

發明專利說明書

200538465

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：94108382

※申請日期：94.3.18

※IPC 分類：

C07K 14/59  
C12N 15/16

一、發明名稱：(中文/英文)

促卵泡成熟激素超促效劑/FOLLICLE STIMULATING HORMONE SUPERAGONISTS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

特洛佛根股份有限公司/TROPHOGEN, INC.

代表人：(中文/英文)

溫特勞勃 布魯斯 D./WEINTRAUB, BRUCE DALE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國馬里蘭州洛克市·塔福特巷6號150室

6 Taft Court, Suite 150, Rockville, MD 20850, USA

國籍：(中文/英文)

美國/USA

三、發明人：(共 2 人)

姓名：(中文/英文)

1. 茲庫德琳斯基 瑪瑞伍茲 W./SZKUDLINSKI, MARIUSZ W.

2. 溫特勞勃 布魯斯 D./WEINTRAUB, BRUCE D.

國籍：(中文/英文)

美國/USA

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國; 2004,03,19; 60/554,419

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

#### 發明領域

本發明係關於具備超促效劑活性之經改質促卵泡成熟  
 5 激素(FSH)，及其用於治療與醣蛋白激素活性有關之症狀。  
 更特別的是，本發明係關於經改質之FSH分子，相較於野  
 生型FSH，含有二或以上的胺基酸取代，其中這類經改質  
 FSH分子，相較於野生型FSH，藥理學特性增強。

### 【先前技術】

#### 10 發明背景

Follitropin(促卵泡成熟激素，FSH)與絨毛膜性腺激素  
 (CG)、lutropin(黃體生成素，LH)，以及thyrotropin(促甲狀  
 腺激素，TSH)組成醣蛋白激素家族。每種激素均為異二聚  
 體，包含兩非共價聯結次單元： $\alpha$ 與 $\beta$ 。相同物種之中，所  
 15 有激素的 $\alpha$ -次單元胺基酸序列均相同，然而 $\beta$ -次單元的胺基  
 酸序列則有激素特異性(Pierce, J. G.與Parsons, T. F.  
 “Glycoprotein hormones: structure and function.” Ann. Rev.  
 Biochem. 50: 465-495(1981))。由魚類乃至哺乳類之次單元  
 序列高度保留的情形看來，這些激素可能由同一先驅蛋白  
 20 演化而來(Fontaine Y-A.與Burzawa-Gerard, E. “Esquisse de  
 l'evolution des hormones gonadotropes et thyreotropes des  
 vertebrales.” Gen. Comp. Endocrinol. 32: 341-347(1977))。

重組follitropin蛋白已用於某些治療，例如用於治療病  
 患之不孕(Lathi與Milki, “Recombinant gonadotropins,” Curr

Womens Health Rep. 1(2) : 157-63(2001))。此激素已用於女性之誘發排卵，同時亦用於低性腺激素azoospermic男性之精子生成(Bouloux等人，"Induction of spermatogenesis by recombinant follicle-stimulating hormone(puregon)in hypogonadotropic azoospermic men who failed to respond to human chorionic gonadotropin alone," J Androl. 24(4) : 604-11(2003))，改善紊亂之精液成分(Haidl等人，"Drug treatment of male fertility disorders," Asian J Androl. 2(2) : 81-5(2000))，並治療與睪固酮濃度下降有關之症狀(請見 U.S. Patents Nos. 5,574,011與6,562,790，併附於參考資料中)。女性對外加FSH治療之反應因人而異，某些已證實針對標準治療法反應不佳(必須調整FSH劑量)，且有些證實有卵巢過度刺激症候群(Perez等人，"Ovarian response to follicle-stimulating hormone(FSH)stimulation depends on the FSH receptor genotype," J Clin Endocrinol Metab. 85(9) : 3365-9(2000))。所需要的是改質FSH衍生物以增加活性，並促進反應不良者之治療，雖然病患以低劑量治療易有卵巢高度刺激效果。

## 【發明內容】

### 20 發明概要

本發明包含經改質之FSH蛋白及其譯碼之核酸，其中經改質蛋白之活體外與活體內生物活性，相較於野生型FSH，有實質性增加。特別的是，相較於野生型FSH，本發明之經改質類似物證實有驚人的藥理特性強化效果，包括

藥效與Vmax(效能)。此外，本發明之經改質類似物大大地增加該處理動物卵母細胞、囊胚與胚胎之量與質。本發明之類似物從而提供一種長效性溶液，針對各種不孕症病患，包括婦女於體外授精後(IVF)之反應不良、無法進行IVF之婦女、FSH受體數量過低之婦女以及FSH受體突變而不孕之婦女。

本發明之經改質FSH分子包含至少一經改質之 $\alpha$ -次單元，其FSH外環含有至少兩個位置之突變，使得此經改質之FSH，相較於野生型FSH或單一特定突變位置FSH，具備較高之效用。典型而言，本發明之經改質FSH蛋白，相較於野生型FSH，證實其效能至少增加約十倍，其中較佳之 $\alpha$ -次單元突變包含有至少兩個鹼性胺基酸，相當於SEQ ID No.1之13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81等位置。

本發明之經改質FSH蛋白更包含有一經改質之 $\beta$ -次單元，特別是含有至少一鹼性胺基酸之經改質 $\beta$ -次單元，相當於SEQ ID No.2之2、4、14、63、64、67與69之任一位置。本發明之經改質FSH蛋白亦證實，相較於野生型FSH，可升高或降低其於血清中之半衰期，或降低其於血清中之半衰期。欲升高血清中之半衰期，可透過聚乙二醇化作用、利用潛在之醣化作用位置或其他方法。

本發明亦包括協助個體生育之方法，包含有投予一輔助量之本發明經改質FSH，例如以活體外授精法或人工授精法，或其他可誘發排卵或精子生成之方法。同時亦包括

與女性醣蛋白激素活性相關症狀之診斷與給藥方法，包括排卵異常(ovulatory dysfunction)、黃體功能不足(luteal phase defect)、時限性受孕(time-limited conception)、FSH受體表現量低、FSH受體結合性與/或偶合性缺乏、腦垂體衰退或損傷、不明原因性不孕症(unexplained infertility)與卵巢癌，但不侷限於此。本發明之經改質FSH蛋白特別適用於治療女性之卵巢過度刺激，其中半衰期最長之類似物可於女性週期之早期投予，而半衰期較短者可於周期之後期投予，以防止或降低卵巢過度刺激症候群(OHHS)之可能。同時亦包括與男性醣蛋白激素活性相關症狀之診斷與給藥方法，包括男性因素不孕症(male factor infertility)、腦垂體衰退或損傷、雄性禿頭、睪丸癌以及任何與睪固酮生成量不足有關之症狀。

#### 圖式簡單說明

15 第1A-E圖顯示各種單一突變與野生型(WT)FSH活體外生物活性效用之比較，其測定係利用短暫轉染CHO-FSHR細胞。

第2圖顯示於轉染CHO-FSHR細胞中 $\beta$  E4R突變對hFSH產生之影響。

20 第3A與3B圖顯示各種突變組合之FSH於活體外生物活性效用之比較，其測定係利用短暫轉染CHO-FSHR細胞。

第4A與B圖顯示大鼠與人類LHR之FSH類似物與野生型FSH之交叉反應比較。第4A圖顯示FSH TR-4402與大鼠黃體生成激素受體間之交叉反應。第4B圖顯示FSH TR-4402

與人類黃體生成激素受體間並無交叉反應。

第5圖係FSH結構圖，顯示 $\alpha$ 與 $\beta$ -次單元具有環的結構。

第6A與B圖分別顯示CHO細胞針對純化之類似物TR-4402與野生型FSH，以及純化之類似物TR-4401與野生型FSH之cAMP產量比較。

第7圖顯示KGN細胞針對純化之類似物TR-4402與野生型FSH之cAMP產量比較。

第8圖顯示GLHR-15細胞針對純化之類似物TR-4402與野生型FSH之cAMP產量比較。

第9圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下卵泡之存活率，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第10圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下竇之形成，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第11A圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下COC之黏液化作用，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。第11B圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下hCG刺激之卵母細胞釋出率(%)，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第12圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下以PB穿壁方式測定卵母細胞細胞核成熟度，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第13A與B圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)(13A)與類

似物TR-4402(化合物#4)(13B)存在下黃體激素之產生，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第14A-D圖顯示利用未成熟雌性Sprague-Dawley大鼠(Steelman與Pohley，1953)進行Steelman-Pohley生物分析之結果。第14A、C與D圖為比較TR-4402與野生型(Follistim)所得卵巢重量之差異。第14B圖為生物分析期間TR-4402與野生型FSH血清濃度之比較。

第15圖係處理類似物TR-4402與處理野生型FSH(Follistim)大鼠卵巢內雌性激素含量之比較。

第16圖係大鼠以相同劑量之野生型FSH(Follistim)與類似物TR-4402刺激後之血清中抑制素B濃度。

第17A與B圖顯示FSH類似物TR-4901、TR-4401與TR-4402相較於野生型FSH之排除與吸收情況。

第18圖顯示用以延長FSH類似物半衰期之N-端延長(SEQ ID Nos. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11與12)。

第19圖係以CHO細胞處理LA1-4402(TR-4402之進一步改質以增加FSH之血清半衰期)、LA1 FSH(FSH改質以增加其血清半衰期)、TR-4402與野生型FSH後cAMP產量之比較。

第20圖係比較處理LA1-4402(TR-4402之進一步改質以增加血清半衰期)、野生型FSH(Follistim)與單獨hCG時活體內排卵數目增加情形。

第21圖係比較處理TR-4401與野生型FSH(Gonal F)後活體內卵母細胞總數之增加情形。

第22圖係比較處理TR-4401與野生型FSH(Gonal F)後

活體內卵母細胞受精率之增加情形。

第23圖係比較處理TR-4401與野生型FSH(Gonal F)後活體內囊胚形成率之增加情形。

第24圖係比較處理TR-4401與野生型FSH(Gonal F)後活體內胚胎總數之增加情形。

### 【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

本發明提供經改質“超活”FSH分子，相較於野生型FSH，顯示具備驚人之促進效果。“經改質”意謂蛋白所含之一胺基酸序列不同於野生型FSH，而整體序列未變動，故與其他物種之習知FSH序列一致。“超活性”可依據多種參數評估，包括效能與療效。“效能”為一生物活性參數，其決定係透過測量半最大反應(half maximal response)。“效能”差異之決定，係比較類似物與野生型FSH兩者之FSH反應基線與最大( $EC_{50}$ )之中間值。FSH之反應係以純化之蛋白或短暫轉染核酸並譯碼經改質蛋白之方式進行活體外反應。FSH之反應亦可以活體內方式測定，亦即以動物對該FSH類似物之反應。這類反應包含任何習知之FSH結合至其受體之細胞性或生物性以及定量或定性反應，亦即cAMP產生、蛋白如黃體激素之合成、受精率、囊胚形成率、每一受精卵之胚胎發育等。

“療效”(Vmax)或最大反應係另一生物活性參數。如本文所及，生物活性參數依分析細胞株之受體數目與受體偶合而有不同。在低受體數目或偶合減弱之系統，Vmax(療效

)之差異較易察覺。在受體過度表現之系統，效能之差異較明顯。

活體內定量或定性參數例如卵母細胞數量、受精率以及囊胚與胚胎形成率可於最大有效劑量之卵母細胞數目階段測定。最大有效劑量時之卵母細胞數為超活FSH定性與定量之最理想卵母細胞數量。最大有效劑量時之卵母細胞數目有賴於動物之體重及代謝率。舉例而言，較大型動物之代謝率較慢，其最大有效劑量遠大於較小型動物，因其代謝率較快。每種動物之最大有效劑量之決定依經驗而定。

然而，無論所使用之系統為何，本發明之經改質超活FSH蛋白證實，相較於野生型FSH，效能至少增加約10倍，更佳之情況為，效能至少增加約20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或甚至100倍，或者，相較於野生型FSH，最大療效增加約10%，更佳之情況為，增加至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或甚至100%。本發明之超活類似物，相較於野生型FSH，亦提供效能增加約5至10倍，或者最大療效增加約5%至10%。本發明之某些經改質蛋白證實，相較於野生型FSH，至少效能增加約30至50倍，或者最大療效增加約30%至50%。因此，本發明之經改質FSH蛋白特別適用於治療低受體數目或受體反應缺失之病患，因本發明之經改質蛋白，針對低受體數目或反應之系統，至少維持10倍效能或10%最大療效之增加。

經改質超活FSH之吸收率影響了反應期之延長或縮短。吸收率增加且反應期縮短之經改質FSH類似物有利於過敏患者之過度刺激綜合症。吸收率以Ka測定。排除率以Ke測定。

5 本發明之經改質FSH分子所包含經改質蛋白之物種，係選自於包含人類、牛、馬、豬、羊、鼠類、大鼠、兔、靈長類、魚類等之族群。魚類FSH(亦稱為GTH-1)可用於水族生物，亦即，為了挽救瀕臨絕種或其他魚種。其他種類之經改質FSH可用於農業培植，而實驗室中則探討不同突變配對於各種雄性與雌性醣蛋白激素有關症狀之影響。其他物種之經改質FSH分子之取代位置等同於本文中所揭示之該經改質人體FSH分子，其可藉由任何序列比對程式確認，包括DNASIS、ALIONment、SIM以及GCG軟體如Gap、BestFit、FrameAlign與Compare，但不侷限於此。

15 本發明之經改質人體FSH分子包含有至少一個經改質之 $\alpha$ -次單元，其中此 $\alpha$ -次單元包含有至少兩個鹼性胺基酸，其位置相當於野生型人體FSH $\alpha$ 之13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81等位置(SEQ ID No.1)。本發明之經改質蛋白亦包含有一個經改質之 $\beta$ -次單元，其中此 $\beta$ -次單元包含有至少一個鹼性胺基酸，其位置相當於野生型人體FSH $\beta$ 之2、4、14、63、64、67與69等位置(SEQ ID No.2)。

20 本發明之經改質蛋白亦包含其他取代，特別是保留性取代，其不改變增加之蛋白特性。然而，典型而言，此經改質蛋白將含有少於五個位置之取代，而非以上所列，並表

現與野生型FSH  $\alpha$ 與 $\beta$ 相同且完整的胺基酸序列，而非以上所列位置。

鹼性胺基酸包含有離胺酸(lysine)、精胺酸(arginine)與組胺酸(histidine)，以及任何其他鹼性胺基酸，包括任何這  
5 三個胺基酸之改質作用、非正常存在自然界之合成鹼性胺基酸、或者任何在中性pH條件下帶正電之胺基酸。其中，較佳之鹼性胺基酸係選自於包含離胺酸與精胺酸之族群。

具備二鹼性胺基酸取代位置之經改質FSH範例包括 $\alpha$ -次單元14與66位置取代之蛋白，特別是E14R與N66R， $\alpha$ -  
10 次單元之14與73位置，特別是E14R與G73R， $\alpha$ -次單元之16與20位置，特別是P16R與Q20R，以及 $\alpha$ -次單元之20與21位置，特別是Q20R與P21R，但不侷限於此。

本發明之經改質FSH蛋白亦具備包含三個鹼性胺基酸取代之 $\alpha$ -次單元，其位置係選自於包含13、14、16、17、  
15 20、21、22、66、68、73、74與81等位置之族群。此類經改質蛋白包括配對之取代位置16、20與21，特別是P16R、Q20R與P21R，位置14、20與73，特別是E14R、Q20R與G73R，位置66、73與81，特別是N66K、G73K與A81K，位置14、66與73，特別是E14R、N66R與G73R，以及位置14、21  
20 與73，特別是E14R、P21R與G73R，但不侷限於此。

本發明之經改質FSH蛋白亦具備包含四個鹼性胺基酸取代之 $\alpha$ -次單元，其係位於位置選自於包含13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81等位置之族群。此類經改質蛋白包括配對之取代位置13、14、16與20，特別

是Q13R、E14R、P16R與Q20R之配對，以及Q13K、E14K、P16K與Q20K之配對，但不侷限於此。

本發明之經改質FSH蛋白亦具備包含五個鹼性胺基酸取代之 $\alpha$ -次單元，其位置係選自於包含13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81等位置之族群。此類經改質蛋白包括配對之取代位置14、20、21、66與73，特別是E14R、Q20R、P21R、N66R與G73R，以及位置14、16、20、66與73，特別是E14R、P16R、Q20R、N66R與G73R，但不侷限於此。

10 本發明之經改質FSH蛋白亦具備包含六個鹼性胺基酸取代之 $\alpha$ -次單元，其位置係選自於包含13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81等位置之族群。此類經改質蛋白包括配對之取代位置13、14、16、20、66與73，特別是Q13K、E14K、P16K、Q20K、N66K與G73K，以及  
15 位置14、16、20、21、66與73，特別是E14R、P16R、Q20R、P21R、N66R與G73R，但不侷限於此。

本發明特別有效之經改質 $\beta$ -次單元包含有一鹼性胺基酸，相當於SEQ ID No.2之位置4，更特別的，為E4R。取代作用使FSH的效能與表現量明顯增加。本發明人發現，當  
20 配合本文中所揭示之其他取代作用時，此種突變使重組之FSH蛋白產量增加2-3倍。

#### FSH超促效劑之設計

本發明所包含之超促效劑，其設計係用於比較吾人有興趣的各物種 $\alpha$ 與 $\beta$ FSH胺基酸序列，以確認FSH蛋白之鹼性

胺基酸。此類方法揭示於U.S. 6,361,992，併附於參考資料中。亦須考量各物種FSH之相對活性，以歸納並決定所欲比較與取代之物種。此外，基於相關醣蛋白激素之同源模擬亦可用於確認暴露於表面之胺基酸。

5 因此，本發明亦提供一種經改質FSH蛋白，在相同物種，具備優於野生型FSH蛋白之效能，其中此經改質FSH包含有一鹼性胺基酸取代位置，相當於其他物種FSH蛋白上之相同位置並具有優於野生型FSH蛋白之效能。本發明醣蛋白之經改質以增加效能者，可源自非人類物種。舉例而言，可以比較豬FSH與牛FSH，以設計豬FSH蛋白，並以兩者序列不同之處為胺基酸取代位置，並構築胺基酸更動之豬FSH蛋白，接著投予此經改質豬FSH於豬隻身上。或者，可改質牛的FSH。

15 本發明亦提供一種經改質FSH蛋白，對於相同物種而言，具備優於野生型FSH之效能，其中此經改質FSH包含有一鹼性胺基酸取代位置，相當於同一物種之不同醣蛋白激素之相同胺基酸位置，並具有優於野生型醣蛋白激素之效能。舉例而言，可比較人體FSH之 $\beta$ -次單元與人體絨毛膜性腺激素，而FSH  $\beta$ -次單元之胺基酸取代反應可依據兩者間之任何序列差異。當然，只有那些可增加經改質FSH效能的改變會列入考量，因為激素受體特異性仍必須維持。

20 為了改質其他胺基酸位置，人體或非人體醣蛋白激素序列可利用標準電腦軟體程式如DNASIS(Hitachi Software Engineering Co. Ltd.)或任何其他上述之比對軟體，包括

ALIONment、SIM以及GCG軟體如Gap、BestFit、FrameAlign與Compare，但不侷限於此。人體或非人體醣蛋白激素之間具有差異之胺基酸可利用其中一種上述之方法進行取代，並利用其中一種本文所提及之分析方法分析所產生醣蛋白

5 激素之效能。

本發明亦包含類似物片段，其具備超促效劑或拮抗劑活性。舉例而言，本發明之經改質 $\alpha$ 鏈片段可單獨使用或配合一片段或整段 $\beta$ 鏈，以製成超促效劑化合物。同樣地，本發明之經改質 $\beta$ 鏈片段可單獨使用或配合一片段或整段 $\alpha$ 鏈

10 ，以製成超促效劑化合物。在某些情況，本發明之經改質FSH分子片段亦可作為拮抗劑，例如，在FSH投藥治療後限制其反應期。

本發明亦包含單鏈類似物以及包含本文所述類似物突變區域之嵌合(chimeric)蛋白。舉例而言，本發明人認為，

15 雙活性絨毛膜性腺激素之 $\alpha$ -次單元併入超效能取代位置，造成黃體激素與卵泡成熟激素兩者活性增加3-5倍，顯示雙活性絨毛膜性腺激素之內在活性可進一步因本發明之結合取代作用而強化。雙活性絨毛膜性腺激素之構築描述於US

