDAC工程からのFSH4mlをそのカラムにのせ、1分(3ml)の画分を集める。

30

【0135】

この工程後のFSHの純度はクーマシーおよびシルバー染色ゲルにより、通常95%を超える。

【0136】

製剤/製造実施例

実施例6

FSHの物理的安定性に及ぼす保存剤の影響

保存剤はタンパク質を変性または脱安定化し、または凝集を誘導する(Brange, J. および Langkjar, L., Acta Pharm. Nord, 4, 149-158, 1992; Maa YF および Hsu C, International Journal of Pharmaceutics, 140, 155-168, 1996) ので、様々な保存剤の存在下でのuFSH(uFSH-Vitro Diagnostics-Human Urofollitropin)の物理的安定性を動的光散乱法を用いて調べた。すべての測定値は、Lexel 95 アルゴンレーザー(488nm)、Brookhaven Instruments モデルBI-200SMゴニオメーター、およびBI9000ATオートコリレーターを用いて得た。データパラメーターは、100,000カウント/秒に調節した初期光子カウント、30秒持続、31ダストカットオフ値、および90°散乱角よりなる。

40

【0137】

1xPBSに対して一晚pH7.4で透析した1mg/mlの尿の濾胞ホルモン(uFSH-V

50

itro Diagnostics-Human Urofollitropin) の 1.5 ml 溶液に保存剤を加えた。保存剤の濃度は適当な抗微生物活性を与えることが一般的に知られている濃度となるように選択した。層流フード中でこの試料を 0.1 μm の Anotop-Plus フィルター (10 mm) を通して、12 mm DLS 試験管中に濾過した。その試料を 37 °C で前もって平衡化しておいた DLS ホルダーに置いた。自己相関関数を 24 時間の間 15 分毎に測定し、分析して、流体力学的パラメーターを得た。この測定により、タンパク質分子の 99% 以上が約 5.7 nm という平均直径を有することがわかった。少ない割合 (1% 未満) が約 220 nm という平均直径を有していた。保存剤の存在は、37 °C で 24 時間後、分子の粒径分布を顕著に変化させなかつた。次に、24 時間における代表的なデータを N N L S (Non Negative Linear Squares) プログラムを用いて表 I に示すよう解析した。分子の 99% 以上が約 5.7 nm の平均直径を有する粒子であった。結晶学的に測定した流体力学的半径と分子量を関係づける実験式を用いると (Squire, P.G. および Himmel, M.E., Arch. Bioch. Biophys., 196, 165-177, 1979)、この平均 DLS 粒径は約 36,000 ダルトンに対応し、これは uFSH ヘテロダイマーの分子量は一致する。粒子の残りの小部分 (1% 未満) は約 200 nm の平均直径を有していた。表 V I に示すこれらのデータは、調べた保存剤は試験した条件下で uFSH を顕著に凝集させないことを示す。

【0138】

【表 2】

表 V I 様々な保存剤を含む製剤中の uFSH の粒度分布

保存剤	保存剤濃度 (mg/ml)	小粒子 (~5.7nm)	大粒子 (~200nm)
なし	0	>99%	<1%
m-クレゾール	3.5	>99%	<1%
フェノール	3.5	>99%	<1%
ベンジルアルコール	10	>99%	<1%
メチルパラベン	1	>99%	<1%
クロロクレゾール	2	>99%	<1%