4,237,224，併於參考資料中。

## 20 FSH超促效劑之特性

本文中所述野生型FSH經改質之效用可以任何方式加以確認。舉例而言，以經改質醣蛋白之編碼核酸轉染細胞所產生環AMP(cAMP)之測定，並相較於野生型醣蛋白激素之轉染細胞。或者，測定經改質醣蛋白轉染細胞黃體激素

之產量，並相較於野生型醣蛋白激素之轉染細胞。或者，以受體結合分析、胸腺嘧啶攝入分析或T4釋出分析決定經改質醣蛋白激素之活性。此類分析經改質醣蛋白激素活性之特殊範例示於本文範例部分。熟習此技術領域者可立即決定任何適用之試驗方法，以決定野生型或經改質醣蛋白

5 5 激素之活性。

本發明之一實施例中，經改質醣蛋白激素具備一效能，其增加幅度大於野生型醣蛋白激素至少約10倍。此效能增加之評估可利用任何前面提及與範例中描述之技術，或者習知技藝中任何適用之試驗立即決定。各種分析或細胞株間之效能增加情形毋須一致，並具有變化。本發明經改質FSH分子已證實效能較野生型增加了至少約20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或甚至100倍，係利用細胞株表現不同量之反應性FSH受體而得。

15 15 本發明之另一實施例中，經改質醣蛋白激素具備一最大療效，其增加較幅度大於野生型醣蛋白激素至少約10%。此最大療效增加之評估可利用任何前面提及與範例中描述之技術，或者習知技藝中任何適用之試驗立即決定。各種分析或細胞株間之最大療效增加情形毋須一致，並具有

20 20 變化。本發明經改質FSH分子已證實最大療效較野生型增加了至少約10%，至少約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或甚至100%，係利用細胞株表現不同量之反應性FSH受體而得。

適用於鑑定本文所示類似物之其他試驗係揭示於

PCT/US99/05908，併附於參考資料中。例如，可使用各種免疫分析，包括競爭性與非競爭性系統，如輻射免疫分析、ELISA、夾層免疫分析、免疫輻射計量分析、膠體擴散沉澱反應、免疫擴散分析、原位免疫分析、西方墨點、沉澱反應、膠合分析、補體固化分析、免疫螢光分析、蛋白A分析與免疫電泳分析等，但不侷限於此。

卵母細胞質與量之改善情形，可以活體外與活體內分析法進行評估。常見的卵母細胞質與量改善方式係利用活體外授精法之不同指標，如卵母細胞形成、卵母細胞受精與囊胚形成。活體外授精實驗係依據“超排卵法”，其中個體以本發明之超活FSH類似物處理，可使多個卵母細胞釋出及成熟。在活體外授精實驗中，FSH(超FSH與重組野生型FSH)可配合hCG投予以引發排卵。可採用一組動物控制組，其僅接受hCG或孕馬血清促性腺激素(PMSG)。

動物體內卵母細胞品質的改善係增加其受精率。活體外或活體內超活促卵泡成熟激素受精率之決定，係比較超活FSH與相同量重組野生型FSH所達成之受精率。亦可採用接受hCG之控制組動物。

受精率之測定係以二細胞胚胎於總卵母細胞數中發育之百分比決定。若受精作用於活體外發生，則二細胞胚胎可於受精培養盤內計算出。在小鼠身上，二細胞胚胎大約在受精後二十四小時發育。

受精率依據投予之超活FSH量而變。動物可接受多種超活FSH劑量。卵母細胞投予最大有效劑量之超活FSH時，

受精率增加至少約10%。卵母細胞投予最大有效劑量之超活FSH，受精率可增加至少約20%，較佳之情況為，至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

5 超活促卵泡成熟激素可改善卵母細胞的質，係促進每一受精卵中囊胚形成率。囊胚形成率係測定二細胞胚胎形成囊胚之百分比。無論囊胚於活體外或活體內形成，其形成率均增加。囊胚形成率取決於所投予超活促卵泡成熟激素之量。卵母細胞投予最大有效劑量之超活促卵泡成熟激素時，受精率增加至少約10%。卵母細胞投予最大有效劑量之超活促卵泡成熟激素時，受精率可增加至少約20%，較佳之情況為，至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

15 超活促卵泡成熟激素可改善卵母細胞的品質，係增加每一受精卵中胚胎總數。囊胚形成率係測定二細胞胚胎形成囊胚之百分比。無論活體外或活體內受精，其每一受精卵中胚胎總數均增加。每一受精卵中胚胎總數之增加取決於所投予超活促卵泡成熟激素之量。卵母細胞投予最大有效劑量之超活促卵泡成熟激素時，每一受精卵中胚胎總數增加至少約10%。卵母細胞投予最大有效劑量之超活促卵泡成熟激素時，每一受精卵中胚胎總數可增加至少約20%，較佳之情況為，至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

超活FSH可用於改善動物卵母細胞之質與量，包括人類、小鼠、大鼠、靈長類、兔、豬、馬、羊與狗，但不侷

限於此。較佳之情況為，將一超活FSH投予人類。

#### FSH類似物之血清半衰期增加

本發明之經改質FSH蛋白可進一步改質，故相較於野生型FSH，其血清半衰期增加。例如，本發明之經改質FSH  
5 蛋白可進一步包含至少一具備醣化作用位置之序列，包括其 $\alpha$ 或 $\beta$ 鏈含有N-醣化作用與/或O-醣化作用位置之序列。提供潛在醣化作用辨識區之序列可為 $\alpha$ 或 $\beta$ 鏈上之N-端或C-端延長。本發明之經改質蛋白為 $\alpha$ 鏈上含有N-端延長之蛋白，係選自包含ANITV(SEQ ID No. 3)與ANITVNITV(SEQ ID  
10 No. 4)之族群。本發明之其他經改質蛋白為 $\beta$ 鏈上含有取代位置，其中該取代係選自包含Y58N與V78N之族群。

半衰期之增加亦可藉由其他適當化學基團之聚乙二醇化或共軛反應，或構築可增加半衰期之融合蛋白或任何其他方法而達成。這些方法可由習知技藝中得知，例如揭示之U.S. Patent 5,612,034、U.S. Patent 6,225,449與U.S.  
15 Patent 6,555,660，併附於參考資料中。半衰期之增加亦可藉由增加分子內帶負電胺基酸之數目，例如，穀胺酸與/或天冬胺酸之數目。此種改變可由定點突變方式達成，較佳之改變為選自包含 $\alpha$ 次單元A85E與A85D取代位置之族群。  
20 此改變亦可藉由插入含一或更多帶負電胺基酸序列於該經改質FSH中而達成，包括插入選自包含GEFT(SEQ ID No. 5)與GEFTT(SEQ ID No. 6)之族群。在一實施例中，其插入位置為 $\alpha$ 次單元，並選自包含APD-GEFT-VQDC(SEQ ID No. 7)與APD-GEFTT-QDC(SEQ ID No. 8)之族群。

蛋白質之半衰期為穩定度測量方法，顯示該濃度蛋白減少一半所需之時間。本發明經改質FSH分子血清中半衰期之決定，可由任何測量個體樣品FSH濃度隨時間變化之適用方法進行，舉例而言，利用抗-FSH抗體測量該經改質FSH投藥後血清樣品中，FSH隨時間變化之免疫分析法，或檢測標定之FSH分子，亦即放射線標定之分子，於投予標定FSH後個體之樣本，但不侷限於此。

#### FSH超促效劑之表現與/或合成

本發明亦包括譯碼為本發明經改質FSH  $\alpha$ 與 $\beta$ 次單元之核酸，以及表現該核酸之載體與宿主。核酸於不同宿主細胞中表現之適用啟動子(promoter)可由習知技藝中得知，並可依所使用之表現載體-宿主系統而相互變換。載體與宿主之示範例如U.S. 6,361,992所揭示，在此全部視為本發明之參考資料。

舉例而言，一旦有譯碼為特定醣蛋白激素之核酸，或核酸部分片段，被構築、改質或分離，則此核酸可被選殖至一適當載體，以進行野生型與/或經改質醣蛋白激素之活體外或活體內合成作用。此載體具有可進行或調控插入基因或混合基因轉錄作用所需之功能區。這些功能區包括，啟動子、啟動子上游或下游區，例如促進子(enhancer)可調節啟動子之轉錄能力、複製起點、適當之限制位(restriction site)以增進插入基因於啟動子附近之選殖、抗生素抗藥基因或其他標定物可作為細胞內載體或含插入基因之載體之選擇、RNA剪接點、轉錄作用終點，或任何可促進插入基

因或混合基因表現之區域，但不侷限於此(一般可見 Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed.(1989))。

已知有許多 *E. coli*(大腸桿菌)表現載體可用於表現選  
5 殖之核酸。其他適用之微生物宿主包括桿菌屬，例如枯草  
桿菌，及其他腸桿菌科，例如沙門氏菌、沙雷氏菌與各種  
假單胞菌屬。針對這些原核宿主，亦可設計其表現載體，  
其一般含有表現用之控制序列適用於該宿主細胞(例如，複  
製原位點)。此外，更含有眾多已知之啟動子，例如乳糖啟  
10 動子系統、色胺酸(Trp)啟動子系統、 $\beta$ -內醯胺酶啟動子系  
統及嗜菌體啟動子系統。這些啟動子基本上可控制表現，  
任擇地配合操作子序列，並具備核糖體結合區序列，舉例  
而言，以啟動並完成轉錄與轉譯作用。若有需要，可於下  
游核酸插入序列之氮端加入甲硫胺酸。同時，可利用標準  
15 寡核苷酸突變法移去核酸插入序列碳端之核酸。

此外，亦可使用酵母菌表現方式。酵母菌表現系統具  
有多種優點。首先，證據顯示酵母菌分泌系統所產生之蛋  
白具備正確的雙硫鍵配對。其次，酵母菌分泌系統可有效  
進行轉錄後醣化作用。酵母菌先-前- $\alpha$ -因子前導區(轉譯自  
20 MF-1基因)常用於導引蛋白由酵母菌中分泌出(Brake 等人，  
“varies.-Factor-Directed Synthesis and Secretion of Mature  
Foreign Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.” Proc. Nat.  
Acad. Sci., 81:4642-4646(1984))。先-前- $\alpha$ -因子前導區含有  
訊號序列與前-片段，其包括一辨識序列以供應由 KEX2 基

因轉譯之酵母菌蛋白酶之用：此酵素可切割Lys-Arg雙肽訊息序列碳端上之前驅蛋白。FSH辨識序列可融合至先-前- $\alpha$ -因子前導區。此構築體隨即置入由強轉錄啟動子如酒精脫氫酶I啟動子或糖解啟動子所控制之細胞內。核酸編碼序列

5 後接上轉譯終止密碼，其產生轉譯終止訊號。或者，核酸編碼序列可融合第二種蛋白之編碼序列，例如Sj26或 $\beta$ -半乳糖苷酶，以利融合蛋白之親和管柱層析純化。以酵母菌表現之構築體可插入蛋白酶切割區，以分離融合蛋白。有效的轉譯後醱化作用與重組蛋白表現亦可以桿狀病毒系統

10 (Baculovirus systems)進行。

哺乳類細胞之環境可使蛋白表現時較易進行重要的轉譯後改質作用，例如摺疊與半胱胺酸配對、加入複雜醱類結構以及具活性蛋白之分泌。哺乳類細胞胞具活性蛋白表現時之適用載體，其特徵在於將蛋白編碼序列插入強病毒

15 啟動子與聚腺苷酸化訊號之間。此類載體具有潮黴素(hygromycin)、慶大黴素(gentamicin)抗藥性基因，或其他適於作為選擇性標定物之基因或表現型，或甲胺葉呤(methotrexate)抗藥性用於基因放大。嵌合蛋白編碼序列可

20 置入中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株中，並使用編碼有甲胺葉呤抗藥性基因之載體，或其他選擇性標定物適用之細胞株。轉型細胞中載體DNA之存在可以南方墨點分析法確認。所產生相對於插入編碼序列之RNA可以北方墨點分析法確認。許多其他可分泌完整人類蛋白之適用細胞株可由習知技藝中得知，包括CHO細胞株、HeLa細胞、骨髓癌細胞株、

Jurkat細胞等。這些細胞的表現載體可包括表現控制序列，例如複製原位點、啟動子、增強子以及所需之訊息加工區，例如核糖體結合區、RNA切割區、聚腺苷酸作用區與轉錄作用終止序列。表現控制序列之範例係源自免疫球蛋白

5 基因、SV40、腺病毒、牛乳頭瘤病毒等之啟動子。含有所欲核酸片段之載體可以習知之方法轉移至宿主細胞，並依宿主細胞種類而變。舉例而言，氯化鈣轉型法常見於原核細胞，而磷酸鈣、DEAE葡聚糖以及微脂體(lipofectin)轉染或電擊等方法則適用於其他細胞宿主。

- 10 亦可使用其他載體於哺乳類細胞中進行基因表現，如用於表現人類 $\gamma$ -干擾素、組織血纖維蛋白溶酶原活化劑、凝血因子VIII、B型肝炎病毒表面抗原、蛋白酶Nexin1與嗜伊紅血球主要鹼性蛋白等之類似載體。另外，載體可包括CMV啟動子序列與聚腺苷酸作用訊號，以提供插入核酸於
- 15 哺乳類細胞(例如COS-7)中之表現。

- 基因或雜合基因之表現可於活體內或活體外進行。活體內合成包含有轉型至原核或真核細胞，其作為載體之宿主細胞。或者，基因之表現可發生於活體外之系統。舉例而言，活體外轉錄系統為商業上可購得，常用於合成較大
- 20 量之mRNA。在此類活體外轉錄系統中，編碼醣蛋白激素之核酸可選殖至一表現載體，其鄰接一轉錄啟動子。舉例而言，Bluescript II選殖與表現載體含有多重選殖位置，其連接強原核性轉錄啟動子(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif.)。組件為可獲得，其含有由DNA模板活體外合

成RNA所需之所有試劑，例如Bluescript載體(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif.)。由此活體外系統所產生之RNA，隨後利用活體外轉譯作用產生所欲之醣蛋白激素(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif.)。

- 5 另一種產生醣蛋白激素的方法則是利用蛋白化學合成技術將兩段胜肽或多胜肽連接在一起。舉例而言，胜肽或多胜肽可利用現有的實驗室設備進行化學合成，可使用Fmoc(9-芴甲氧羰基)或Boc(第三丁氧羰基)化學法(Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.)。熟習此技術領域者可
- 10 立即以標準化學反應進行雜合醣蛋白激素胜肽或多胜肽之合成。舉例而言，胜肽或多胜肽可被合成且不會由其合成樹脂上切除，然而其他雜合胜肽片段可被合成並隨即由樹脂上切除，因此露出一終端基團，其片段可受其他基團阻斷。經由胜肽縮合反應，此二片段可因碳端與氮端之共軛
- 15 聯結而形成胜肽鍵，並形成雜合之胜肽(Grant, G. A., "Synthetic Peptides: A User Guide," W. H. Freeman and Co., N.Y.(1992)and Bodansky, M and Trost, B., Ed., "Principles of Peptide Synthesis," Springer-Verlag Inc., N.Y.(1993))。或者，胜肽或多胜肽可依上述活體內方式單獨合成。一旦分
- 20 離後，這些單獨的胜肽或多胜肽可經由類似的胜肽縮合反應形成醣蛋白激素。舉例而言，經選殖或合成之胜肽片段其酵素或化學接合反應可使較短的胜肽連接成較大的胜肽片段、多胜肽或完整蛋白區域(Abrahmsen, L. 等人，Biochemistry, 30: 4151(1991); Dawson等人，"Synthesis of

Proteins by Native Chemical Ligation,” Science, 266 : 776-779(1994))。

本發明亦提供經改質醣蛋白激素片段，其具備超促效劑或拮抗劑活性。本發明之多胜肽片段可為重組蛋白，係由選殖編碼此多胜肽之核酸並於表現系統中獲得，可產生該多胜肽片段。舉例而言，吾人可決定經改質FSH蛋白與醣蛋白激素受體作用並可引起與醣蛋白激素相關生物效用之活性區域，與 $\beta$ 次單元結合。在某實施例中，已發現與活性、結合專一性或醣蛋白激素親和力無關之胺基酸片段可刪去，而不會失去特定活性。

例如，可將原型或經改質醣蛋白激素之胺基或羧基端之胺基酸移除，其特定活性可以上述數種試驗方式測定。在另一實施例中，本發明經改質蛋白質之一部分，不論是胺基或羧基端，甚至是中間區域，被多胜肽片段或其他片段取代，如生物素，其可幫助經改質醣蛋白激素之純化。例如，經改質醣蛋白可接至乳糖結合蛋白上，經由胜肽化學或是將此二胜肽片段轉殖至表現載體上，以表現所對應之區域，產生雜合蛋白質。該雜合蛋白質可經由親和性純化，通過乳糖親合管柱，之後可藉由蛋白質水解酶Factor Xa水解該雜合蛋白質(請見New England Biolabs 產品目錄，1996，第164頁)，而將該經改質醣蛋白自乳糖結合區域分離出。

本發明FSH活性片段可直接合成或將較大之醣蛋白激素經化學性或機械性破壞而得。活性片段之定義為某段胺

5 氨基酸序列，具有至少連續五個衍生自天然胺基酸之胺基酸，其具有相對活性，如結合或調節活性。該片段，不論是否有聯結至其他序列，亦可包含具有插入、刪去、取代或其他經選擇改質之特定區域或特定胺基酸殘基，不會明顯改變或降低活性，與經改質醣蛋白激素相較。這些改質可提供某些額外特性，如移除或加入可形成雙硫鍵之胺基酸，或是增加生物期。在任何情況下，該胜肽片段具有生物活性，如結合活性或在結合區域有結合調節能力。醣蛋白激素之功能或活性區域可經由將激素特定區域進行突變，

10 之後再表現並測試所表現之多胜肽而得知。此方法為熟習此領域者所熟知，並可包含將受體所對應之核酸進行點突變。

本發明亦可包括含有上述突變之融合蛋白或嵌合蛋白，包括，如融合至LH或CG之CTEP區域上。此種融合方法

15 可將代表所希望胺基酸之適當的核酸序列相接，以已知方法，在適當的譯碼區域中，並以上述方法表現該融合蛋白。或者，此種蛋白可經由蛋白質合成技術而得，如使用胜肽合成儀。本發明之單鏈類似物與嵌合蛋白可在 $\tilde{\alpha}$ 與 $\tilde{\beta}$ 次單元之間，或是嵌合蛋白的不同部分接上一胜肽聯結。

## 20 治療方法

本發明經改質FSH超促效劑可用於處理任何與醣蛋白激素活性有關之情況。“與醣蛋白激素活性有關”之情況為完全或部分由醣蛋白激素改變所引起之反應，或由注射醣蛋白激素而獲得之改善。例如，此情況包括，但不侷限於

，排卵異常、黃體功能缺陷、不明原因之不孕、男性因素之不孕、時間限制受孕、低FSH受體表現、低FSH受體敏感度、FSH受體結合缺陷、FSH受體偶合缺陷、低雄性激素產生、雄性禿頭，以及腦下垂體異常或損傷。

5 尤其是，將於此所述之超效FSH類似物注射入動物體內，卵母細胞在質與量上皆可獲得改善。例如，如此所報導的，申請人相當驚訝地發現注射含有在 $\alpha$ -次單元，位置為13、14、16與20之鹼性氨基酸經改質之超效FSH之後，卵母細胞之質與量皆可獲得大幅度的改善。超效FSH對於

10 卵母細胞質與量的影響可進一步增進超效FSH之FSH血清半衰期。該FSH血清半衰期可藉由進一步改質該超效FSH而提升。進一步的改質，包括但不侷限於先前所述者，可用於增加FSH之血清半衰期。例如，ANITV(SEQ ID No.3)延長鏈便可用於延長FSH血清半衰期。

15 依據美國專利5,574,011所述，附於參考資料中，FSH會刺激生殖腺產生類固醇如睪固酮。因此，本發明之FSH類似物係用於治療任何與低類固醇產生率有關之疾病。依據美國專利6,562,790所述此附於參考資料中，冠狀動脈阻塞可用睪固酮治療。因此，本發明之FSH類似物亦可用於

20 提高冠狀動脈病患之睪固酮含量。

本發明類似物可用於促進生殖系統之療法，不論是男性或女性主體，包含投以具促進劑量之經改質FSH至主體。在此方法中，該類似物可單獨投予或與其他治療方法結合，例如，包括但不侷限於，Clomiphene檸檬酸、GnRH(

促性腺釋放激素)與LH(黃體生成激素)。例如，隔離促性腺  
激素缺乏(IGD)之主體，投以經改質之FSH與LH可使性腺恢  
復正常功能。目前已廣泛了解醣蛋白激素如FSH與LH在女  
性生殖生理上是不可或缺的，而這些醣蛋白激素可投予主  
5 體以克服多種生殖系統疾病，因此可促進生殖力。

本發明之類似物特別適用於治療傾向於卵巢過度刺激  
之女性。此方法可包括(a)投以具促進劑量之本發明經第一  
次改質之FSH至主體，其中該經第一次改質之FSH之血清半  
衰期較野生型FSH長，以及(b)之後投以具促進劑量之本發  
10 明經第二次改質之FSH至主體，其中該經第二次改質之FSH  
之血清半衰期較經第一次改質之FSH短。例如，半衰期較  
野生型FSH短之類似物，如TR-4401，可用於治療傾向於卵  
巢過度刺激之女性。

熟習此技術領域者應可立即決定醣蛋白激素之有效劑  
15 量，並依據許多因素如體重、身高、特定症狀之嚴重性，  
以及主體特性。醫療上之有效劑量亦可依據一般最佳化流  
程而決定。本發明提供一種醣蛋白激素，較野生型醣蛋白  
激素具更強之藥效。這些經改質之醣蛋白激素可使醫療人  
員注射較低劑量，與野生型醣蛋白激素相較，而達到類似  
20 得療效；或者，換句話說，注射類似劑量之經改質醣蛋白  
激素，與野生型醣蛋白激素相較，可得到較好的療效。

取決於醣蛋白激素是否為口服或非口服形式，前列腺  
素之投予可為固體、半固體或液體藥劑形式，如藥片、藥  
丸、膠囊、粉末、液體、乳霜與懸浮液，以及，類似地，

較佳該單位劑量為適於傳送之精準劑量。該醣蛋白激素可包含有效劑量之醣蛋白激素，以及醫藥上可接受之載體，此外，可包含其他藥劑、醫藥試劑、載體、輔藥、稀釋劑等。術語“醫藥上可接受”之定義為該物質不會產生生物反應或其他不希望之反應，即，投予個體上之物質不會與所選之醣蛋白激素產生不希望之生理反應，或與醣蛋白激素產生不希望的作用。製備此類試劑之方法為已知，或熟習此技術領域者所熟知；例如，請參見Remington's Pharmaceutical Science，最新版(Mack 出版社，Easton，Pa.)。

10 基因療法是另一種以本發明經改質醣蛋白激素治療激素失調之方法。在此方法中，譯碼為經改質醣蛋白激素之基因係引進細胞中，如生殖細胞或體細胞，使基因可在此細胞中表現，而這些細胞之後代便可持續表現此基因。例如，將譯碼為本發明經改質醣蛋白激素之核酸置入卵巢細胞中，或其前驅細胞中，以增加排卵。適用於傳送此類基因序列之載體為習知技藝中已知者。例如，該載體可為病毒性，如腺病毒、腺體相關之病毒、反轉錄病毒，或非病毒性，如陽離子性微脂體。

20 本發明之類似物較野生型蛋白質具更強之活性，因此特別適用於將試劑傳送至表現醣蛋白激素受體之細胞中。因此，本發明更提供了一種將試劑傳送至所需主體之表現醣蛋白激素受體之細胞之方法，利用本發明之經改質醣蛋白激素。將試劑傳送至細胞中(即，靶式傳送)之方法可使用任何適用之試劑，取決於主體之病症或預期之病症。該試

劑可為細胞保護試劑、抗體、藥物、增感劑、生物反應改質劑、核放射物種、毒素或其結合物。

在某些實施例中，靶式傳送之方法係用於治療與醣蛋白受體不正常表現有關之失調或疑似失調之主體。在某些  
5 實施例中，靶式傳送之方法係用於治療與醣蛋白受體不正常有關之失調之診斷或偵測。在某些實施例中，靶式傳送之方法係與其他療法、診斷過程或臨床療法結合，包括放射線或外科治療。

在某實施例中，該方法提供試劑之靶式傳送，其中該  
10 試劑為細胞保護化合物。細胞保護化合物為可保護或降低細胞受傷機率或嚴重性之化合物。商業上可購得之細胞保護化合物包括 2-巰基乙磺酸(mesna, MESNEX®, Bristol-Myers Squibb)、阿米福汀(amifostine, ETHYOL®, Alza)、右雷左生(dexrazoxane, ZINECARD®, Pharmacia  
15 & Upjohn)以及甲醯四氫葉酸(leucovorin, 多家製造商)等。

在某一實施例中，該試劑可為治療多種癌症之任何藥物，如天然或合成雌激素、雌激素受體調節劑、黃體素、  
20 雄性激素、促性腺激素、雄性激素抑制劑、亞磷酸鹽、葡萄糖皮質激素、甲狀腺激素、抗甲狀腺試劑、碘劑、溴麥角隱亭(bromocriptine)、烷化試劑、抗代謝劑、抗細胞分裂劑、epipodophyllotoxin、抗新生瘤抗生素、抗新生瘤激素、鈦配位錯合物試劑、蔥二酮、經取代尿素、甲基胍衍生物、DNA拓樸酶抑制劑、維他命A、吡吩姆、mitotane或其結合物。

在某一實施例中，該試劑可為任一治療男性或女性生殖系統癌症(如子宮內膜癌、子宮癌、子宮頸癌、乳癌、睪丸癌)之藥物。在一較佳實施例中，該試劑可為克勞米酚(clomiphene)、柔沛(finasteride)、丙硫脲嘧啶(propylthiouracil)

5  、甲基伊咪唑(methimazole)、平陽黴素(bleomycin)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、順-雙氯雙鉑(cisplatin)

  、絲裂黴素(mitomycin)、異環磷醯胺(ifosfamide)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、多柔比新(doxorubicin)、紫杉醇(paclitaxel)

  、氟脲嘧啶(flourouracil)、卡鉑(carboplatin)、表阿黴素

10 (epirubicin)、六甲蜜胺(altretamine)、長春瑞賓(vinorelbine)

  、米托蒽醌(mitoxantrone)、潑尼松(prednisone)或其結合物。

已知可增強某些抗癌藥物之細胞毒殺效果之藥物，以及放射醫藥用藥物亦可使用。此類藥物通常稱之為增敏劑。可強化多種藥物活性(如抗癌藥物)之增敏劑範例為丁基硫

15  堇亞胺，以及鈣離子阻斷劑如維拉帕米(verapamil)與地耳硫卓(diltiazem)(請見美國專利4,628,047與Important Advances

  in Oncology, 1986, DeVita等人編著，J.B.Lippincott Co. Philadelphia, 第146-157頁(1986)，附於參考資料中)。其他

  已知的增敏劑為甲硝唑(metronidazole)與米索硝唑

20 (misonidazole)、某些2-氨基噻-硝基苯甲酸衍生物、3-硝基吡嗪之2,6-雙取代衍生物，以及某些異吡啶二酮化合物(請見美國專利4,647,588、4,654,369、4,609,659與4,494,547，附於參考資料中)。

在某些實施例中，該試劑可為生物反應改質劑。任何

生物反應改質劑皆可用於本發明範疇中。可用於本發明之生物反應改質劑範例包括，但不侷限於，干擾素- $\alpha$ 、干擾素- $\beta$ 、干擾素- $\gamma$ 、腫瘤壞死因子、淋巴毒素、介白素-1、介白素-2、介白素-3、介白素-4、介白素-5、介白素-6或其結合物。

在某些實施例中，該試劑可為抗體。該抗體可為單株或多株。在某實施例中，該抗體可為人類化抗體、嵌合式抗體或功能性抗體片段，包括，例如Fab1、Fab2。

本發明可使用之毒素範例為蓖麻毒蛋白、相思子毒蛋白、白喉毒素、綠膿桿菌外毒素A、核糖體去活蛋白，以及黴菌毒素如新月毒素。新月毒素為黴菌毒素的一種，由不完全地衣綱之土黴菌產生或由*Baccharus megapotamica*單離出(Bamburg發表於Proc. Molec. Subcell Bio. 1983, 8: 41-110; Jarvis與Mazzola發表於Acc. Chem. Res. 1982, 15: 338-395，附於參考資料中)。醫療上有效之經改質毒素或其片段，如經由基因工程或蛋白質工程技術所產生者，皆可使用。

任何可將一試劑結合或偶合至經改質醣蛋白激素上之方法皆可使用。例如先前所描述的數種可斷鍵聯結基團。請見，美國專利號4,618,492、4,542,225與4,625,014，附於參考資料中。將試劑由這些聯結基團釋放出之機制包括光照射光不穩定鍵結，以及酸催化水解反應。美國專利5,563,250，附於參考資料中，揭示一種免疫聯結基，包含具特殊化學結構之聯結基，其中該聯結基可在體內斷鍵，

釋放該原型化合物(放射性藥物、藥物、毒素等)。該聯結基容易在微酸之pH值下斷鍵，並預期可在傳送至目標細胞之細胞質時斷鍵，因而在目標細胞中釋放具生物活性之化合物。美國專利4,671,958，附於參考資料中，包含描述一種  
5 具可在體內目標處斷鍵之免疫聯結基，經由病患補體系統之蛋白質分解酵素作用。

其他結合或聯結方式已被描述。例如，該聯結基分子為商業上可購得，如購自Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois(請見Pierce 1986-87，一般目錄，第313-354  
10 頁，附於參考資料中)。將抗體(請見美國專利4,671,958、4,659,839，附於參考資料中)，與放射性核種金屬螯合劑、毒素、或藥物聯結至蛋白質上之技術為已知。請參見歐洲專利188,256，美國專利4,671,958、4,659,839、4,414,148、4,699,784；4,680,338；4,569,789以及4,590,071；  
15 Borlinghaus等人發表於Canc. Res. 47：4071-4075，1987年8月1日；Foran發表於Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2002, 15(3):449-65，以及Fotiou等人發表於Eur. J. Gynaecol. Oncol, 1988, 9(4)：304-7，附於參考資料中。就多種已被報導可將放射診斷藥物、放射治療藥物、藥物、毒素或其他試劑聯  
20 結至蛋白質上之方法而言，熟習此技術領域者可立即決定將特定試劑聯結至經改質醣蛋白質上之最適當方法。

#### 造影方法

本發明類似物較野生型蛋白質具有較好的活性，因此特別適用於表現醣蛋白激素受體之細胞造影。因此，在一

實施例中，本發明更提供了一種使含有醣蛋白激素受體之細胞造影之方法，利用本發明經改質之醣蛋白激素。造影與偵測方法為習知技藝已知者。一般所使用之造影方法包括，例如，磁場共振影像(MRI)、X-光、電腦斷層掃描(CT) 5、正子造影(PET)、乳房造影與超音波。

使用基本放射性技術之造影方法已描述於，例如，“Textbook of Radiology and Imaging”，Sutton與Livingstone撰寫，第7版(2冊裝)，Churchill Livingstone(Elsevier Science)，倫敦，2002年出版；“A Concise Textbook of Radio;ogy” 10 Armstrong與Wastie撰，Arnold出版(Thomson公司)，Scarborough, Ontario, 加拿大，2001年出版；“Walter & Miller’s Textbook of Radiotherapy”，Bomford與Knuckler撰寫，第6版，Churchill Livingstone(Elsevier Science)，倫敦，2001年出版，皆附於參考資料中。亦見 Bottomley發表於 15 Comput. Radiol. 1984, 8(2)：55-77；Dixon發表於Radiology 1984, 153(1)：189-94；Daley與Cohen發表於Cancer Res. 1989, 49(4)：770-9；Ellis等人發表於Clin. Radiol. 2001, 56(9)：691-9；Paushter等人發表於 Med. Clin. North Am. 1984, 68(6)：1393-421；Blecher Aust. Fam. Physician 1983 12(6) 20：449-50, 452；Bragg發表於Cancer 1977, 40(1補充)：500-8；Moseley發表於Br. Med. J.(Clin. Res. Ed.)1982, 284(6323)：1141-4；Lentle與Aldrich發表於Lancet 1997, 350(9073)：280-5；Weber等人Strahlenther Onkol. 1999, 75(8)：356-73；Hanbidge, J. Gastroenterol. 2002, 16(2)：101-5；Miles發

表於Eur. Radiol. 2003, 補充5 : M134-8 ; Prigent-Le Jeune  
等人發表於Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2004, 2月19日  
[Epub ahead of print] ; DeSimone 等人發表於Gynecol.  
Oncol. 2003, 89(3) : 543-8 , 以及Goldenberg等人發表於J.  
5 Clin. Oncol. 1987, 5(11) : 1827-35 , 皆附於參考資料中。

任何適當之造影或偵測方法皆可使用，基於，尤其是  
，主體之病變或疑似病變、待造影之組織以及所希望的是  
功能(生理學上)或結構(解剖學上)影像。在某些實施例中，  
造影方法可提供偵測主體中經標記之經改質醣蛋白激素量  
10 ，或偵測主體中經改質醣蛋白激素增加量。其代表自體免  
疫之病變或癌化病變，選自於由卵巢癌、子宮癌、子宮頸  
癌、子宮內膜癌、乳癌、睪丸癌或腦下垂體腫瘤所構成之  
群組中。

影像方法可粗略地分類為提供主體結構或解剖資訊，  
15 或是提供主體功能或生理資訊者。結構影像提供提供骨頭  
或組織之形狀，決定是否在某部位有不正常的形成或破壞  
。腫瘤或癌細胞的出現可能會造成結構上的改變。有一種  
新的結構影像可提供不同部組織部份的化學組成資訊，可  
決定是否正有受傷或不正常生化反應在進行(如癌細胞之  
20 出現或成長)。請見，例如，Bonilha等人發表於Med. Sci.  
Monit. 2004, 10(3) : RA40-6, epub 2004 , 3月1日 ; Ballmaier  
等人發表於，Psychiatry Res. 2004, 15, 130(1) : 43-55 ;  
Ballmaier等人發表於Biol. Psychiatry, 2004, 55(4) : 382-9 ;  
Cha發表於Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am. 2003, 11(3)

：403-13，以及Kopelman等人發表於Hippocampus, 2003, 13(8)：879-91，併附於參考資料中。

功能影像為相對新穎之技術，可尋找是否特定組織或器官正在進行特定功能任務。此技術可利用數種生理過程，包括，如血流，以及與血流改變相關之活性(即新生癌之出現或成長)，以及監測化療反應。請見Takeuchi等人發表於 J. Med. Invest. 2004, 51(1-2)：59-62；Otsuka等人發表於 J. Med. Invest. 2004, 51(1-2)：14-9；Martincich等人發表於 Breast Cancer Res. Treat. 2004, 83(1)：67-76；Cohen與 Goadsby等人發表於Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 2004, 4(2)：105-10；與Lewis等人發表於 Eur. J. Neurosci. 2004, 19(3)：755-60；併附於參考資料中。

一般而言，磁場共振影像(MRI)、X光、電腦斷層掃描(CT)、乳房造影與超音波可提供主體結構或解剖學上的資訊。放射學方法如核子醫學、放射性核種影像以及正子造影(PET)可提供主體功能或生理學資訊。結構與功能性影像皆落於本發明範疇中。

本發明之一實施例，該造影方法提供經放射線標記(如使用對比試劑)之經改質醣蛋白激素。任何標記或對比試劑皆可使用。請見 Minato等人發表於J. Comput. Assist. Tomogr. 2004, 28(1)：46-51；Antoch等人發表於JAMA 2003, 290(24)：3199-206；Brinker發表於Cardiovasc. Med. 2003, 補充5：S19-27；el-Diasty等人發表於J. Urol. 2004, 171(1)：31-4；Williams等人發表於Int. J. Oral Maxillofac. Surg.

2003, 32(6): 651-2; Follen等人發表於Cancer 2003, 98(補充9): 2028-38; Behrenbruch等人發表於Med. Image. Anal. 2003, 7(3): 311-40; Knopp等人發表於Mol. Cancer Ther. 2003, 2(4): 419-26; 併附於參考資料中。該標記可為任何習知技藝已知之標記。在一實施例中，該標記可為放射光不通透標記、放射活性標記、螢光標記或順磁性標記。

放射核種一般會放射貝他( $\beta$ )或伽馬( $\gamma$ )射線。 $I^{131}$ 會放射約90%  $\beta$ 射線及約10%  $\gamma$ 顆粒，物理性半衰期為8天。Tc99m放射 $\gamma$ 射線，半衰期為6小時。在注射之後，經Tc99m標示之蛋白質，其核種在病患身上之生物分布可用伽馬攝影機，以已知方式掃描偵測。目標處所累積之Tc99m便因此可輕易造影出。請見，Toohey等人發表於Radiographics 2000, 20: 533-546; Kostakoglu等人發表於Radiographics 2003, 23: 315-340; Saremi等人發表於Radiographics 2002, 22: 477-490; Intenzo等人發表於Radiographics 2001, 21: 957-964; Ranger等人發表於Radiographics 1999, 19: 481-502; Simpkin發表於Radiographics 1999, 19: 155-167; Janoki與Kerekes發表於Acta Physiol. Hung 1992, 79(2): 183-96; Hoefnagel等人發表於Anticancer Drugs 1991, 2(2): 107-32; Hoefnagel等人發表於Eur. J. Nucl. Med. 1991, 18(6): 408-31; Gatley等人發表於Acta Radiol. Suppl. 1990, 374: 7-11; Ott發表於Br. J. Radiol 1989, 62(737): 421-32; Andersen發表於Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev. 1989, 1(4): 288-318; 以及Miraldi發表於Int. J. Radiat. Oncol. Biol.