【0139】

実施例 7

uFSH 製剤に関する熱変性の研究

溶媒条件の関数としての uFSH (uFSH-Vitro Diagnostics-Human Urofollitropin) についての熱変性転移を示差走査熱量測定 (DSC) によりモニターした。実験は、VP-DSC マイクロカロリメーター (MicroCal inc., Northampton, MA; Plotnik, V.V. 等, Anal. Biochem., 250:237-244, 1997) で、データ取得については VPViewer ソフトウェアそしてデータ解析については Origin DSC ソフトウェアを用いて行った。マッチさせた試料セルおよび対照セルをロリポップ (lollipop) の形にし、ワーキング容積 0.5 ml でタンタルから作った。約 1 mg/ml の uFSH 試料を適当な緩衝液に対して一晚透析し、タンパク質の濃度を UV 分光計により測定した。次にタンパク質を DSC 実験のために 0.4 ~ 0.5 mg/ml に希釈した。透析物を対照溶液として用いた。試料および対照溶液を 5 分間脱気した後、充填ファネルを通して 2.5 ml の針を用いてセル中に入れた。圧力は圧力キャップを用いて約 30 psi に保った。この研究のすべての実験について、対照セルおよび試料セルの両方において装置は緩衝液を一晩流し、試料実験前の熱履

歴を確立した。データをツーステート (two-state) モデルを用いて Origin D S C ソフトウェアで解析した (Sturtevant J.M., Annu.Rev.Phys.Chem., 38:463-488,1987)。異なる溶液条件での遷移温度 (T_m) の中点を表 V I I に要約する。該タンパク質は非常に共同的な遷移を受け p H 7.4 の P B S 緩衝液中で T_m は 77.3 である。第 1 の走査直後の第 2 の走査における遷移の不存在により示されるように、熱変性は測定の間スケールにおいて不可逆的である。しかしながら、解離したサブユニットは溶液中でモノマーとして存在し、このモノマーは次に再会合して、何日かのうちに生物学的に活性なダイマーを形成する (データ示さず)。以下に示す濃度での保存剤、m-クレゾール、フェノール、ベンジルアルコール、メチルパラベンおよびクロロクレゾールの添加の影響は表 V I I に示すように T_m に対してごくわずかな効果を示す。

10

【 0 1 4 0 】

【表 3】

表 V I I D S C によりモニターし溶液中での u F S H の T_m に及ぼす p H、塩および保存剤の影響

溶液の条件	T_m (°C)
P B (9.5 mMリン酸塩)	
p H 5.7	72.4
p H 6.6	74.3
p H 7.6	74.8
p H 8.6	75.3
100mM N a C l, p H 7.6	76.1
P B S, p H 7.4	77.3
3.5 mg/ml m-クレゾール	75.3
3.5 mg/ml フェノール	75.0
10 mg/ml ベンジルアルコール	73.5
1 mg/ml メチルパラベン	76.1
2 mg/ml クロロクレゾール	74.6

20

30

【 0 1 4 1 】

実施例 8

p H の関数としての u F S H の安定性

P B S 中の u F S H (uFSH-Vitro Diagnostics-Human Urofollitropin) の安定性を様々な p H について測定した。p H の関数としてのヘテロダイマーのパーセントを、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) によりモニターした (表 V I I I)。

【 0 1 4 2 】

【表 4】

表 V I I I S E C によりモニターした p H の関数としてのヘテロダイマーのパーセント

40

pH	ダイマー (%)
7.0	95.0
6.5	95.0
6.0	95.0
5.5	95.0
5.0	95.0
4.5	95.0
4.0	95.0
3.5	95.0
3.25	87.7
3.0	62.3
2.5	17.6
2.0	5.0

10

20

【0143】

実施例9

uFSHの保存および非保存製剤の安定性

uFSH (uFSH-Vitro Diagnostics-Human Urofollitropin) をPBS (Dulbecco のGIBCO) 中で調製し、更にPBSで濃度約50 µg/mlまで希釈した。タンパク質濃度をHewlett Packard Model 8452A ダイオードアレイ分光光度計で測定した。

【0144】

uFSH溶液の一部を、重さを測定したm-クレゾール試料を含むビーカーに加え、m-クレゾールの最終濃度を約3.16 mg/mlとした。保存および非保存溶液のアリコートプラスチックの遠心管中に置き、約22、37 および45 で238日までインキュベートした。様々な時点で、アリコートを平衡化したSuperdex-75 HR10/30カラム (Pharmacia) の中に注入し、常温でPBS中0.5 ml/分で流した。溶出液を214 nmでモニターした。ヘテロダイマーの存在は、表IIIに示すように、ダイマピークとモノマーピークの総面積でダイマピークの面積割った比から計算した。64日後、m-クレゾールを含む溶液中のuFSH分子の約79%が37 で無傷のダイマーとして残り、52%以上が45 でダイマーとして存在する。驚くべきことに、室温で63日後に、非保存および保存溶液の両方でuFSHダイマーの最小の解離があった。23、37、および45 において、4、8、16、21、28、29、43、63、64、126、127、237および238日に、非保存及び保存溶液の両方中でuFSHヘテロダイマーの一般的に比較的小さい解離が存在することは注目すべきである。

30

40

【表5】

表IX 保存および非保存uFSH溶液中でのダイマーの%

日	P B S			P B S + m-クレゾール		
	23°C	37°C	45°C	23°C	37°C	45°C
0	96.0	96.0	96.0	93.8	93.8	93.8
4	-	93.0	91.7	-	91.8	85.6
8	94.3	92.7	89.5	93.6	88.9	80.0
16	94.1	91.1	84.3	92.5	87.0	73.8
21	94.0	91.0	83.1	-	-	-
22	-	-	-	92.3	84.7	68.8
28	92.8	89.8	-	92.7	83.7	-
29	-	-	79.9	-	-	65.3
43	93.3	89.5	75.9	91.6	81.5	59.2
63	92.9	-	-	92.6	-	-
64	-	88.2	68.6	-	78.9	52.5
126	91.5	85.5	-	89.6	71.2	-
127	-	-	58.2	-	-	43.8
237	92.3	83.1	-	91	62.0	-
238	-	-	57.9	-	-	39.2

10

20

30

【 0 1 4 5 】

実施例 1 0

u F S H 試料の生物学的活性測定

c A M P 感受性の b - ラクタマーゼ (B L A M) リポーターベクター (Zlokarnik 等、1998、Science、279:84-88) で安定にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞を、ハイグロマイシン選択可能マーカーをコードするヒト F S H 受容体発現ベクターでトランスフェクトした。生き残った細胞を 1 0 μ g / m l の F S H (Sigma) で 5 時間処理し、青の蛍光の最高強度を示す F S H 活性化細胞の集団を F A C S により同定し、単離した。このポリクローナルな集団を、エクスパンドさせ、1 0 μ g / m l の F S H で 5 時間処理し、F A C S を単一細胞クローンに分類した。2 つのクローン細胞系を B L A M マイクロタイタープレート検定により分析し、6 ~ 8 倍の青 / 緑比の増加を示した。B L A M 発現の最大の増加倍数を有する F S H - R を次の F S H 検定に用いる細胞系として選択した。

40

【 0 1 4 6 】

c A M P 感受性の B L A M ポーターを有する F S H 受容体細胞系を、ポリ - D - リジンをコートした 9 6 ウェルの黒壁の組織培養プレート中に、2 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルで、1 0 0 μ l の増殖培地 (D M E M カタログナンバー 1 1 9 6 5 - 0 9 2、1 0 % F B S、5 5 0 μ g / m l ジェンタマイシン) に接種し、5 % C O ₂ 下 3 7 ° で一晩インキュベートした。増殖培地を 1 0 0 μ l の分析培地 (D M E M カタログナンバー 1 1 9 6 5 - 0 9 2、0 . 5 % F B S、5 0 0 μ g / m l ジェンタマイシン) で置き換え、プレートを 3 7 ° および 5 % C O ₂ で一晩インキュベートした。その分析培地を除去し、示した濃度の F S