Phys. 1986, 12(7): 1033-9; 併附於參考資料中。

除了 $I^{131}$ 與Tc99m之外，任何習知技藝已知的放射線同位素皆可使用於本發明方法中。其他可使用之核種與螯合劑包括， $Co^{57}$ 、 $Co^{58}$ 、 $Cr^{51}$ 、 $F^{18}$ FDG、 $Ga^{67}$ 、 $In^{111}$ 氯化物、  
 5  $In^{111}$ 三胺五醋酸(DTPA)、 $In^{111}$ 氧化喹啉(oxine)、 $In^{111}$ 卡羅單抗(Capromab pendetide)、 $In^{111}$ 印司洛馬(Imciroma)三胺五醋酸、 $In^{111}$ 噴曲肽(pentetreotide)、 $In^{111}$ 沙妥莫單抗噴曲肽、 $I^{123}$ 、 $I^{125}$ 碘拉它葡胺、 $I^{125}$ 人類血清蛋白(RISA)、 $I^{131}$ 鄰-  
 10 碘馬尿酸、 $I^{131}$ 碘化甲基正膽固醇(NP-59)、 $I^{131}$ 間-碘化苜基胍(MIBG)、 $Kr^{81m}$ 氣體、 $P^{32}$ 磷酸鉻、 $P^{32}$ 磷酸鈉、 $Ru^{82}$ 、來昔決南鈿153( $Sm^{153}$  Lexidronam, Sm-153 EDTMP)、 $Sr^{89}$ 、 $Tl^{201}$ 與 $Xe^{133}$ 。

#### 診斷分析

本發明更提供一種分析物之偵測方法，該分析物會干  
 15 擾本發明經改質之醣蛋白激素與醣蛋白激素受體之結合。在一實施例中，提供一種偵測生物樣本中會干擾經改質之醣蛋白激素受體結合之分析物之方法，該方法包含(i)將該樣本與本發明經改質之醣蛋白激素接觸，(ii)偵測訊號，其中所偵測到訊號之量或出現，代表會干擾本發明經改質之  
 20 醣蛋白激素與醣蛋白受體結合之分析物是否出現。

在一實施例中，分析物的偵測方法為競爭性結合試驗。競爭性結合試驗為標示與未標示結合基與受體結合試劑(如抗體、受體、運輸蛋白)之間的競爭反應。IUPAC化學明明學會概略，1997年第2版“Competitive Protein Binding

Assays” Odell與Franchimont; P. John Wiley& Sons Inc. 1983  
，併附於參考資料中。請亦參照美國專利號6,537,1760，併  
附於參考資料中。

在某實施例中，訊號為樣本中經改質之醣蛋白激素與  
5 醣蛋白受體之結合或結合量。在某實施例中，用於偵測第  
二訊號之方法為，如偵測cAMP或類固醇(黃體素)之量。在  
某實施例中，該方法使用生物樣本中的全細胞。在某實施  
例中，該方法僅使用細胞之某部分，例如細胞膜。

在某實施例中，該試驗可於溶液中進行。在某實施例  
10 中，試驗之一或多種成分可固定於固相上。塑膠表面、微  
粒、磁粒、濾膜、聚合物凝膠材料，或其他固相基質皆可  
作為固相。請參照，如6,664,114；6,589,798；6,479,296與  
6,294,342，附於參考資料中。本發明所提供之試驗方法可  
自動化。

15 利用FSH超促效劑以設計醣蛋白受體促效劑與拮抗劑  
之方法

本發明亦提供一種設計新的受體增效劑與拮抗劑之方  
法，以本發明FSH與其所辨識之受體之交互作用為基礎。  
本方法包括預測FSH蛋白中帶電單元(motif)與其所辨識受  
20 體之相對應胺基酸殘基之相互作用。例如，此方法係涉及  
比較演化上FSH與受體之結合與生物活性作用之不同，例  
如人類LH與大鼠LH受體之比較，定位出在細胞外區域及/  
或細胞內迴圈(loop)處，僅在此二受體序列之一中出現之處  
，進行丙氨酸掃描與電荷置換突變試驗，以進一步證實該

預測，建立符合該相互作用之激素-受體複合物模型，並利用此模型設計新的激素類似物。新的激素包括那些使用此模型而預測會與受體結合者。新的拮抗劑包括那些以使用此模型預測會與FSH結合之受體蛋白區域及/或迴圈處而設計者。

例如，本發明類似物之一 (TR-4402，與取代物  $\alpha$ (E14R+Q20R+G73R)+  $\beta$ E4R)，已被發現在高濃度時會與大鼠LH受體 (SEQ ID No. 23, NCBI取得號NP\_037110) 結合，但不與人類LH受體 (SEQ ID No. 24, NCBI取得號NP\_000224, 資料未顯示) 結合。依據TR-4402對這些受體的專一性之不同可知Arg14、Arg20與Arg73應與大鼠LH受體上帶負電的Asp與Glu作用。在大鼠受體上有但人類受體上無之帶負電片段為Asp312與Glu314(基於帶有訊號肽鏈之人類LH受體胺基酸序列)(在人類受體上分別為Ser與Lys)。

人類FSH受體 (SEQ ID No. 22, NCBI取得號AAA52477) 上相對應之片段為Glu316、Asp317與Glu319。因此，這些胺基酸串便被預測為會與TR-4402之 $\alpha$ -次單元上之Arg14、Arg20與Arg73作用。這些資訊應該會提供更好的醣蛋白激素作用模型，並可貢獻於設計新式醣蛋白類似物，包括含有人類FSH受體對應序列298-338片段與包括Glu300與Asp302之胜肽/蛋白質類似物。

下列範例係提供本發明進一步詳細說明。因此，他們不應該被用為侷限本發明範圍。熟習此領域者應可認知到尚有許多其他實施例落於本發明範疇中，本發明範疇如此

處及申請專利範圍中所述。

範例

範例1FSH超促效劑之製造與特性

定點突變。人類 $\alpha$ -(SEQ ID No. 1)與FSH  $\beta$ -(SEQ ID No. 2)單元cDNA之定點突變係以Stratagene公司出產之QuickChange Mutagenesis Kit進行。類似物係依據美國專利號6,361,992所描述之方法設計，於此附於參考資料中。

在轉殖至表現載體上後，所有基因建構之完整PCR產物皆以定序方式辨認出突變者，並移除任何不希望的聚合酶錯誤。

短暫表現。類似物係於中國倉鼠卵巢細胞(CHO-K1)中進行短暫表現。細胞係於60或100 mm培養皿中被野生型或突變型單元( $\alpha$ 或FSH  $\beta$ )cDNA共轉染，使用微脂體(LipofecAMINE試劑，Gibco BRL)短暫轉染程序。在一般生長培養基中回復12小時後，經轉染之細胞續於CHO-不含血清培養基中(CHO-SFM, Gibco BRL)培養72小時。之後，收集含有空白轉染，即使用不含插入基因之表現質體，控制組培養基之經控制培養基，以Centriprep 10濃縮器(Amicon, Beverly, MA)濃縮並儲存於-70°C。類似物係以一系列辨認不同FSH表位的單株與多株抗體定量。

FSH生物活性試驗。類似物之促卵泡活性係以其誘發該表現有hFSH受器之CHO細胞內cAMP之能力來評估。穩定表現hFSH受器之CHO細胞係於96孔培養盤中長至全滿。之後，將細胞培養於不含鹽類(2h)或正常(1h)的培養基中，

於37°C，5%CO<sub>2</sub>下培養，並將野生型與突變型FSH以及空白轉染之控制培養基進行連續稀釋。所製造之cAMP係以放射免疫試驗法決定。

- 在體外試驗中呈現最高的生物活性且其對於FSH製造並無副作用之FSH突變型係選用於結合株。第1圖包括顯示各種單點突變對於FSH體外生物活性影響之比較，如同使用CHO-FSHR短暫轉染所測量的。顯示最高藥效之單點突變包括在Q13、E14、V68、P21與G73之 $\alpha$ -位置以及E4之 $\beta$ -位置進行鹼取代。F18置換為精胺酸會導致失去生物活性。 $\beta$ -E4R特別會加強FSH的產生(請見第2圖)。數種結合取代物對於生物活性之相互作用示於第3圖。

- 總括來說，有26個在 $\alpha$ 位置之單點突變以及23個在 $\beta$ -位置之單點突變，係選用每一次單元之頂端突變型建構具有取代基之先導藥物類似物。下表1顯示結合之突變株之體內生物活性增加。

表1結合各取代位置所產生之增大效力

類似物	取代位置
4201	$\alpha$ E14R + $\beta$ E4R
4202	$\alpha$ (E14R + N66R)+ WT $\beta$
4203	$\alpha$ (E14R + G73R)+ WT $\beta$
4204	$\alpha$ (P16R + Q20R)+ WT $\beta$
4205	$\alpha$ (Q20R + P21R)+ WT $\beta$
4301	$\alpha$ (E14R + Q20R + G73R)+ WT $\beta$
4302	$\alpha$ (E14R + P21R + G73R)+ WT $\beta$

4303	$\alpha(\text{E14R} + \text{N66R} + \text{G73R}) + \text{WT}\beta$
4304	$\alpha(\text{E14R} + \text{N66R}) + \beta\text{E4R}$
4305	$\alpha(\text{E14R} + \text{G73R}) + \beta\text{E4R}$
4306	$\alpha(\text{P16R} + \text{Q20D} + \text{P21R}) + \text{WT}\beta$
4307	$\alpha(\text{P16R} + \text{Q20R} + \text{P21R}) + \text{WT}\beta$
4308	$\alpha(\text{N66K} + \text{G73K} + \text{A81K}) + \text{WT}\beta$
4401	$\alpha(\text{Q13R} + \text{E14R} + \text{P16R} + \text{Q20R}) + \text{WT}\beta$
4402	$\alpha(\text{E14R} + \text{Q20R} + \text{G73R}) + \beta\text{E4R}$
4403	$\alpha(\text{E14R} + \text{P21R} + \text{G73R}) + \beta\text{E4R}$
4404	$\alpha(\text{E14R} + \text{N66R} + \text{G73R}) + \beta\text{E4R}$
4405	$\alpha(\text{Q13K} + \text{E14K} + \text{P16K} + \text{Q20K}) + \text{WT}\beta$
4501	$\alpha(\text{E14R} + \text{Q20R} + \text{P21R} + \text{N66R} + \text{G73R}) + \text{WT}\beta$
4601	$\alpha(\text{Q13K} + \text{E14K} + \text{P16K} + \text{Q20K} + \text{N66K} + \text{G73K}) + \text{WT}\beta$
4602	$\alpha(\text{E14R} + \text{P16R} + \text{Q20R} + \text{P21R} + \text{N66R} + \text{G73R}) + \text{WT}\beta$
4603	$\alpha(\text{E14R} + \text{Q20R} + \text{P21R} + \text{N66R} + \text{G73R}) + \beta\text{E4R}$
4701	$\alpha(\text{E14R} + \text{P16R} + \text{Q20R} + \text{P21R} + \text{N66R} + \text{G73R}) + \beta\text{E4R}$
4901	$[\alpha(\text{E14R} + \text{Q20R} + \text{G73R}) + \beta\text{E4R}]$ 且 $\alpha$ -次單元之N端 ANITV(SEQ ID No. 3)延長
4910	$[\alpha(\text{Q13R} + \text{E14R} + \text{P16R} + \text{Q20R}) + \text{WT}\beta]$ 且 $\alpha$ -次單元之N端 ANITV(SEQ ID No. 3)延長

如習知技藝，某一特定藥物可依據所使用的系統而具備不同的效果。請見 Kenakin “Predicting Therapeutic Value in the Lead Optimization Phase of Drug Discovery”, Nature Rev. 2 : 429-38(2003)。因此，本發明類似物的生物活性亦使用表現少量FSH受器之大鼠卵巢細胞(GLHR-15細胞)測試。如第4圖所示，本發明類似物會導致明顯的cAMP反應，與野生型FSH以及自由 $\alpha$ 鏈相較，這些並沒有明顯的劑量

依賴反應。

#### 範例2類似物TR-4402之純化與鑑定

選擇類似物TR-4402進行純化並作進一步鑑定。

TR4402為FSH類似物，在 $\alpha$  L1迴圈有兩個突變位置( $\alpha$ E14R  
5 與 $\alpha$ Q20R)，在 $\alpha$  L3迴圈有兩個突變位置( $\alpha$ G73R)，在 $\beta$  L1  
迴圈( $\beta$ E4R)有一個突變位置。請見第5圖。產生TR-4402之  
細胞株係由共轉染經改質之pED載體，含人類 $\alpha$ 單元與二氫  
葉酸還原酶(DHFR)基因，以及經改質之pIRES載體，含有  
FSH  $\beta$ 單元，由IRES序列以及可放大基因標記隔開，線苷酸  
10 去氫酶(ADA)，藉由Lipofectamine法送進CHO-DHFR(-)中。  
經轉染之細胞係培養於選擇性培養基中(缺乏核苷酸與去  
氧核苷酸之 $\alpha$ MEM，含10% 經透析之FBS)。為了在CHO雙  
剔除突變株(dhfr-/dhfr-)中穩定地製造hFSH，Dr. L.  
Chasin(Columbia University, New York, N.Y.)友情提供  
15 CHO-DG44細胞株。

分泌FSH#4402之複製細胞株係於培養於含有濃度漸  
增之甲氧蝶呤(methotrexate, MTX)之培養基中，濃度上限  
為2  $\mu$ M。DHFR放大係由於培養基中MTX，不含核苷酸，  
系統性地增加。在多邊形外觀形成(2-3周)之隔次放大步驟  
20 中，細胞穩定性分析。由於MTX濃度增加至800倍(由0.005  
 $\mu$ M至約4  $\mu$ M)，該放大步驟需時4周。具有最高分泌量之細  
胞係選出再進行第二次處理，包括使用脫氧肋間型霉素  
(deoxycoformycin)，導致放大ADA標記基因。

單獨複製株係利用FSH免疫檢驗方式，偵測FSH#4402

，用以後續表現。穩定細胞株(複製編號：H-2-3)與，經pED-  
類似物a+pIRES-ADA-類似物b(莫耳比例為1：5，總DNA量  
為5克)轉染，經挑選並繁殖於 $\alpha$ -最小必須培養基(a-MEM：  
Cat#：12561-056, Lot# 1141509，含L-穀胺醯胺，不含核苷  
5 酸與去氧核苷酸；GIBCO, Grand Island, N.Y.)，補充有10%  
經透析胎牛血清蛋白(Gibco, Cat No：26400-044)以及2mM  
甲氧蝶呤(MTX；ICN, Cat. No：102299, Aurora, Ohio)。

製備生物反應器接種體。當CHO-DG44細胞在500平方  
公分之T-斜口瓶之密度>90%時，細胞經胰蛋白酶消化，在4  
10 °C 離心400 g 5分鐘。所有細胞( $1.6 \times 10^9$ /500ml a-MEM 培養  
基)接種於Celligen plus生物反應器中，將細胞培養至2L塑  
膠瓶中。

在放大之後，產生最高量FSH#4402之細胞株係於數個  
斜口瓶中培養。細胞之後使用灌注模式將細胞培養於  
15 Packed-Bed生物反應器3.5生物反應器中，具內部延緩裝置(  
籃狀)以及垂直混合系統(Celligen Plus, New Brunswick  
Scientific, Edison, NJ)。細胞係捕捉至位於延遲裝置內之  
Fibracel盤中。溶解氧含量係維持於50%飽和。溫度為37°C  
。攪拌速度為100 rpm。pH為7.2，使用四氣體入口系統維  
20 持，並自動注入碳酸氫鈉。調整灌注量以維持葡萄糖量高  
於1.5 g/L，乳糖量低於1.5 g/L。

FBS斷絕步驟與FSH-TR 4402類似物係於Celligen plus  
生物反應器中製造。CHO IIIA(Gibco, 成分編號：97-014DK,  
批號：1147268)，補充有hypoxanthine-thymidine補充液

(Gibco, 100')，盤尼西林-鏈黴素(Gibco, 100'；貨號：15140-122，批號：1161387)，glutamax-1(Gibco, 100'；貨號：35050-061，批號：1163550)，10% Pluronic F-68(Gibco, 100'；貨號：24040-032，批號：1153058)，以及1% 經透  
5 析之胎牛血清蛋白(Gibco)，係使用於生物反應器中進行血清斷絕步驟。在生物反應器操作第17天後，我們將CHO-III A培養基置換為不含蛋白與動物成分之CHO培養基(Sigma, 貨號：C-8730，批號：122K8401)直至第23天(請見SLIDE 簡介生物反應器操作)。收集生物反應器之培養基，離心、  
10 過濾(0.45  $\mu\text{m}$  薄膜)並使用Millipore濃縮器濃縮。

純化。TR-4402係使用免疫親合管柱(單株抗體Ab ME.112，得自Maine Biotechnology Service公司)與疏水性交互作用管柱純化。純度係經由SDS-PAGE評估。

經改質類似物TR-4402係使用體外生物檢驗方式鑑定  
15 ，使用表現人類FSH受器之CHO、人類類顆粒腫瘤(KGN)與大鼠顆粒細胞株(GLHR-15)，以總cAMP之製造作為終點(請見6-8圖)。使用CHO-FSHR細胞，TR-4402顯示藥效增加30倍，且 $V_{\text{max}}$ 增加17%，與Follistim(野生型FSH)相較。使用KGN-FSHR，TR-4402亦顯示藥效增加30倍，與野生型  
20 FSH相較。

TR-4402亦試驗是否會結合至LH與TSH受器，以確認FSH類似物之專一性，並使用等電點聚焦法確認醣鏈之異質性，即 $\alpha$ 與 $\beta$ 單元之存在(資料未顯示)。

TR-4402與野生型FSH對於小鼠卵泡之影響比較係以

EggCentris體外卵泡生物試驗組進行測試。此試驗係研究早期腔前卵泡至排卵階段之成長與發育。整個體外過程可模仿體內卵泡產生過程。培養系統一開始先分離出均質的小鼠腔前卵泡，直徑介於100至130  $\mu\text{M}$ 。卵泡各自分盤並與1、3、9 mIU/mL野生型(“化合物3”)與TR-4402(“化合物4”)培養12天。

卵泡生物試驗指出在暴露於TR-4402之後，卵母細胞的品質增進，與Follistim(野生型)相較，增進卵泡存活率(第9圖)，增進腔室形成(第10圖)，增進COC之黏液分泌(第11圖)，增進核成熟(第12圖)，並增進黃體激素產生(第13圖)。此差異係與其對於卵細胞膜上FSH受器之出現以及抗細胞凋亡之作用有關(請見Meduri等人，J. Clin. Endocrinol. Metab. 87(5)：2266-76)，並指出本發明經改質之超促效劑可用於增進病人卵母細胞之表現，當病人需要生殖治療之協助時。

#### 15 範例3使用TR-4402之活體內研究

TR4402之活體內研究係以未成熟之21天大Sprague-Dawley雌性大鼠進行。FSH係以皮下注射每日一次，共3日(、24、48小時)。在72小時收集血液樣品，並進行解剖。測量兩邊卵巢重量。血液中FSH與Inhibin B之量係以ICN-IRMA FSH免疫試驗法測得。卵巢內雌激素含量係在將卵巢均質化後，以CT 17 $\beta$ -雌激素套組(ICN藥廠)測定。

卵巢重量之增加係與注射FSH之劑量有關(Steelman與Pohley, 1953)。FSH會刺激卵泡成長(顆粒細胞增生、充血、雌激素與抑制素B產生)。統計上顯著性之不同係出現於

卵巢重量(第14A、C與D圖)、卵巢內雌激素含量(第15圖)與血清抑制素B含量(第16圖)，在以相關劑量之TR-4402與Follistim刺激之後觀察。TR-4402在此優於野生型FSH之處為卵巢重量、抑制素與雌激素含量，雖然在實驗結束時血清中TR-4402之含量較Follistim低40-50%(第14B圖)。

由於在啮齒類的研究成果相當好，可預期在人類臨床FSH製造之成效上，TR-4402應可在治療人類病患上表現較Follistim可觀之優勢。此外，具有快速清除速率之超活性FSH(如TR-4402)應可立即應用於IVF程序之第二階段中，並可降低卵巢過度刺激症候(OHSS)之發生。

範例4比較FSH類似物與野生型FSH之活體外授精、胚胎發育及活產之研究

以23天大之B6D2F1雌性小鼠(共5組)於實驗第一天接受皮下注射10 IU之TR-4401、10 IU之TR-4901、10 IU之野生型FSH(Follistim)，或20 IU之野生型FSH(Follistim)。排卵劑量之hCG係經由腹膜注射至少一動物以作為控制組。

FSH注射27小時後，收集精子與卵母細胞，並產生受精。精子係由兩個月大之B6D2與CB6F1雄性小鼠採得。雄性小鼠係以斷頸方式犧牲。切開下腹部，取出副睪與輸精管並置於精子盤中。副睪與輸精管切3至5次，將精子由器官擠出至精子盤中。將裝有精子之精子盤置於37°C，5%CO<sub>2</sub>之培養箱中，並使其適應30至90分鐘。

卵母細胞係由接受TR-4401、TR-4901或野生型FSH(Follistim)之超排卵雌鼠取得，犧牲該雌鼠並取出輸卵

管。輸卵管置於數滴HTF培養液中，並撕開壺腹以釋放出卵母細胞群。將完整的卵母細胞群轉換至受精盤中並記數。表2提供每組五隻小鼠之卵母細胞數目。10 IU之FSH類似物TR-4401與TR-4901可產生更多的卵母細胞，並與10 IU與5 20 IU之野生型FSH(Follistim)相較。

在卵母細胞置於受精盤後，以分裝好的精子( $1 \times 10^6$ 至 $2 \times 10^6$ )加至每一受精盤中。將受精盤置於 $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$ 之培養箱中至少四小時，以完成受精過程。在培養四小時後，已受精之卵母細胞自受精盤轉移至清洗盤中，以250  $\mu\text{l}$  10 之HTF滴洗至少兩次。卵母細胞儲存於盤中之HTF液滴內，並置於 $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$ 之培養箱中至隔日。

受精24小時後，細胞自培養箱中移出。計數2-細胞胚胎(表2，欄標題為“2-細胞胚胎數”)，受精率係以卵母細胞發育成2-細胞胚胎之百分比決定(表2，欄標題為“2-細胞胚胎百分比”)。細胞經FSH類似物TR-4401與TR-4901處理所 15 產生的2-細胞胚胎數目大於控制組。所有組別(FSH類似物與野生型FSH)的受精比例皆很高。