50

Hを含む分析培地 100 μ l を次に各ウエルに加え、そのプレートを 5% CO₂ 下、37 $^{\circ}$ C で 5 時間インキュベートした。DMSO 中の 1 mM の CCF2-AM の 6 μ l、1 ml の 2% の PEG-400 中の 6 μ l のプルロン酸 (0.1% 酢酸 DMSO 中 100 μ g/ml) および 10% ESS (Aurola Biosciences) よりなる、20 μ l の BLAM 基質ローディングを各ウエルに加えた。室温で 1 時間インキュベートした後、緑色 (395 nm 励起 / 530 nm 発光) 蛍光強度に対する青色 (395 nm 励起 / 460 nm 発光) 蛍光光度の比を Cytofluor (Perseptive Biosystems、シリーズ 4000 マルチウエルプレートリーダー) を用いて測定した。FSH の存在による青 / 緑の比の倍率の増加を、それぞれの比を対照試料の青 / 緑比で割ることにより計算した。

【0147】

尿の FSH (uFSH-Vitro Diagnostics-Urofollitropin) の PBS 中の 50 μ g/ml の溶液 (試料 A) を実施例 9 のように調製した。この溶液の一部を 90 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱して、ヘテロダイマーの 99% 以上を 2 つのモノマーに解離させ (SEC 分析により示される)、このアッセイにおいて負の対照 (試料 B) として用いた。FSH 溶液の他の一部を約 3.15 mg/ml の m-クレゾールを含むよう改変した (試料 C)。これら 3 つの試験試料の生物学的活性を 2 つの別のプレート上での FSH-R293-Cre-BLAM 試験で評価した。各プレートにおける 3 回の分析の平均を表 X に示す。このデータはその試験が非常に再現性よく行われることを示す。解離したヘテロダイマーは生活性を失うこと (試料 B)、および m-クレゾールを含む製剤中の FSH (試料 C) は完全な生物学的活性を保持することも示された。

【表 6】

表 X FSH 受容体生物学的活性における青 / 緑倍率増加

試料濃度 (nM)	試料 A		試料 B		試料 C	
	プレート	プレート	プレート	プレート	プレート	プレート
	1	2	1	2	1	2
0 (コントロール)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.003	1.68	1.67	1.07	1.06	1.22	1.22
0.01	1.91	1.86	1.06	1.06	1.58	1.62
0.03	3.00	2.89	1.06	1.06	2.72	3.21
0.1	4.00	4.09	1.18	1.18	3.86	3.85
0.3	4.53	4.47	1.24	1.24	4.61	4.63
1	4.88	4.71	1.68	1.69	4.81	4.77
3	4.60	4.64	2.61	2.58	4.83	4.92

【0148】

実施例 11

保存および非保存 uFSH 試料の生物学的活性測定

尿の FSH (uFSH-Vitro Diagnostics-Human Urofollitropin) 試料を実施例 10 に記載のようにインビトロ生物学的活性アッセイで測定した。23 $^{\circ}$ C での 11 月後の PBS 中の 2 つの uFSH 試料 (すなわち、m-クレゾールを有する、及び有しない PBS 中) のイ

10

20

30

40

50

ンビトロアッセイの結果を表 X I で対照と比較した。データは、保存および非保存 u F S H 試料はこのアッセイで 1 1 月後完全な生物学的活性を維持することを示す。

【 0 1 4 9 】

【表 7】

表 X I 保存および非保存 u F S H 溶液の 2 3 での 1 1 月後のインビトロ生物学的活性

試料	比力価
uFSH 対照 (50 μ g/ml,PBS,新鮮)	1.0
uFSH(50 μ g/ml,PBS,23°C,11月)	1.27
uFSH(50 μ g/ml,PBS,3.15mg/ml m-クレゾール,23°C,11月)	0.86

10

【 0 1 5 0 】

実施例 1 2

保存および非保存 r F S H 変異体のカートリッジ適合性

製剤化した r F S H 変異体 (サブユニット配列番号 5 ; サブユニット配列番号 1 1) 溶液のカートリッジとの適合性を試験するために、表 1 2 に示す試料の 4 m l 溶液を、以下に示すストック溶液から調製した。

20

P B S 中の 1 . 8 5 m g / m l の r F S H 変異体

P B 中の 1 . 7 3 m g / m l の r F S H 変異体

P B S 中の 2 0 m g / m l の m - クレゾール

P B 中の 2 0 m g / m l の m - クレゾール

P B 中の 2 0 % グリセロール

1 x P B S

【 0 1 5 1 】

混合後、各溶液 1 . 7 m l を個々のカートリッジにピペットで入れ、頭部空間は最小にした。2つのカートリッジを各試料について満たした。キャップでカートリッジを密栓した。そのカートリッジを次に 3 0 で 2 0 日間インキュベートした。充填後、試料の残りを対照試料として役立てるための 4 0 でインキュベートした。これらの試料のインビトロ活性を、実施例 1 1 に記載の方法を用いて、3 0 での 2 0 日間のインキュベーションの後に測定した。これらの試料の活性を、ゼロ時間での対応する対照試料と比較した。下の表 X I I に示すように、P B S 中の 5 0 μ g / m l の r F S H 試料、P B S および 3 . 1 5 m g / m l のクレゾール中の 2 0 0 μ g / m l の試料はカートリッジ中で安定である (カートリッジ 1 およびカートリッジ 4) 。これ等の試料は 3 0 での 2 0 日のインキュベーションの後に完全に活性のままである。しかしながら、N a C l を含まないリン酸塩緩衝液中の試料はこれらの条件下で力価が小さい。リン酸塩緩衝液および 1 . 6 % グリセロール中の r F S H 試料の活性は対照の活性に比べて減少する (カートリッジ 2 およびカートリッジ 3)

30

40

【 0 1 5 2 】

【表 8】

表 X I I 3 0 での 2 0 日間カートリッジ中でインキュベートした保存および非保存試料のインビトロ活性

試料	試料条件	比力価
カートリッジ1	200 μ g/ml rFSH 変異体, 3.15mg/ml m-クレゾール PBS,pH7.4	1.06
カートリッジ2	200 μ g/ml rFSH 変異体, 1.6%グリセロール PB,pH7.4	0.81
カートリッジ3	50 μ g/ml rFSH 変異体, 1.6%グリセロール,3,15mg/ml m-クレゾール,PB,pH7.4	0.60
カートリッジ4	50 μ g/ml rFSH 変異体, PBS,pH7.4	1.10

10

20

【0153】

これらの実施例により証明されるように、記載した方法および技術に従い、FSHまたはFSH変異体の驚くほど安定な組成物および製剤を作り出すことができる。これらの組成物および製剤は今特許請求する製品の開発をもたらす。およそ1970以降、製品に印刷された情報は、品物(item)および発明が新規性および進歩性などの法律の他の要件を全体として満足する限り、特許性の判断から、その製品が除外されるものではないと判示している。従来教示されているFSHまたはFSH変異体の製品は、24時間またはそれ以上使用のために安定な現在特許請求する製品とは異なって、そのような溶液は即時使用のためにのみ適しており、使用後は中味は捨てなければならないということを明白に教示している。本発明の製品は従来技術と区別され、異なる、新規で進歩性のある発明を包含する。

30

【0154】

本発明の原理、好ましい態様および操作様式を明細書に記載した。しかしながら保護されることを意図する発明は、開示した個々の形態に限定されると解釈すべきではない。何故ならそれらは限定ではなく説明とみなすべきであるからである。本発明の精神から逸脱することなく変形や変化が当業者によりなされ得る。

【0155】

実施例9

保存および非保存FSH変異体試料の製剤安定性

リン酸塩で緩衝した食塩水(PBS, Dulbecco, GIBCO)中の約1mg/mlの組換えFSH変異体(サブユニット配列番号5; サブユニット配列番号11)のストック溶液を、PBSまたはm-クレゾールを含むPBSで50 μ g/mlまたは20 μ g/mlまで希釈し、m-クレゾール濃度を3.15mg/mlとした。同様に他の試料の組を保存剤として10mg/mlのベンジルアルコールを用いて製造した。保存および非保存溶液の1mlアリコート、プラスチックのエッペンドルフ管中で3月まで、4、22、37でインキュベートした。様々な時点で、PBSで平衡化したSuperdex 75ゲル濾過カラム(Pharmacia)中にアリコートを注入し、常温で、0.07ml/分の流速および操作時間35分で実験した。検出は214nmでのUV吸収によりモニターした。ピー