該2-細胞胚胎隨即轉移至培養皿中進一步發育(表2，欄標題為“維持培養之2細胞胚胎數”)，或是植入假懷孕之母體內(表2，欄標題為“2-細胞胚胎轉移數”)。 20

維持於培養皿中之胚胎經觀察在受精後第四天形成囊胚。發育中的囊胚數目提供於表2，欄標題為“發育中的囊胚數目”。表2提供囊胚總數以及孵化之囊胚數目。

為了受精而植入之2-細胞胚胎係植入六至八週大之

CD1雌鼠體內。除了TR-4401組植入40個2-細胞胚胎以外，每一試驗組之三隻小鼠係植入60個2-細胞胚胎。小鼠以腹腔注射ketamine/zylazine溶液進行麻醉。一旦麻醉後，每隻小鼠便剃毛並在肋骨尾端以及背面至腹面前三分之一處切開一小切口。另在體壁處切開一切口，使其達到下腹空腔。使用鑷子夾住卵巢脂肪墊並小心取出卵巢、輸卵管以及子宮上端，並穿過體壁。將卵巢與輸卵管固定於棉布上以產生一卵巢-輸卵管接合角度。壺腹以光學顯微鏡辨識出，並以兩對超微細鑷子在囊中製造出一個小洞。胚胎以微滴定管轉移至壺腹內，以最小體積M2培養液夾帶胚胎。各器官重置回體壁中並以一針或二針縫合。皮膚切口以一或二個傷口夾密封。每日觀察該小鼠。十天後，檢查代理孕母小鼠是否有懷孕。表2，欄“由2-細胞胚胎轉移造成之懷孕”提供最後每一組之懷孕數目。FSH類似物TR-4901可產生最多的懷孕數。

以類似實驗比較TR-4401與野生型FSH，以生產作為終點。母鼠(3隻/組)注射1 IU hCG與3 IU懷孕母馬血清促性腺激素(PMSG)以作為控制組、1 IU野生型FSH(Gonal F)、3 IU野生型FSH(Gonal F)、1 IU TR-4401或3 IU TR-4401。小鼠於48小時後注射排卵劑量之5 IU hCG。在排卵劑量注射20小時後計算卵母細胞，並如前所述進行體外授精。隨後，將二十個2-細胞胚胎植入假懷孕母體中。表3提供此次試驗結果。相較於控制組及以重組野生型FSH處理之試驗組，接受1 IU TR-4401或3 IU TR-4401之試驗組可達到較多卵

母細胞數、較高囊胚生長率以及較高出生率。

表2活體外授精與胚胎轉移實驗，以TR-4401與TR-4901比較

重組野生型FSH(Follistim)

測試物劑量 (IU/小鼠)	卵母細胞數(每組)	2-細胞胚胎數	2-細胞胚胎百分比	2-細胞胚胎轉移數	培養基內存留2-細胞胚胎數	發育中之囊胚數	由2-細胞胚胎轉移而受孕
10 IU Follistim	77	77	100%	60(3雌)	12	全部6 (3孵化)	0
20 IU Follistim	165	161	98%	60(3雌)	101	52 (37孵化)	2
10 IU TR-4401	207	204	99%	40(2雌)	164	75 (38孵化)	1
10 IU TR-4901	376	369	98%	60(3雌)	171	197 (126孵化)	3

5

表3活體外授精、胚胎發育及活產實驗，以TR-4401比

較重組野生型FSH(Gonal-F)與PMSG(控制組)

測試物劑量 (IU/小鼠)	卵母細胞數(每組)	2-細胞胚胎數	2-細胞胚胎百分比	培養基內存留2-細胞胚胎數	發育中之囊胚數	發育中之囊胚百分比	生育率
3 IU PMSG	58	51	88%	31	18	58%	0/20
1 IU Gonal-F	26	26	100%	6	4	67%	0/20
3 IU Gonal-F	21	21	100%	1	0	0%	0/20
1 IU TR-4401	78	59	76%	19	12	63%	5/40
3 IU TR-4401	116	113	97%	53	38	72%	11/60

範例 5 處理 TR-4401 FSH 類似物與重組野生型

10 FSH(Gonal F)小鼠卵母細胞量與質之比較

得自B6CBAF1小鼠之卵母細胞係在體內處理之後進行質與量之評估，以控制組或不同劑量之重組野生型FSH或

FSH類似物TR-4401處理之結果如表4所述。體外授精發生於第1天(處理後72小時)，依據先前所述之流程處理。

表4處理組別(3小鼠/組)

處理(第2天)	hCG(第0天)
控制組：2.5 IU PMSG(Folligon)	5 IU hCG(Chorulon)
控制組：僅hCG	5 IU hCG
0.5 IU 重組FSH(Gonal F)+ 1 IU hCG(Ovitrelle)	5 IU hCG(Ovitrelle)
0.5 IU TR-4401 + 1 IU hCG(Ovitrelle)	5 IU hCG(Ovitrelle)
1 IU 重組FSH(Gonal F)+ 1 IU hCG(Ovitrelle)	5 IU hCG(Ovitrelle)
1 IU TR-4401 + 1 IU hCG(Ovitrelle)	5 IU hCG(Ovitrelle)
3 IU 重組FSH(Gonal F)+ 1 IU hCG(Ovitrelle)	5 IU hCG(Ovitrelle)
3 IU TR-4401 + 1 IU hCG(Ovitrelle)	5 IU hCG(Ovitrelle)

5

以TR-4401處理發現卵母細胞數量明顯增加。第21圖提供每一組在精子洗去時(就在體外授精之前)的卵母細胞總數。由圖顯示TR-4401在所有劑量下(0.5 IU、1 IU、3 IU)皆可產生最多的卵母細胞，與經重組野生型率泡刺激激素試驗組相較。

10

以TR-4401處理會增加體外授精的胚胎總數。第24圖提供每一組2-細胞胚胎的總數。該圖顯示TR-4401在所有劑量下(0.5 IU、1 IU、3 IU)都會產生更多的2-細胞胚胎，與經重組野生型FSH處理之試驗組相較。

15

在類似的實驗中，試驗組接受三種劑量0.5 IU、1 IU或3 IU之TR-4401或重組野生型FSH(Gonal F)結合1 IU之hCG。控制組接受三次1 IU hCG之劑量。在第3天時，所有組別皆給予排卵劑量15IU之hCG。小鼠之體外授精係如先前所

述進行。第22圖顯示經TR-4401 FSH類似物處理之小鼠在所有劑量下(3x(0.5 IU、1 IU、3 IU)+ 1 IU hCG)皆呈現較高的受精率，與重組野生型FSH(Gonal F)控制組相較。此外，經最低劑量TR-4401(3x 0.5 TR-4401+ 1 IU hCG)處理之小鼠卵母細胞較經較高劑量TR-4401處理者有較高的受精率。第23圖顯示經TR-4401 FSH類似物(所有劑量)處理之小鼠胚胎具有較高的囊胚形成率，與經重組野生型FSH處理之胚胎試驗組相較。經最低劑量TR-4401(3x 0.5 IU TR-4401+ 1 IU hCG)處理之小鼠胚胎較經較高劑量TR-4401處理者有較高的囊胚形成率。

#### 範例6FSH類似物之藥物動力學比較

藥物動力學實驗係用以決定FSH類似物TR-4401、TR-4402與TR-4901之吸收與清除速率，並與重組野生型FSH相較。係進行FSH清除試驗以決定血清中FSH量，單位為mIU/ml，隨著時間的變化，比較TR-4401、TR-4402與TR-4901以及重組野生型FSH。第17A圖提供試驗結果。圖中顯示TR-4401會有延遲清除效果，與TR-4402及TR-4901相較。FSH類似物TR-4402具有較短之作用時間，與其他類似物相較。類似地，第17B圖顯示FSH類似物TR-4401、TR-4402與TR-4901以及重組野生型FSH之衰退速率( $\ln$ [血清中FSH, mIU/ml])。TR-4402較其他類似物與重組野生型FSH(Follistem)具有較快的衰退速率。表5提供藥物動力學實驗的資料。此資料確認了FSH類似物TR-4402具有最大之清除率( $K_e$ )與吸收率( $K_a$ )。如同預期的，TR-4402的血清半

衰期與其他類似物與重組野生型FSH相較為最低。

表5FSH類似物TR-4901、TR-4401與TR-4402以及重組野生型FSH(Follistem)藥物動力學數據

	TR-4901	TR-4401	TR-4402	野生型FSH
Ke	0.09	0.076	0.124	0.099
Ka	0.5794	0.5654	1.55	0.3503
V	17.74	31.55	20.46	12.51
AUC(0-t) (mIU*小時/ml)	9328	6328	6868	8768
Tmax(小時)	3.8	4.1	1.8	5.0
Cmax(mIU/ml)	609.6	348.1	588.6	728.8
T1/2(小時)	7.7	9.1	5.6	7.0
AUC (mIU*小時/ml)	9508.8	6570.9	6897.1	8804.5

5

藥物動力學對於病患對FSH類似物之反應有決定性的影響。對於過度刺激症候之過度敏感病患而言，作用較快且作用時間較短之FSH類似物TR-4402，可使此類病患負擔的風險較小。其他病患則可能較適合FSH類似物如TR-4401，具有較長藥物動力學作用時間者。

10

係進行其他的藥物動力學實驗，並將TR-4401與重組野生型FSH(Gonal F)相較。在某一實驗中，小鼠係注射入單一劑量之重組野生型FSH或TR-4401。最終血液中含量係於注射68小時後決定。TR-4401之最終血液中FSH含量至少為重組野生型FSH之5-6倍。表6提供劑量與最終血液中FSH含量之資料。

15

表 6 FSH 之終血 FSH 數據

FSH	劑量( $\mu\text{g}$ )	終血 FSH 值(mIU/ml)
重組野生型 FSH(Gonal F)	2.22 $\mu\text{g}$	所有動物低於 2.5 mIU/ml
TR-4401	0.22 $\mu\text{g}$	所有動物低於 2.5 mIU/ml
TR-4401	2.2 $\mu\text{g}$	所有動物介於 12-15 mIU/ml

範例 7 改質作用以增加 FSH 類似物之血清半衰期

係進一步改質 FSH 類似物 TR-4402，在 N-端延長，如先  
 5 前所述，以增加其半衰期。其他可增進半衰期之改質係如  
 第 18 圖所示。係引入體外 cAMP 刺激試驗，使用 CHO 細胞，  
 比較 N-端經改質之 TR-4402(LA1-4402)、“野生型”N-端經改  
 質之 FSH(LA1-wt)、TR-4402 以及重組野生型 FSH(Follistem)  
 。第 19 圖顯示此種改質會延長 FSH 類似物 TR-4402 與重組野  
 10 生型 FSH 之半衰期。

係於混種 B6D2F1 小鼠中進行體內排卵試驗，比較 N-  
 端經改質之 TR-4402 與重組野生型 FSH。經 N-端經改質之  
 TR-4402 處理之小鼠可產生更多的卵母細胞，與重組野生型  
 FSH 或 hCG(控制組)相較，劑量分別為 0.5 IU、1.0 IU、2.5 IU  
 15 、5.0 IU 與 10 IU。實驗結果列於第 20 圖中。

所有在本發明所討論到的的文獻、專利案與專利申請  
 案皆附於參考資料中。在本發明此份說明書當中描述了許  
 多相關的較佳實施例，許多細節描述的目的在於詳細說明  
 本發明，熟習此技術領域者應認知到，本發明可容許其他  
 20 的實施例，且於此所描述的某些細節，亦可在不脫離本發  
 明原則下進行變化。

## 序列表

<110> SZKUDLINSI, Mariusz W.  
WIENTRAUB, Bruce D.

<120> 促卵泡成熟激素超促效剂

<130> 056815-5001-TW

<150> US 60/554,419

<151> 2004-03-19

<160> 24

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino terminal extension; potential glycosylation recognition site

<400> 3

Ala Asn Ile Thr Val  
 1 5

<210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino terminal extension; potential glycosylation recognition site

<400> 4

Ala Asn Ile Thr Val Asn Ile Thr Val  
 1 5

<210> 5  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Negatively charged amino acid insert to modify protein half-life

<400> 5

Gly Glu Phe Thr  
1

<210> 6  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Negatively charged amino acid insert to modify protein half-life

<400> 6

Gly Glu Phe Thr Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FSH segment with negatively charged amino acid insert to modify protein half-life

<400> 7

Ala Asp Pro Gly Glu Phe Thr Val Gln Asp Cys  
1 5 10

<210> 8  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FSH segment with negatively charged amino acid insert to modify protein half-life

<400> 8

Ala Asp Pro Gly Glu Phe Thr Thr Gln Asp Cys  
1 5 10

<210> 9  
<211> 97  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Mutated FSH alpha mature peptide sequence with N-terminal extension

<400> 9

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

Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln  
 20 25 30

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

Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys  
 50 55 60

Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys  
 65 70 75 80

Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys  
 85 90 95

Ser

<210> 10

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutated FSH alpha mature peptide sequence with N-terminal extension

<400> 10

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

Leu Gln Arg Asn Pro Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln  
 20 25 30

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

Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys  
 50 55 60

Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Arg Phe Lys  
 65 70 75 80

Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys  
 85 90 95

Ser

<210> 11  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Mutated FSH alpha mature peptide sequence with N-terminal extension

&lt;400&gt; 11

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

Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala  
 20 25 30

Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr  
 35 40 45

Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser  
 50 55 60

Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met  
 65 70 75 80

Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys  
 85 90 95

Tyr Tyr His Lys Ser  
 100

<210> 12  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Mutated FSH alpha mature peptide sequence with N-terminal extension

&lt;400&gt; 12

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

Pro Glu Cys Thr Leu Gln Arg Asn Pro Phe Phe Ser Arg Pro Gly Ala  
 20 25 30

Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr  
 35 40 45

Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser  
 50 55 60

Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met  
 65 70 75 80

Gly Arg Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys  
 85 90 95

Tyr Tyr His Lys Ser  
 100

<210> 13

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutated FSH beta mature peptide sequence

<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

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 Asn 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> 14

<211> 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Mutated FSH beta mature peptide sequence

&lt;400&gt; 14

Asn Ser Cys Arg 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 Asn 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

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Mutated FSH beta mature peptide sequence

&lt;400&gt; 15

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 Asn 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> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutated FSH beta mature peptide sequence

<400> 16

Asn Ser Cys Arg 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 Asn 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> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ser Arg Glu Pro Leu Arg Pro Trp Cys His Pro Ile Asn Ala Ile Leu  
1 5 10 15

# 200538465

Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr Val Asn Thr Thr  
20 25 30

Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Met Arg Val Leu Gln Ala Val  
35 40 45

Leu Pro Pro Leu Pro Gln Val Val Cys Thr Tyr Arg Asp Val Arg Phe  
50 55 60

Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val Asp Pro Val Val  
65 70 75 80

Ser Phe Pro Val Ala Leu Ser Cys Arg Cys Gly Pro Cys Arg Arg Ser  
85 90 95

Thr Ser Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu Thr Cys Asp His  
100 105 110

Pro Gln Leu Ser Gly Leu Leu Phe Leu  
115 120

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser  
1 5 10 15

Val Phe Leu His Val Leu His Ser  
20

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile  
1 5 10 15

Cys Cys

<210> 20

<211> 20

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Met Leu Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly  
 1 5 10 15

Gly Ala Trp Ala  
 20

<210> 21  
 <211> 692  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 21

Met Ala Leu Leu Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Leu Gly Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

Gly Cys His His Trp Leu Cys His Cys Ser Asn Arg Val Phe Leu Cys  
 20 25 30

Gln Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Thr Asp Leu Pro Arg Asn Ala  
 35 40 45

Ile Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val Ile Pro Lys Gly  
 50 55 60

Ser Phe Ala Gly Phe Gly Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ile Ser Gln Asn  
 65 70 75 80

Asp Val Leu Glu Val Ile Glu Ala Asp Val Phe Ser Asn Leu Pro Lys  
 85 90 95

Leu His Glu Ile Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asn Leu Leu Tyr Ile Asn  
 100 105 110

Pro Glu Ala Phe Gln Asn Leu Pro Ser Leu Arg Tyr Leu Leu Ile Ser  
 115 120 125

Asn Thr Gly Ile Lys His Leu Pro Ala Val His Lys Ile Gln Ser Leu  
 130 135 140

Gln Lys Val Leu Leu Asp Ile Gln Asp Asn Ile Asn Ile His Ile Val  
 145 150 155 160

Ala Arg Asn Ser Phe Met Gly Leu Ser Phe Glu Ser Val Ile Leu Trp  
 165 170 175

Leu Ser Lys Asn Gly Ile Glu Glu Ile His Asn Cys Ala Phe Asn Gly  
 180 185 190

Thr Gln Leu Asp Glu Leu Asn Leu Ser Asp Asn Asn Asn Leu Glu Glu  
 195 200 205

Leu Pro Asn Asp Val Phe Gln Gly Ala Ser Gly Pro Val Ile Leu Asp  
 210 215 220

Ile Ser Arg Thr Lys Val His Ser Leu Pro Asn His Gly Leu Glu Asn  
 225 230 235 240

Leu Lys Lys Leu Arg Ala Arg Ser Thr Tyr Arg Leu Lys Lys Leu Pro  
 245 250 255

Asn Leu Asp Lys Phe Val Thr Leu Met Glu Ala Ser Leu Thr Tyr Pro  
 260 265 270

Ser His Cys Cys Ala Phe Ala Asn Leu Lys Arg Gln Ile Ser Glu Leu  
 275 280 285

His Pro Ile Cys Asn Lys Ser Ile Leu Arg Gln Asp Ile Asp Asp Met  
 290 295 300

Thr Gln Ile Gly Asp Gln Arg Val Ser Leu Ile Asp Asp Glu Pro Ser  
 305 310 315 320

Tyr Gly Lys Gly Ser Asp Met Met Tyr Asn Glu Phe Asp Tyr Asp Leu  
 325 330 335

Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro Lys Pro Asp Ala Phe  
 340 345 350

Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile Leu Arg Val Leu Ile  
 355 360 365

Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn Thr Thr Val Leu Val  
 370 375 380

Val Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val Pro Arg Phe Leu Met  
 385 390 395 400

Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly Ile Tyr Leu Leu Leu  
 405 410 415

Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln Tyr His Asn Tyr Ala  
 420 425 430

Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala Ala Gly Phe Phe Thr  
 435 440 445

Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu Thr Ala Ile Thr Leu  
 450 455 460

Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln Leu Glu Cys Lys Val  
 465 470 475 480

Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Leu Gly Trp Thr Phe Ala  
 485 490 495

Phe Ala Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile Ser Ser Tyr Met Lys  
 500 505 510

Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser Pro Leu Ser Gln Leu  
 515 520 525

Tyr Val Met Ala Leu Leu Val Leu Asn Val Leu Ala Phe Val Val Ile  
 530 535 540

Cys Gly Cys Tyr Thr His Ile Tyr Leu Thr Val Arg Asn Pro Thr Ile  
 545 550 555 560

Val Ser Ser Ser Ser Asp Thr Lys Ile Ala Lys Arg Met Ala Thr Leu  
 565 570 575

Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile Ser Phe Phe Ala Ile  
 580 585 590

Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val Ser Lys Ala Lys Ile  
 595 600 605

Leu Leu Val Leu Phe Tyr Pro Ile Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe Leu  
 610 615 620

Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp Phe Phe Ile Leu Leu  
 625 630 635 640

Ser Lys Phe Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln Ile Tyr Arg Thr Glu  
 645 650 655

Thr Ser Ser Ala Thr His Asn Phe His Ala Arg Lys Ser His Cys Ser  
 660 665 670

Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Ser Tyr Val Leu Val Pro Leu Asn His  
 675 680 685

Ser Ser Gln Asn  
 690

<210> 22  
 <211> 695  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Met Ala Leu Leu Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Leu Ser Leu Gly Ser  
 1 5 10 15

Gly Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg Val Phe Leu Cys  
 20 25 30

Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp Leu Pro Arg Asn Ala  
 35 40 45

Ile Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val Ile Gln Lys Gly  
 50 55 60

Ala Phe Ser Gly Phe Gly Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ile Ser Gln Asn  
 65 70 75 80

Asp Val Leu Glu Val Ile Glu Ala Asp Val Phe Ser Asn Leu Pro Lys  
 85 90 95

Leu His Glu Ile Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asn Leu Leu Tyr Ile Thr  
 100 105 110

Pro Glu Ala Phe Gln Asn Leu Pro Asn Leu Gln Tyr Leu Leu Ile Ser  
 115 120 125

Asn Thr Gly Ile Lys His Leu Pro Asp Val His Lys Ile His Ser Leu  
 130 135 140

Gln Lys Val Leu Leu Asp Ile Gln Asp Asn Ile Asn Ile His Thr Ile  
 145 150 155 160

Glu Arg Asn Ser Phe Val Gly Leu Ser Phe Glu Ser Val Ile Leu Trp  
 165 170 175

Leu Asn Lys Asn Gly Ile Gln Glu Ile His Asn Cys Ala Phe Asn Gly  
 180 185 190

Thr Gln Leu Asp Ala Val Asn Leu Ser Asp Asn Asn Asn Leu Glu Glu  
 195 200 205

Leu Pro Asn Asp Val Phe His Gly Ala Ser Gly Pro Val Ile Leu Asp  
 210 215 220

Ile Ser Arg Thr Arg Ile His Ser Leu Pro Ser Tyr Gly Leu Glu Asn  
 225 230 235 240

Leu Lys Lys Leu Arg Ala Arg Ser Thr Tyr Asn Leu Lys Lys Leu Pro  
 245 250 255

Thr Leu Glu Lys Leu Val Ala Leu Met Glu Ala Ser Leu Thr Tyr Pro  
 260 265 270

Ser His Cys Cys Ala Phe Ala Asn Trp Arg Arg Gln Ile Ser Glu Leu  
 275 280 285

His Pro Ile Cys Asn Lys Ser Ile Leu Arg Gln Glu Val Asp Tyr Met  
 290 295 300

Thr Gln Ala Arg Gly Gln Arg Ser Ser Leu Ala Glu Asp Asn Glu Ser  
 305 310 315 320

Ser Tyr Ser Arg Gly Phe Asp Met Thr Tyr Thr Glu Phe Asp Tyr Asp  
 325 330 335

Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro Lys Pro Asp Ala  
 340 345 350

Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile Leu Arg Val Leu  
 355 360 365

Ile Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn Ile Ile Val Leu  
 370 375 380

Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val Pro Arg Phe Leu  
 385 390 395 400

Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly Ile Tyr Leu Leu  
 405 410 415

Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln Tyr His Asn Tyr  
 420 425 430

Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala Ala Gly Phe Phe  
 435 440 445

Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu Thr Ala Ile Thr  
 450 455 460

Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln Leu Asp Cys Lys  
 465 470 475 480

Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met Gly Trp Ile Phe  
 485 490 495

Ala Phe Ala Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile Ser Ser Tyr Met  
 500 505 510

Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser Pro Leu Ser Gln  
 515 520 525

Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu Ala Phe Val Val  
 530 535 540

Ile Cys Gly Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val Arg Asn Pro Asn  
 545 550 555 560

Ile Val Ser Ser Ser Ser Asp Thr Arg Ile Ala Lys Arg Met Ala Met  
 565 570 575

Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile Ser Phe Phe Ala  
 580 585 590

Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val Ser Lys Ala Lys  
 595 600 605

Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe  
 610 615 620

Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp Phe Phe Ile Leu  
 625 630 635 640

Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln Ile Tyr Arg Thr  
 645 650 655

Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg Asn Gly His Cys  
 660 665 670

Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Ile Leu Val Pro  
 675 680 685

Leu Ser His Leu Ala Gln Asn  
 690 695

<210> 23  
 <211> 700  
 <212> PRT  
 <213> Rattus sp.

<400> 23

Met Gly Arg Arg Val Pro Ala Leu Arg Gln Leu Leu Val Leu Ala Val  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Lys Pro Ser Gln Leu Gln Ser Arg Glu Leu Ser Gly Ser  
 20 25 30

Arg Cys Pro Glu Pro Cys Asp Cys Ala Pro Asp Gly Ala Leu Arg Cys  
 35 40 45

Pro Gly Pro Arg Ala Gly Leu Ala Arg Leu Ser Leu Thr Tyr Leu Pro  
 50 55 60

Val Lys Val Ile Pro Ser Gln Ala Phe Arg Gly Leu Asn Glu Val Val  
 65 70 75 80

Lys Ile Glu Ile Ser Gln Ser Asp Ser Leu Glu Arg Ile Glu Ala Asn  
 85 90 95

Ala Phe Asp Asn Leu Leu Asn Leu Ser Glu Leu Leu Ile Gln Asn Thr  
 100 105 110

Lys Asn Leu Leu Tyr Ile Glu Pro Gly Ala Phe Thr Asn Leu Pro Arg  
 115 120 125

Leu Lys Tyr Leu Ser Ile Cys Asn Thr Gly Ile Arg Thr Leu Pro Asp  
 130 135 140

Val Thr Lys Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asn Phe Ile Leu Glu Ile Cys  
 145 150 155 160

Asp Asn Leu His Ile Thr Thr Ile Pro Gly Asn Ala Phe Gln Gly Met  
 165 170 175

Asn Asn Glu Ser Val Thr Leu Lys Leu Tyr Gly Asn Gly Phe Glu Glu  
 180 185 190

Val Gln Ser His Ala Phe Asn Gly Thr Thr Leu Ile Ser Leu Glu Leu  
 195 200 205

Lys Glu Asn Ile Tyr Leu Glu Lys Met His Ser Gly Ala Phe Gln Gly  
 210 215 220

Ala Thr Gly Pro Ser Ile Leu Asp Ile Ser Ser Thr Lys Leu Gln Ala  
 225 230 235 240

Leu Pro Ser His Gly Leu Glu Ser Ile Gln Thr Leu Ile Ala Leu Ser  
 245 250 255

Ser Tyr Ser Leu Lys Thr Leu Pro Ser Lys Glu Lys Phe Thr Ser Leu  
 260 265 270

Leu Val Ala Thr Leu Thr Tyr Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Arg Asn  
 275 280 285

Leu Pro Lys Lys Glu Gln Asn Phe Ser Phe Ser Ile Phe Glu Asn Phe  
 290 295 300

Ser Lys Gln Cys Glu Ser Thr Val Arg Lys Ala Asp Asn Glu Thr Leu  
 305 310 315 320

Tyr Ser Ala Ile Phe Glu Glu Asn Glu Leu Ser Gly Trp Asp Tyr Asp  
 325 330 335

Tyr Gly Phe Cys Ser Pro Lys Thr Leu Gln Cys Ala Pro Glu Pro Asp  
 340 345 350

Ala Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Ala Phe Leu Arg Val  
 355 360 365

Leu Ile Trp Leu Ile Asn Ile Leu Ala Ile Phe Gly Asn Leu Thr Val  
 370 375 380

Leu Phe Val Leu Leu Thr Ser Arg Tyr Lys Leu Thr Val Pro Arg Phe  
 385 390 395 400

Leu Met Cys Asn Leu Ser Phe Ala Asp Phe Cys Met Gly Leu Tyr Leu  
 405 410 415

Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Ser Gln Thr Lys Gly Gln Tyr Tyr Asn  
 420 425 430

His Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ser Gly Cys Gly Ala Ala Gly Phe  
 435 440 445

Phe Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu Thr Val Ile  
 450 455 460

Thr Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr Tyr Ala Val Gln Leu Asp Gln  
 465 470 475 480

Lys Leu Arg Leu Arg His Ala Ile Pro Ile Met Leu Gly Gly Trp Leu  
 485 490 495

Phe Ser Thr Leu Ile Ala Thr Met Pro Leu Val Gly Ile Ser Asn Tyr  
 500 505 510

Met Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Val Glu Ser Thr Leu Ser  
 515 520 525

Gln Val Tyr Ile Leu Ser Ile Leu Ile Leu Asn Val Val Ala Phe Val  
 530 535 540

Val Ile Cys Ala Cys Tyr Ile Arg Ile Tyr Phe Ala Val Gln Asn Pro  
 545 550 555 560

Glu Leu Thr Ala Pro Asn Lys Asp Thr Lys Ile Ala Lys Lys Met Ala  
 565 570 575

Ile Leu Ile Phe Thr Asp Phe Thr Cys Met Ala Pro Ile Ser Phe Phe  
 580 585 590

Ala Ile Ser Ala Ala Phe Lys Val Pro Leu Ile Thr Val Thr Asn Ser  
 595 600 605

Lys Ile Leu Leu Val Leu Phe Tyr Pro Val Asn Ser Cys Ala Asn Pro  
 610 615 620

Phe Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Ala Phe Gln Arg Asp Phe Leu Leu  
 625 630 635 640

Leu Leu Ser Arg Phe Gly Cys Cys Lys Arg Arg Ala Glu Leu Tyr Arg  
 645 650 655

Arg Lys Glu Phe Ser Ala Tyr Thr Ser Asn Cys Lys Asn Gly Phe Pro  
660 665 670

Gly Ala Ser Lys Pro Ser Gln Ala Thr Leu Lys Leu Ser Thr Val His  
675 680 685

Cys Gln Gln Pro Ile Pro Pro Arg Ala Leu Thr His  
690 695 700

<210> 24  
<211> 699  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Lys Gln Arg Phe Ser Ala Leu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Gln Pro Pro Leu Pro Arg Ala Leu Arg Glu Ala Leu Cys Pro Glu  
20 25 30

Pro Cys Asn Cys Val Pro Asp Gly Ala Leu Arg Cys Pro Gly Pro Thr  
35 40 45

Ala Gly Leu Thr Arg Leu Ser Leu Ala Tyr Leu Pro Val Lys Val Ile  
50 55 60

Pro Ser Gln Ala Phe Arg Gly Leu Asn Glu Val Ile Lys Ile Glu Ile  
65 70 75 80

Ser Gln Ile Asp Ser Leu Glu Arg Ile Glu Ala Asn Ala Phe Asp Asn  
85 90 95

Leu Leu Asn Leu Ser Glu Ile Leu Ile Gln Asn Thr Lys Asn Leu Arg  
100 105 110

Tyr Ile Glu Pro Gly Ala Phe Ile Asn Leu Pro Gly Leu Lys Tyr Leu  
115 120 125

Ser Ile Cys Asn Thr Gly Ile Arg Lys Phe Pro Asp Val Thr Lys Val  
130 135 140

Phe Ser Ser Glu Ser Asn Phe Ile Leu Glu Ile Cys Asp Asn Leu His  
145 150 155 160

Ile Thr Thr Ile Pro Gly Asn Ala Phe Gln Gly Met Asn Asn Glu Ser  
165 170 175

Val Thr Leu Lys Leu Tyr Gly Asn Gly Phe Glu Glu Val Gln Ser His  
 180 185 190

Ala Phe Asn Gly Thr Thr Leu Thr Ser Leu Glu Leu Lys Glu Asn Val  
 195 200 205

His Leu Glu Lys Met His Asn Gly Ala Phe Arg Gly Ala Thr Gly Pro  
 210 215 220

Lys Thr Leu Asp Ile Ser Ser Thr Lys Leu Gln Ala Leu Pro Ser Tyr  
 225 230 235 240

Gly Leu Glu Ser Ile Gln Arg Leu Ile Ala Thr Ser Ser Tyr Ser Leu  
 245 250 255

Lys Lys Leu Pro Ser Arg Glu Thr Phe Val Asn Leu Leu Glu Ala Thr  
 260 265 270

Leu Thr Tyr Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Arg Asn Leu Pro Thr Lys  
 275 280 285

Glu Gln Asn Phe Ser His Ser Ile Ser Glu Asn Phe Ser Lys Gln Cys  
 290 295 300

Glu Ser Thr Val Arg Lys Val Ser Asn Lys Thr Leu Tyr Ser Ser Met  
 305 310 315 320

Leu Ala Glu Ser Glu Leu Ser Gly Trp Asp Tyr Glu Tyr Gly Phe Cys  
 325 330 335

Leu Pro Lys Thr Pro Arg Cys Ala Pro Glu Pro Asp Ala Phe Asn Pro  
 340 345 350

Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asp Phe Leu Arg Val Leu Ile Trp Leu  
 355 360 365

Ile Asn Ile Leu Ala Ile Met Gly Asn Met Thr Val Leu Phe Val Leu  
 370 375 380

Leu Thr Ser Arg Tyr Lys Leu Thr Val Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn  
 385 390 395 400

Leu Ser Phe Ala Asp Phe Cys Met Gly Leu Tyr Leu Leu Leu Ile Ala  
 405 410 415

Ser Val Asp Ser Gln Thr Lys Gly Gln Tyr Tyr Asn His Ala Ile Asp  
 420 425 430

Trp Gln Thr Gly Ser Gly Cys Ser Thr Ala Gly Phe Phe Thr Val Phe  
 435 440 445

Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu Thr Val Ile Thr Leu Glu Arg  
 450 455 460

Trp His Thr Ile Thr Tyr Ala Ile His Leu Asp Gln Lys Leu Arg Leu  
 465 470 475 480

Arg His Ala Ile Leu Ile Met Leu Gly Gly Trp Leu Phe Ser Ser Leu  
 485 490 495

Ile Ala Met Leu Pro Leu Val Gly Val Ser Asn Tyr Met Lys Val Ser  
 500 505 510

Ile Cys Phe Pro Met Asp Val Glu Thr Thr Leu Ser Gln Val Tyr Ile  
 515 520 525

Leu Thr Ile Leu Ile Leu Asn Val Val Ala Phe Phe Ile Ile Cys Ala  
 530 535 540

Cys Tyr Ile Lys Ile Tyr Phe Ala Val Arg Asn Pro Glu Leu Met Ala  
 545 550 555 560

Thr Asn Lys Asp Thr Lys Ile Ala Lys Lys Met Ala Ile Leu Ile Phe  
 565 570 575

Thr Asp Phe Thr Cys Met Ala Pro Ile Ser Phe Phe Ala Ile Ser Ala  
 580 585 590

Ala Phe Lys Val Pro Leu Ile Thr Val Thr Asn Ser Lys Val Leu Leu  
 595 600 605

Val Leu Phe Tyr Pro Ile Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Ala  
 610 615 620

Ile Phe Thr Lys Thr Phe Gln Arg Asp Phe Phe Leu Leu Leu Ser Lys  
 625 630 635 640

Phe Gly Cys Cys Lys Arg Arg Ala Glu Leu Tyr Arg Arg Lys Asp Phe  
 645 650 655

Ser Ala Tyr Thr Ser Asn Cys Lys Asn Gly Phe Thr Gly Ser Asn Lys  
660 665 670

Pro Ser Gln Ser Thr Leu Lys Leu Ser Thr Leu His Cys Gln Gly Thr  
675 680 685

Ala Leu Leu Asp Lys Thr Arg Tyr Thr Glu Cys  
690 695

### 【圖式簡單說明】

第1A-E圖顯示各種單一突變與野生型(WT)FSH活體外生物活性效用之比較，其係利用短暫轉染CHO-FSHR細胞測定。其係測定在CHO-FSHR細胞中對於cAMP產生之刺激。其中第1D圖也顯示”低生物活性”突變之範例(F18R)。

第2圖顯示於轉染CHO-FSHR細胞中 $\beta$  E4R突變對hFSH產生之影響。

第3A與3B圖顯示各種突變組合之FSH於活體外生物活性效用之比較，其測定係利用短暫轉染CHO-FSHR細胞。其係測定在CHO-FSHR細胞中具結合取代之FSH類似物對於cAMP產生之刺激。

第4A與4B圖顯示大鼠與人類LHR之FSH類似物與野生型FSH之交叉反應比較。第4A圖顯示FSH TR-4402與大鼠黃體生成激素受體間之交叉反應，其係測定在大鼠-LHR/293細胞中對於cAMP產生之刺激。第4B圖顯示FSH TR-4402與人類黃體生成激素受體間並無交叉反應，其係測定在DSI-3C4細胞中對於cAMP產生之刺激。

第5圖係FSH結構圖，顯示 $\alpha$ 與 $\beta$ -次單元具有環的結構。

第6A與6B圖分別顯示CHO細胞針對純化之類似物TR-4402與野生型FSH，以及純化之類似物TR-4401與野生

型FSH之cAMP產量比較。其中TR4402 LOT2較Follistim具有30倍之較高療效及17%之較高Vmax。

第7圖顯示KGN細胞針對純化之類似物TR-4402與野生型FSH之cAMP產量比較。

5 第8圖顯示GLHR-15細胞針對純化之類似物TR-4402與野生型FSH之cAMP產量比較。其中之GLHR-15細胞係具有低FSHR數目。

第9圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下卵泡之存活率，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第10圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下竇之形成，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第11A圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下COC之黏液化作用，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。第11B圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下hCG刺激之卵母細胞釋出率(%)，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第12圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)與類似物TR-4402(化合物#4)存在下以PB穿壁方式測定卵母細胞細胞核成熟度，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第13A與13B圖顯示在野生型hFSH(化合物#3)(13A)與類似物TR-4402(化合物#4)(13B)存在下黃體激素之產生，係於活體外卵泡之生物分析期間觀察。

第14A-14D圖顯示利用未成熟雌性Sprague-Dawley大鼠(Steelman與Pohley, 1953)進行不含hCG放大之Steelman-Pohley生物分析之結果。第14A、C與D圖為比較TR-4402與野生型(Follistim)所得卵巢重量之差異。第14B圖為生物分析期間TR-4402與野生型FSH血清濃度之比較。其中第14D圖之縱軸係以體重重量校正卵巢重量, 由 $100 \times \text{卵巢重(mg)}/\text{體重(g)}$ 計算而得。

第15圖係處理類似物TR-4402與處理野生型FSH(Follistim)大鼠卵巢內雌性激素含量之比較。其係表示由Steelman-Pohley試驗所得之卵巢內 $17\beta$ -雌二醇的量, 其中卵巢係於3次注射後第4天收集。

第16圖係大鼠以相同劑量之野生型FSH(Follistim)與類似物TR-4402刺激後之血清中抑制素 $\beta$ 濃度。其係由Steelman-Pohley試驗(3X 注射)所得。

第17A與17B圖顯示FSH類似物TR-4901、TR-4401與TR-4402相較於野生型FSH之排除與吸收情況。其中第17A圖代表試驗結果數據, 而第17B圖係以 $K_e$ 代表排除率。

第18圖顯示用以延長FSH類似物半衰期之N-端延長(SEQ ID Nos. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11與12)。

第19圖係以CHO細胞處理LA1-4402(TR-4402之進一步改質以增加FSH之血清半衰期)、LA1 FSH(FSH改質以增加其血清半衰期)、TR-4402與野生型FSH後cAMP產量之比較。其係利用對於hFSHR-CHO細胞中cAMP之刺激而測定。

第20圖係比較處理LA1-4402(TR-4402之進一步改質以

增加血清半衰期)、野生型FSH(Follistim)與單獨hCG時活體內排卵數目增加情形。其係在未成熟混種B6D2F1小鼠中所做之排卵試驗。其中LA1-4402之Vmax增加2倍。

5 第21圖係比較處理TR-4401與野生型FSH(Gonal F)後活體內卵母細胞總數之增加情形。其係在精子洗去時計算之健康卵母細胞總數(由3隻小鼠而得)。

第22圖係比較處理TR-4401與野生型FSH(Gonal F)後活體內卵母細胞受精率之增加情形。

10 第23圖係比較處理TR-4401與野生型FSH(Gonal F)後活體內囊胚形成率之增加情形。

第24圖係比較處理TR-4401與野生型FSH(Gonal F)後活體內胚胎總數之增加情形。

**【主要元件符號說明】**

(無)

## 五、中文發明摘要：

本發明提供FSH之超活性類似體，相較於野生型FSH，其於活體外與活體內之生物活性均有增加。特別的是，本發明之類似體，相較於野生型之蛋白，其效能增加至少十倍或最大效力至少增加百分之十。該類似體係特別用於治療低FSH受體表現或FSH受體反應不足之個體，以及用於治療任何與醣蛋白激素活性有關之病症。

## 六、英文發明摘要：

This invention provides superactive analogs of FSH demonstrating enhanced bioactivity both in vitro and in vivo as compared to wild type FSH. In particular, the analogs of the invention demonstrate at least a ten fold increase in potency or at least a ten percent increase in maximal efficacy as compared to wild type protein. The analogs are particularly useful for treating subjects showing low FSH receptor expression or poor FSH receptor responsiveness, and for the treatment of any condition associated with glycoprotein hormone activity.