40

50

ク面積を積分し、ヘテロダイマーのパーセントを、ダイマーおよびモノマーピークの全面積に対するヘテロダイマーピーク面積の割合として計算した。表IXに示すように、室温またはそれ以下の温度での3月のインキュベーションの後に、様々な溶液条件下で最小のヘテロダイマーの解離があった。50%を超えるヘテロダイマーが37℃での3月のインキュベーションの後に無傷で残る。ヘテロダイマーの安定性は溶液濃度が高いほど大きい。

【0156】

【表9】

SE-HPLCでモニターしたrFSH変異体のヘテロダイマーの安定性

試料	ダイマー (%)					
	1月			3月		
	4℃	22℃	37℃	4℃	22℃	37℃
20 μg/ml(PBS 中)	100	100	88.9	100	100	77.3
20 μg/ml(PBS 中) 3.15mg/ml m-クレゾール	100	100	86.2	100	100	64.6
20 μg/ml(PBS 中) 10mg/ml ベンジルアルコール	100	100	89.1	100	100	57.1
50 μg/ml(PBS 中)	100	100	100	100	100	81.1
50 μg/ml(PBS 中) 3.15mg/ml m-クレゾール	100	100	90	100	100	75.7
50 μg/ml(PBS 中) 10mg/ml ベンジルアルコール	100	100	87	100	100	61.0

10

20

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> FSH AND FSH VARIANT FORMULATIONS, PRODUCTS AND METHODS

<130> X12383M Sequence Listing

<140>

<141>

<150> 60/093906

<151> 1998-07-23

10

<150> 60/094611

<151> 1998-07-30

<150> 60/094767

<151> 1998-07-31

<150> 60/098711

<151> 1998-09-01

<150> 60/100696

<151> 1998-09-17

20

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 96

<212> PRT

<213> mammalian

<400> 1

Phe	Pro	Asp	Gly	Glu	Phe	Thr	Met	Gln	Gly	Cys	Pro	Glu	Cys	Lys	Leu
1				5					10					15	

30

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				

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

10

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

20

30

100 105 110

<210> 7
<211> 96
<212> PRT
<213> mammalian

<400> 7
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

10

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

20

<210> 8
<211> 111
<212> PRT
<213> mammalian

<400> 8
Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Thr Val Glu Lys Glu Glu
1 5 10 15

30

Cys Asn 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 Asn Ile Gln
35 40 45

Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Lys 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

Glu 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 Ser Glu Met Lys Glu
 100 105 110

<210> 9
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> mammalian

10

<400> 9
 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

20

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> 10
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> mammalian

30

<400> 10
 Arg Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Thr Val Glu Lys Glu Glu
 1 5 10 15

Cys Ser 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 Asn Ile Gln
35 40 45

Lys Ala Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Lys 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

Glu Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Arg Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val
85 90 95

10

Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Ser Asp Ile Arg Glu
100 105 110

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu
1 5 10 15

20

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

30

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
100 105

<210> 12

<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

10

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
100 105

20

<210> 13
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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
 100 105 110

<210> 14
 <211> 276
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 gctcctgatg tgcaggattg cccagaatgc acgctacagg aaaaccatt cttctcccag 60
 ccgggtgccc caatacttca gtgcatgggc tgctgcttct ctagagcata tcccactcca 120
 ctaaggtcca agaagacgat gttggtccaa aagaacgtca cctcagagtc cacttgctgt 180
 gttagctaaat catataacag ggtcacagta atgggggggt tcaaagtgga gaaccacacg 240
 gcgtgccact gcagtacttg ttattatcac aaatct 276