## 十、申請專利範圍：

1. 一種經改質之促卵泡成熟激素(FSH)，其含有不同於野生型FSH之胺基酸序列，該經改質之FSH包含有一經改質之 $\alpha$ -次單元，其中該經改質FSH之效能，相較於野生型FSH，增加了至少約十倍。  
5
2. 如申請專利範圍第1項之經改質FSH，其中該經改質FSH之效能，相較於野生型FSH，增加了至少約30倍。
3. 如申請專利範圍第1項之經改質FSH，其中該經改質之醣蛋白激素之效能，相較於野生型FSH，增加了至少約  
10 50倍。
4. 如申請專利範圍第1項之經改質FSH，其中該經改質FSH係選自於由人類、牛、馬、豬、羊、鼠、靈長類、魚類等所構成之群組中。
5. 如申請專利範圍第4項之經改質FSH，其中該經改質  
15 FSH係屬於人類。
6. 如申請專利範圍第5項之經改質FSH，其中該經改質之 $\alpha$ -次單元包含有至少兩個鹼性胺基酸，位於對應於SEQ ID No.1之13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81等位置的位置。
- 20 7. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置14與66。
8. 如申請專利範圍第7項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係E14R與N66R。
9. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元

之該等鹼性胺基酸係位於位置14與73。

10. 如申請專利範圍第9項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係E14R與G73R。
11. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置16與20。
12. 如申請專利範圍第11項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係P16R與Q20R。
13. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置20與21。
14. 如申請專利範圍第13項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係Q20R與P21R。
15. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元更包含一第三鹼性胺基酸，其係位於一選自於由位置13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81所構成之群組中的位置。
16. 如申請專利範圍第15項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置16、20與21。
17. 如申請專利範圍第16項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係P16R、Q20R與P21R。
18. 如申請專利範圍第15項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置14、20與73。
19. 如申請專利範圍第18項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係E14R、Q20R與G73R。
20. 如申請專利範圍第15項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元

之該等鹼性胺基酸係位於位置66、73與81。

21. 如申請專利範圍第20項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係N66K、G73K與A81K。
22. 如申請專利範圍第15項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置14、66與73。
23. 如申請專利範圍第22項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係E14R、N66R與G73R。
24. 如申請專利範圍第15項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置14、21與73。
25. 如申請專利範圍第24項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係E14R、P21R與G73R。
26. 如申請專利範圍第15項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元更包含一第四鹼性胺基酸，其係位於一選自於由位置13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81所構成之群組中的位置。
27. 如申請專利範圍第26項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置13、14、16與20。
28. 如申請專利範圍第27項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係Q13R、E14R、P16R與Q20R。
29. 如申請專利範圍第28項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係Q13K、E14K、P16K與Q20K。
30. 如申請專利範圍第26項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元更包含一第五鹼性胺基酸，其係位於一選自於由位置13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81

所構成之群組中的位置。

31. 如申請專利範圍第30項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置14、20、21、66與73。
32. 如申請專利範圍第31項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係E14R、Q20R、P21R、N66R與G73R。
33. 如申請專利範圍第30項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置14、16、20、66與73。
34. 如申請專利範圍第33項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係E14R、P16R、Q20R、N66R與G73R。
35. 如申請專利範圍第30項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元更包含一第六鹼性胺基酸，其係位於選自於由位置13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81所構成之群組中的位置。
36. 如申請專利範圍第35項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置13、14、16、20、66與73。
37. 如申請專利範圍第36項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係Q13K、E14K、P16K、Q20K、N66K與G73K。
38. 如申請專利範圍第35項之經改質FSH，其中該 $\alpha$ -次單元之該等鹼性胺基酸係位於位置14、16、20、21、66與73。
39. 如申請專利範圍第38項之經改質FSH，其中該等鹼性胺基酸係E14R、P16R、Q20R、P21R、N66R與G73R。
40. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該等鹼性胺

基酸係選自於由離胺酸(lysine)與精胺酸(arginine)所構成之群組中。

41. 如申請專利範圍第1項之經改質FSH，其更包含有一經改質之 $\beta$ -次單元。
- 5 42. 如申請專利範圍第41項之經改質FSH，其中該經改質之 $\beta$ -次單元包含有至少一個鹼性胺基酸，其係位於一對應於SEQ ID No.2之位置2、4、14、63、64、67與69之位置。
- 10 43. 如申請專利範圍第42項之經改質FSH，其中該鹼性胺基酸係E4R。
44. 一種譯碼為如申請專利範圍第1項之經改質FSH  $\alpha$ -次單元之核酸。
45. 一種包含如申請專利範圍第44項之核酸的載體，其中該載體係適用於表現該核酸。
- 15 46. 一種包含如申請專利範圍第45項之載體的宿主細胞，其中該宿主細胞係適用於表現該核酸。
- 20 47. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該經改質FSH在該 $\alpha$ -次單元中除了位置13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81之外的位置處，具備低於五個胺基酸之取代處。
48. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該經改質FSH在該 $\alpha$ -次單元中除了位置13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81之外的位置處，具備低於四個胺基酸之取代處。

49. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該經改質FSH在該 $\alpha$ -次單元中除了位置13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81之外的位置處，具備低於三個胺基酸之取代處。
- 5 50. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該經改質FSH在該 $\alpha$ -次單元中除了位置13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81之外的位置處，具備低於二個胺基酸之取代處。
- 10 51. 如申請專利範圍第6項之經改質FSH，其中該經改質FSH在該 $\alpha$ -次單元中除了位置13、14、16、17、20、21、22、66、68、73、74與81之外的位置處，具備與野生型FSH完全相同的胺基酸序列。
52. 如申請專利範圍第1項之經改質FSH，相較於野生型FSH，其血漿中的半衰期增加。
- 15 53. 如申請專利範圍第52項之經改質FSH，其中該經改質FSH更包含至少一具備潛在醣化作用位置之序列，該序列係選自於由包含一N-醣化作用位置之序列與包含一O-醣化作用位置之序列所構成之群組中。
- 20 54. 如申請專利範圍第53項之經改質FSH，其中該具備潛在醣化作用辨識位置之至少一序列係在該 $\alpha$ -鏈上之一N-端延長部分。
55. 如申請專利範圍第54項之經改質FSH，其中該N-端延長部分係選自於由ANITV(SEQ ID No. 3)與ANITVNITV(SEQ ID No. 4)所構成之群組。

56. 如申請專利範圍第53項之經改質FSH，其中該具備潛在醱化作用辨識位置之至少一序列係在該 $\beta$ -鏈中之一取代處。
57. 如申請專利範圍第56項之經改質FSH，其中該取代處係選自於由Y58N與V78N所構成之群組。
58. 如申請專利範圍第52項之經改質FSH，其中該經改質FSH係經聚乙二醇化。
59. 如申請專利範圍第52項之經改質FSH，其中該經改質FSH係經改變以增加該分子內帶負電基之數量，而增加血漿中半衰期。
60. 如申請專利範圍第59項之經改質FSH，其中該等帶負電基係選自於由穀胺酸(glutamate)與天冬胺酸(aspartate)所構成之群組。
61. 如申請專利範圍第60項之經改質FSH，其中該改變係選自於由 $\alpha$ -次單元A85E與A85D之取代所構成之群組。
62. 如申請專利範圍第59項之經改質FSH，其中該改變係將含有一或更多帶負電基之胺基酸序列插入該經改質之FSH中。
63. 如申請專利範圍第62項之經改質FSH，其中該插入係選自於由GEFT(SEQ ID No. 5)與GEFTT(SEQ ID No. 6)所構成之群組。
64. 如申請專利範圍第63項之經改質FSH，其中該插入係在該 $\alpha$ -次單元。
65. 如申請專利範圍第64項之經改質FSH，其中該插入係伴

隨有一或更多胺基酸的刪除。

66. 如申請專利範圍第64項之經改質FSH，其中該插入係選自於由 APD-GEFT-VQDC(SEQ ID No. 7) 與 APD-GEFTT-QDC(SEQ ID No. 8)所構成之群組。
- 5 67. 一種協助個體生育之方法，其包含投予一輔助量之如申請專利範圍第1項之經改質FSH。
68. 一種有效量之如申請專利範圍第1項之經改質FSH用於製造一種組成物的用途，該組成物係用以在一病患診斷及/或治療一和醣蛋白激素活性有關之病症。
- 10 69. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病症為排卵異常(ovulatory dysfunction)。
70. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病症為黃體期缺陷(luteal phase defect)。
71. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病症為不明原因性不孕症(unexplained infertility)。
- 15 72. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病症為男性因素不孕症(male factor infertility)。
73. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病症為時限性受孕(time-limited conception)。
- 20 74. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病患成長中之卵泡呈現低FSH受體表現量。
75. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病患呈現低FSH受體感受性。
76. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病患呈現FSH

受體結合性缺乏。

77. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病患呈現FSH受體偶合性缺乏。

78. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病患呈現雄性禿頭。

79. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病患呈現睪固酮(testosterone)生成量缺乏。

80. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病患呈現腦下垂體衰退或損傷。

81. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病症為卵巢癌。

82. 如申請專利範圍第68項之用途，其中該病症為睪丸癌。

83. 一種如申請專利範圍第1項之經改質FSH用於製造一第一藥劑及一第二藥劑的用途，該第一藥劑及第二藥劑係用於以該順序傳遞至一正在進行輔助生育治療之病患以降低該病患之過度刺激症候群，其中該第一藥劑包含：

一輔助量之第一經改質FSH，其中相較於野生型FSH，該第一經改質FSH之血漿中半衰期係經增加的；以及該第二藥劑包含：

一輔助量之第二經改質FSH，其中相較於該第一經改質FSH，該第二經改質FSH之血漿中半衰期係經減少的，其中相較於在輔助生育治療期間僅投予該第一經改質FSH之相同病患，其卵巢過度刺激的情況係為降低的。

84. 一種改善動物卵母細胞品質之方法，其包含：  
投予一有效量之超活性促卵泡成熟激素於該動物，  
其中該超活性促卵泡成熟激素含有一 $\alpha$ -次單元，該  
 $\alpha$ -次單元之一或更多個位置具有鹼性胺基酸，該等位  
置係選自於由13、14、16與20等位置所構成之群組。
85. 如申請專利範圍第84項之方法，其中該卵母細胞品質  
改善之特徵在於，相較於接受等量之重組野生型FSH  
的類似動物，可改善該動物卵母細胞之受精率。
86. 一種如申請專利範圍第85項之方法，其中該卵母細胞  
之受精率因對於該卵母細胞數投予最大有效劑量之該  
超活性促卵泡成熟激素而增加至少約10%。
87. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該卵母細胞  
品質改善之特徵在於，相較於接受等量之重組野生型  
FSH的類似動物，可改善該動物每一受精卵之胚胎形成  
率。
88. 一種如申請專利範圍第87項之方法，其中該胚胎形成  
率因對於該卵母細胞數投予最大有效劑量之該超活性  
促卵泡成熟激素而增加至少約10%。
89. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該卵母細胞品  
質改善之特徵在於，相較於接受等量之重組野生型FSH  
的類似動物，可改善該動物每一受精卵之胚胎總數。
90. 一種如申請專利範圍第89項之方法，其中該每一受精  
卵之胚胎總數因對於該卵母細胞數投予最大有效劑量  
之該超活性促卵泡成熟激素而增加至少約10%。

91. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該 $\alpha$ -次單元之該鹼性胺基酸為精胺酸、離胺酸、組胺酸或其等之改質物。
- 5 92. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該 $\alpha$ -次單元之該鹼性胺基酸於中性pH下為帶正電荷。
93. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該超活性FSH在其13、14、16與20位置含有一精胺酸。
94. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素在其13、14、16與20等位置含有一精胺酸。
- 10 95. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該 $\alpha$ -次單元含有一改質處以延長半衰期。
96. 一種如申請專利範圍第95項之方法，其中該增加半衰期之改質為ANITV之延長。
- 15 97. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素係人類超活性促卵泡成熟激素。
98. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該動物係選自於由人類、小鼠、大鼠、靈長類、兔、豬、牛、馬、羊與狗所構成之群組。
- 20 99. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素係利用注射或攝取而被投予。
100. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其更包含投予hCG。
101. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素含有一野生型 $\alpha$ -次單元。

102. 一種如申請專利範圍第84項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素含有一在位置4為鹼性胺基酸之 $\alpha$ -次單元。
103. 一種如申請專利範圍第102項之方法，其中該鹼性胺基酸為精胺酸、離胺酸、組胺酸或其等之改質物。
- 5 104. 一種誘發動物超排卵(superovulation)之方法，包含有：  
投予一有效量之超活性促卵泡成熟激素於該動物，  
其中該超活性促卵泡成熟激素含有一 $\alpha$ -次單元，該 $\alpha$ -次單元之一或更多個位置具有鹼性胺基酸，該等位置係選自於由位置13、14、16與20所構成之群組。
- 10 105. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該超排卵之特徵在於，相較於接受等量之重組野生型FSH的類似動物，可增加卵母細胞數。
106. 一種如申請專利範圍第105項之方法，其中平均卵子數因對於卵母細胞數投予最大有效劑量之該超活性促卵泡成熟激素而增加至少約10%。
- 15 107. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該 $\alpha$ -次單元之該鹼性胺基酸為精胺酸、離胺酸、組胺酸或其等之改質物。
- 20 108. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該 $\alpha$ -次單元之該鹼性胺基酸於中性pH下為帶正電荷。
109. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該超活性FSH在其13、14、16與20位置含有精胺酸。
110. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素在其13、14、16與20位置含有離胺酸。

111. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該 $\alpha$ -次單元含有一改質處以增加半衰期。
112. 一種如申請專利範圍第111項之方法，其中該增加半衰期之改質為ANITV(SEQ ID No. 3)之延長。
- 5 113. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素係人類超活性促卵泡成熟激素。
114. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該動物係選自於由人類、小鼠、大鼠、靈長類、兔、豬、牛、馬、羊與狗所構成之群組。
- 10 115. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素係利用注射或攝取而被投予。
116. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其更包含投予hCG。
117. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該超活性促
- 15 卵泡成熟激素含有一野生型 $\alpha$ -次單元。
118. 一種如申請專利範圍第104項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素含有一在位置4為鹼性胺基酸之 $\alpha$ -次單元。
119. 一種如申請專利範圍第118項之方法，其中該鹼性胺基
- 20 酸為精胺酸、離胺酸、組胺酸或其等之改質物。
120. 一種提高活體外受精之方法，其包含有：  
投予一有效量之超活性促卵泡成熟激素於該動物，  
其中該超活性促卵泡成熟激素含有一 $\alpha$ -次單元，該 $\alpha$ -次單元在其一或更多個位置具有鹼性胺基酸，該等

位置係選自於由立置13、14、16與20所構成之群組。

121.一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該 $\alpha$ -次單元之該鹼性胺基酸為精胺酸、離胺酸、組胺酸或其等之改質物。

5 122.一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該 $\alpha$ -次單元之該鹼性胺基酸在中性pH下為帶正電荷。

123.一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該超活性FSH在其13、14、16與20位置含有精胺酸。

10 124.一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素在其13、14、16與20位置含有離胺酸。

125.一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該 $\alpha$ -次單元含有一改質處以增加半衰期。

126.一種如申請專利範圍第125項之方法，其中該增加半衰期之改質為ANITV(SEQ ID No. 3)之延長。

15 127.一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素係人類超活性促卵泡成熟激素。

128.一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該動物係選自於由人類、小鼠、大鼠、靈長類、兔、豬、牛、馬、羊與狗所構成之群組。

20 129.一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素係利用注射或攝取而被投予。

130.一種如申請專利範圍第120項之方法，其更包含投予hCG。

131.一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該超活性促

卵泡成熟激素含有一野生型 $\alpha$ -次單元。

132. 一種如申請專利範圍第120項之方法，其中該超活性促卵泡成熟激素含有一在位置4為鹼性胺基酸之 $\alpha$ -次單元。

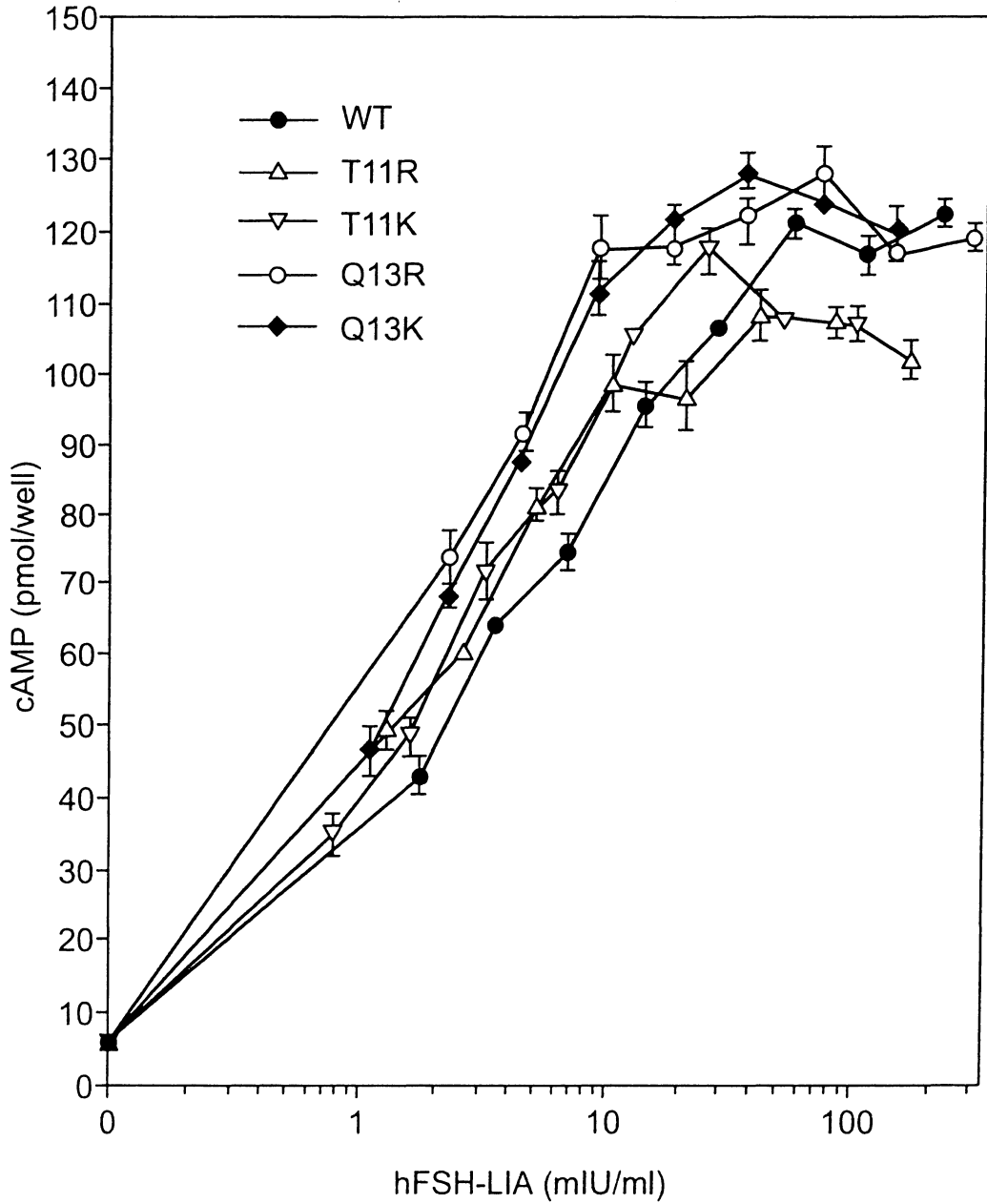
5 133. 一種如申請專利範圍第132項之方法，其中該鹼性胺基酸為精胺酸、離胺酸、組胺酸或其等改質物。