10

<210> 15
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 aatagctgtg agctgaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc 60
 ataagcatca acaccacttg gtgtgctggc tactgctaca ccagggatct ggtgtataag 120
 gaccagcca ggcccaaaat ccagaaaaca tgtaccttca aggaactggt atatgaaaca 180
 gtgagagtgc ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacatacc agtggccacc 240
 cagtgtcact gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggctgggg 300
 cccagctact gctcctttgg tgaa 324

20

<210> 16
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 aatagctgtg agctgaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc 60
 ataagcatca acaccacttg gtgtgctggc tactgctaca ccagggatct ggtgtataag 120
 gaccagcca ggcccaaaat ccagaaaaca tgtaccttca aggaactggt atatgaaaca 180
 gtgagagtgc ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacatacc agtggccacc 240
 cagtgtcact gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggctgggg 300
 cccagctact gctcctttgg tgaaatg 327

30

<210> 17
 <211> 330
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

aatagctgtg agctgaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc 60
ataagcatca acaccacttg gtgtgctggc tactgctaca ccagggatct ggtgtataag 120
gacccagcca ggcccaaat ccagaaaaca tgtacctca aggaactggt atatgaaaca 180
gtgagagtgc ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacataccc agtggccacc 240
cagtgtcact gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggctgggg 300
cccagctact gtcctttgg tgaatgaaa 330

```

<210> 18

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 18

```

aatagctgtg agctgaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc 60
ataagcatca acaccacttg gtgtgctggc tactgctaca ccagggatct ggtgtataag 120
gacccagcca ggcccaaat ccagaaaaca tgtacctca aggaactggt atatgaaaca 180
gtgagagtgc ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacataccc agtggccacc 240
cagtgtcact gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggctgggg 300
cccagctact gtcctttgg tgaatgaaa gaa 333

```

<210> 19

<211> 276

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Modified to facilitate cloning.

<400> 19

```

gctcctgatg tgcaggattg cccagaatgc acgctacagg aaaaccatt cttctcccag 60
ccgggtgccc caatacttca gtgcatgggc tgctgcttct caagagcata tcccactcca 120
ctaaggcca agaagacgat gttggtccaa aagaacgca cctcagagtc cacttctgt 180
gtagctaaat catataacag ggtcacagta atggggggtt tcaaagtgga gaaccacacg 240
gcgtgccact gcagtacttg ttattatcac aaatct 276

```

30

<210> 20

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Modified to facilitate cloning.

<400> 20

```

aacagctgtg agctcaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc 60
atatcgatca acaccacttg gtgtgctggc tactgctaca ccagggatct ggtgtataag 120
gacccggccc gtcccaaat ccagaaaaca tgtacctca aggaactggt atatgaaaca 180
gtacgcgtgc ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacataccc agtggccacc 240
cagtgtcact gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggctgggg 300
cccagctact gtcctttgg tgaatgaaa 324

```

40

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/094,767
(32)優先日 平成10年7月31日(1998.7.31)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/098,711
(32)優先日 平成10年9月1日(1998.9.1)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/100,696
(32)優先日 平成10年9月17日(1998.9.17)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100156111
弁理士 山中 伸一郎

(74)代理人 100162695
弁理士 釜平 双美

(72)発明者 ジェイムズ・アーサー・ホフマン
アメリカ合衆国46143インディアナ州グリーンウッド、ウッドランド・ストリームズ・ドライブ4272番

(72)発明者 ル・ジロン
アメリカ合衆国46326インディアナ州インディアナポリス、バンクーバー・コート6232番

審査官 福井 悟

- (56)参考文献 特開平01-301696(JP,A)
国際公開第97/017087(WO,A1)
特表平07-509719(JP,A)
米国特許第05661125(US,A)
特開平08-283176(JP,A)
Syed M. Amir, ENDOCRINE RESEARCH COMMUNICATIONS, 1981年, Vol.8, No.2, Pages 83-95
M. Pimpalkhute, J. Radioanal. Nucl. Chem. Letters, 1986年, Vol.103, No.2, Pages 105-116

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 38/24
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)