134. 如申請專利範圍第1項之經改質FSH，其中相較於野生型FSH，該血漿中半衰期係經減少的。

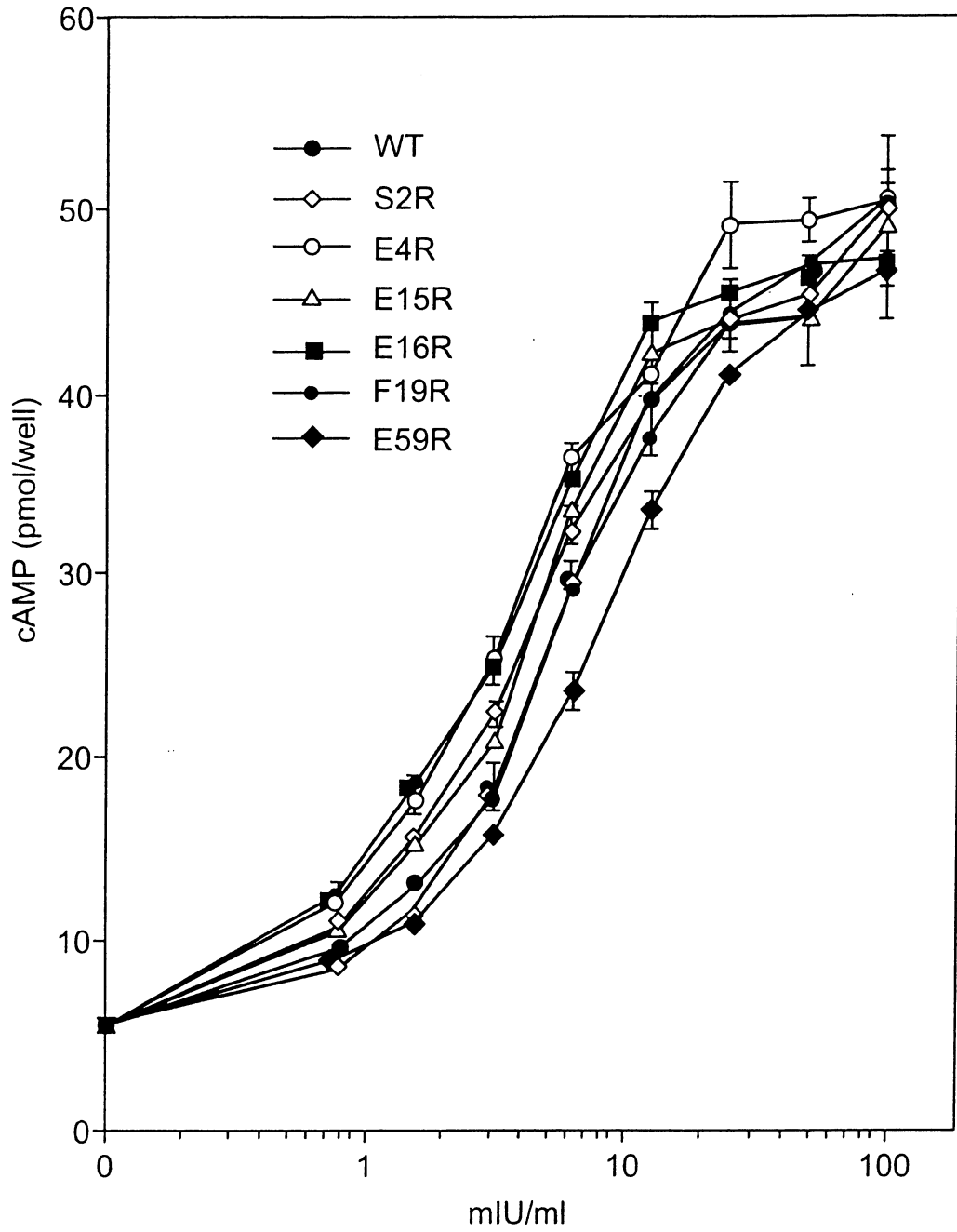
135. 如申請專利範圍第1項之經改質FSH，其中相較於野生型FSH，其吸收降低。

10 136. 如申請專利範圍第1項之經改質FSH，其中相較於野生型FSH，其吸收升高。

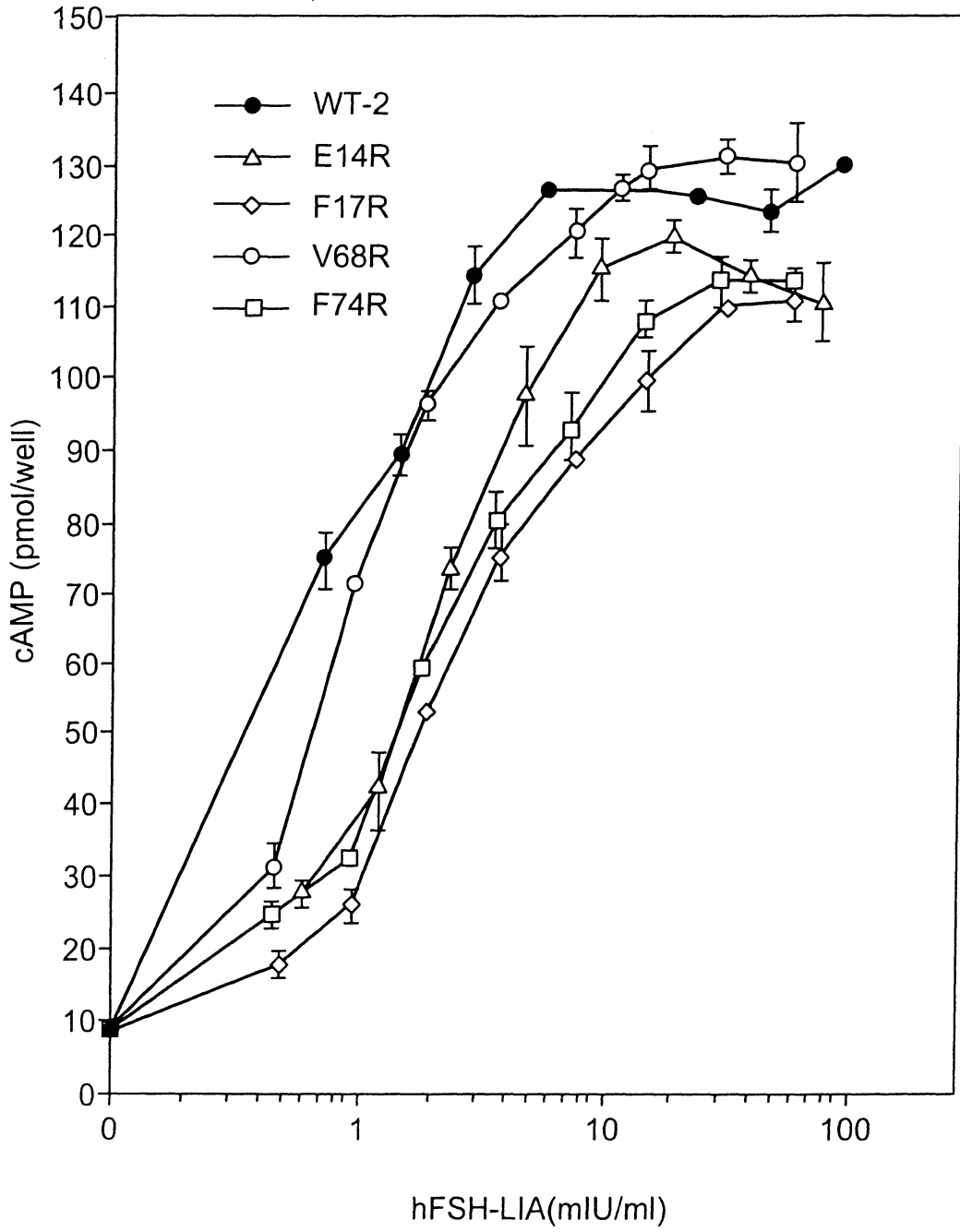
137. 如申請專利範圍第1項之經改質FSH，其中相較於野生型FSH，其與FSH受體之結合親和力增加。



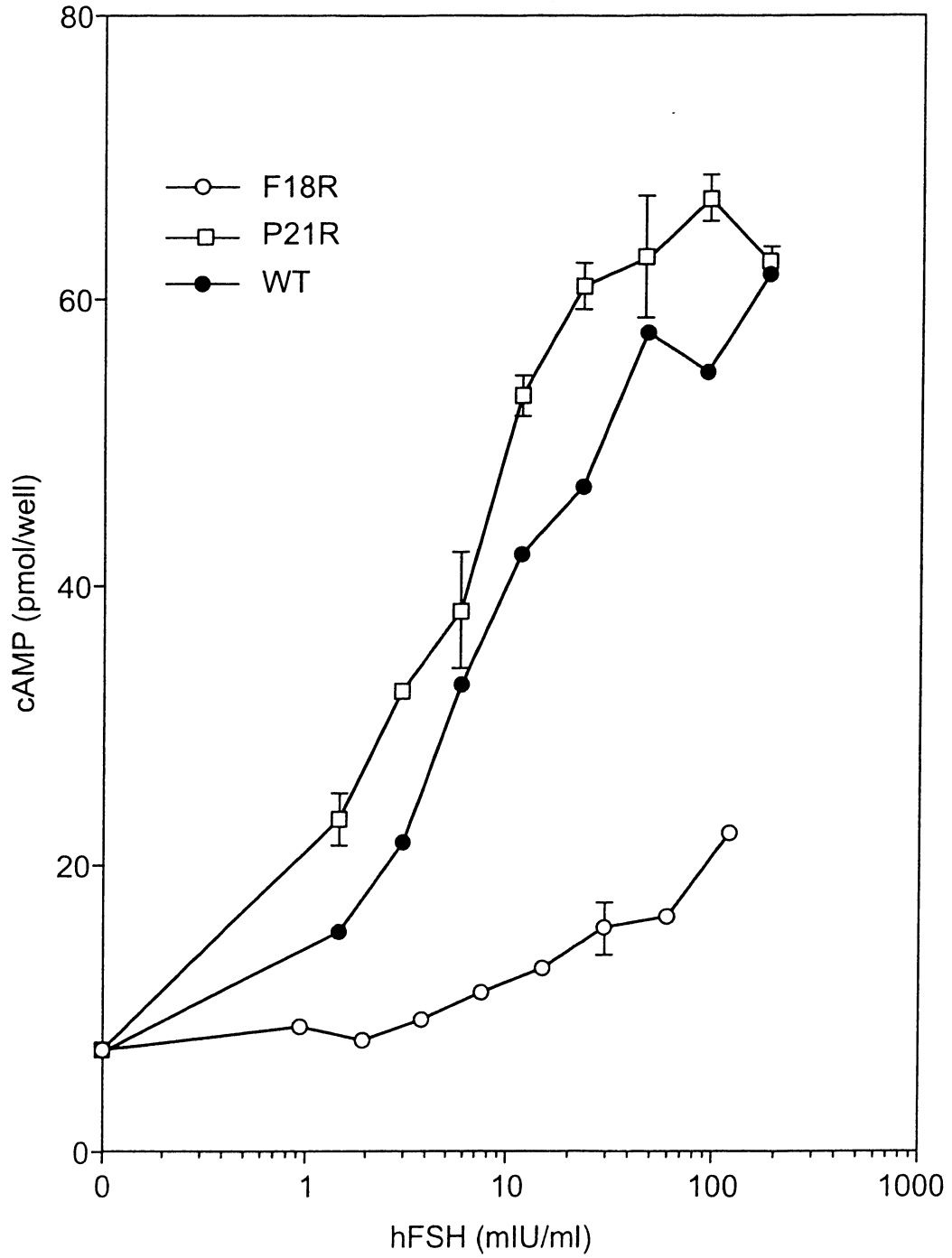
第1A圖



第1B圖

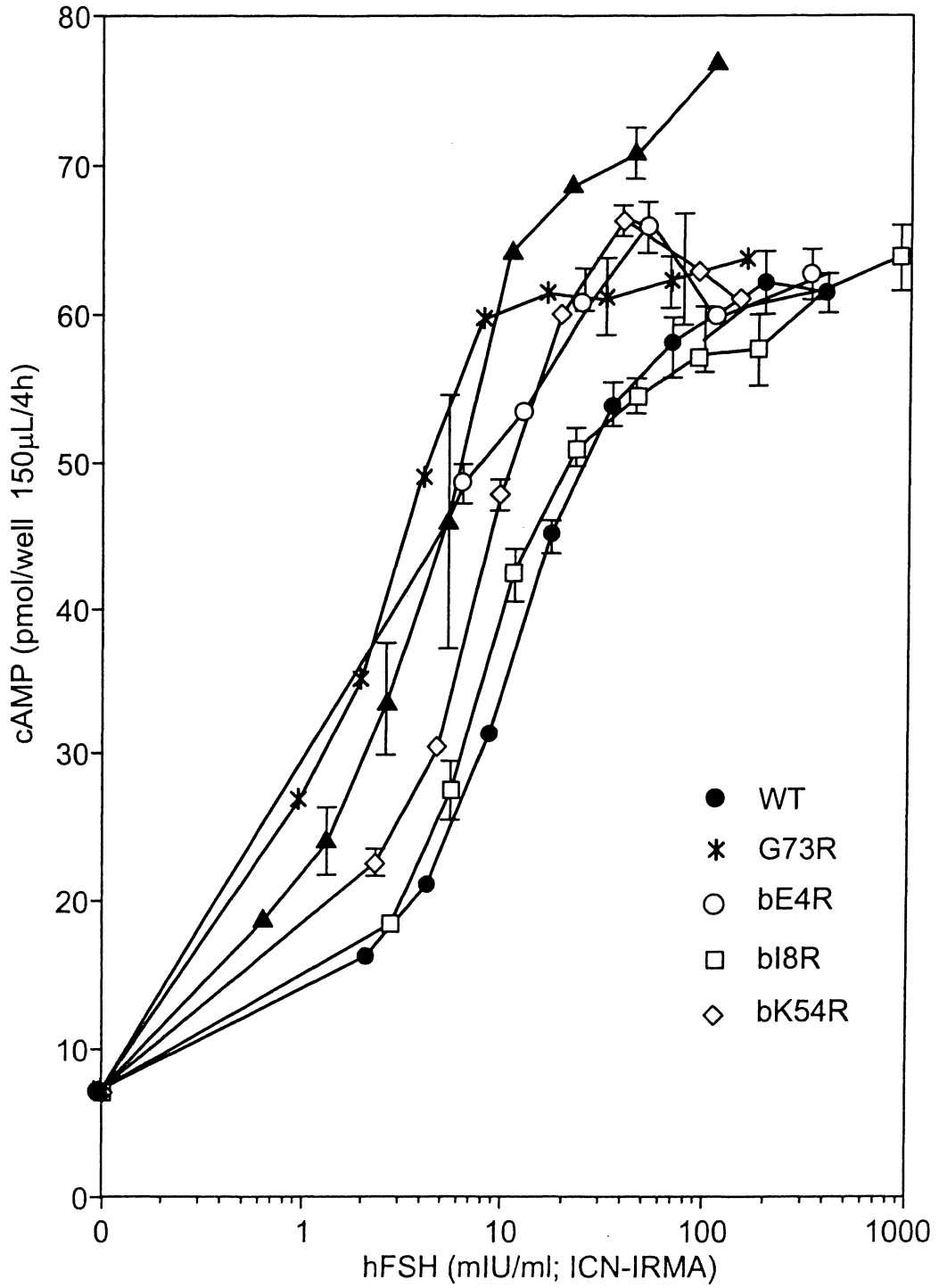


第1C圖



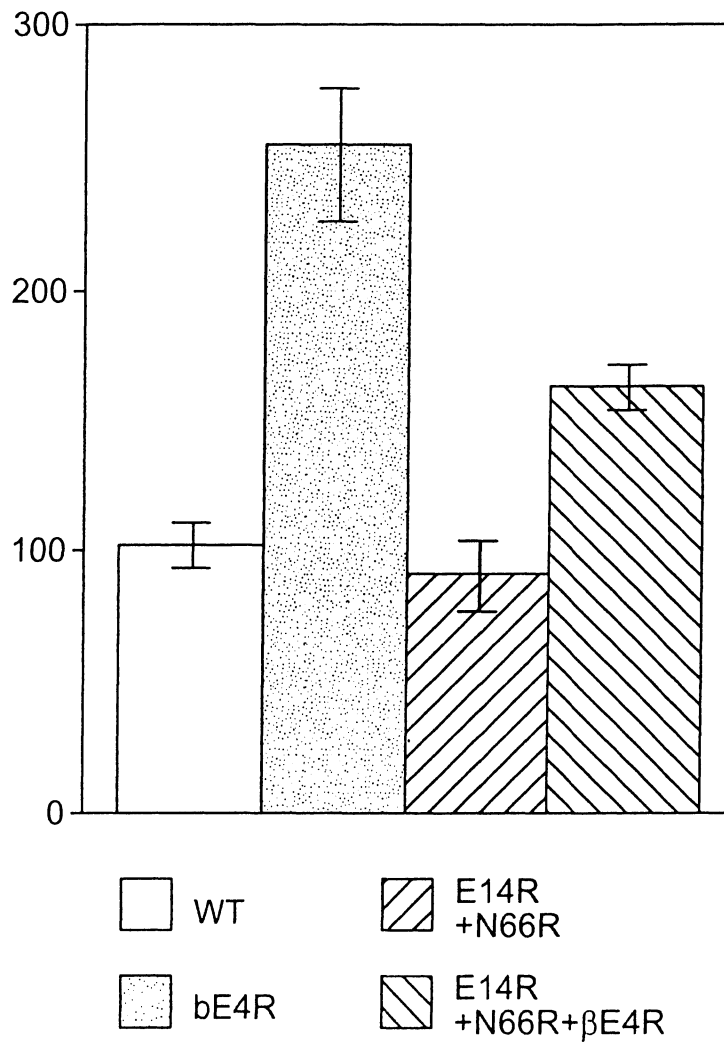
第1D圖

5/37

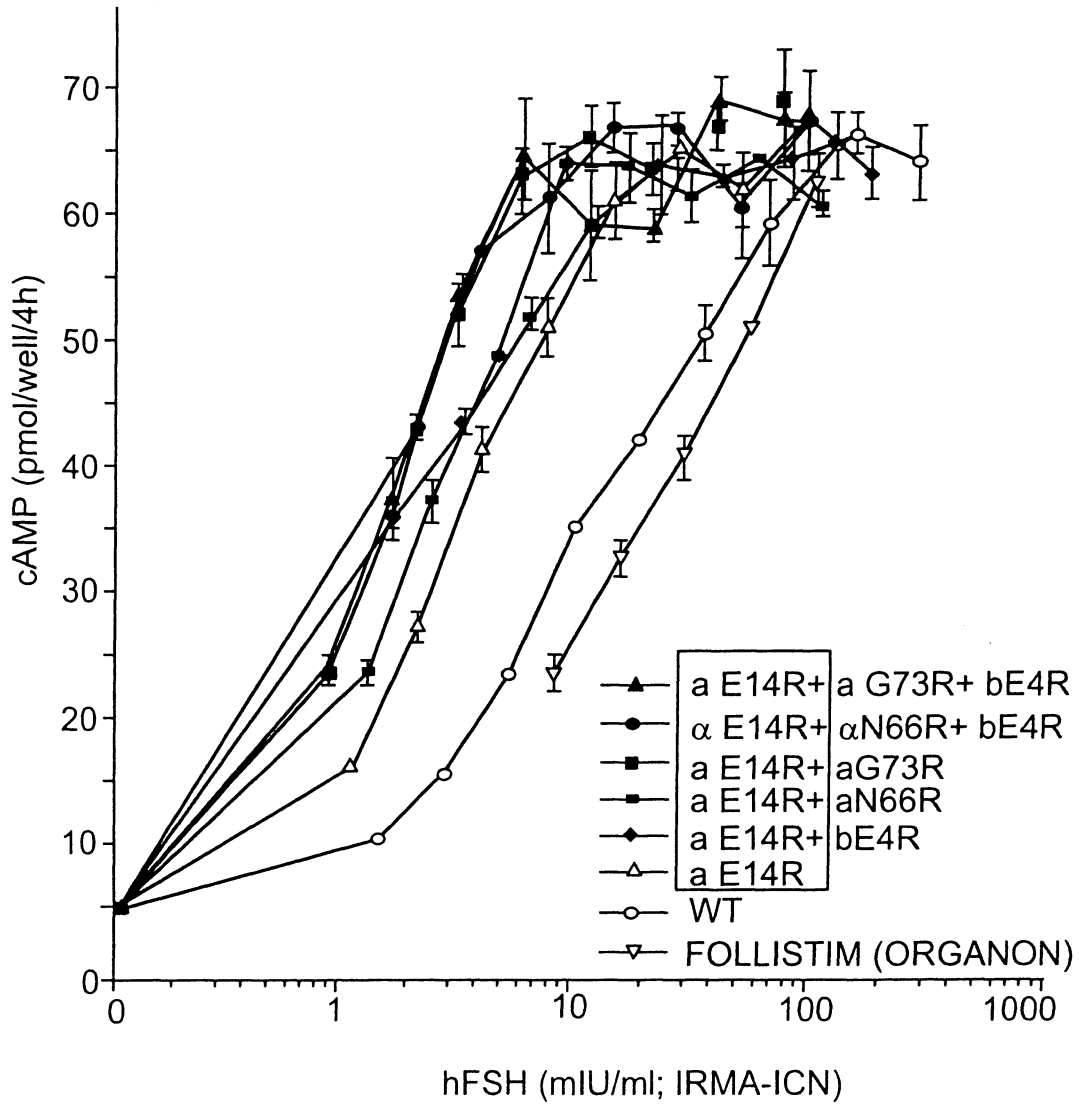


第1E圖

重量百分比  
(無突變 FSH 之  
產生率=100%)

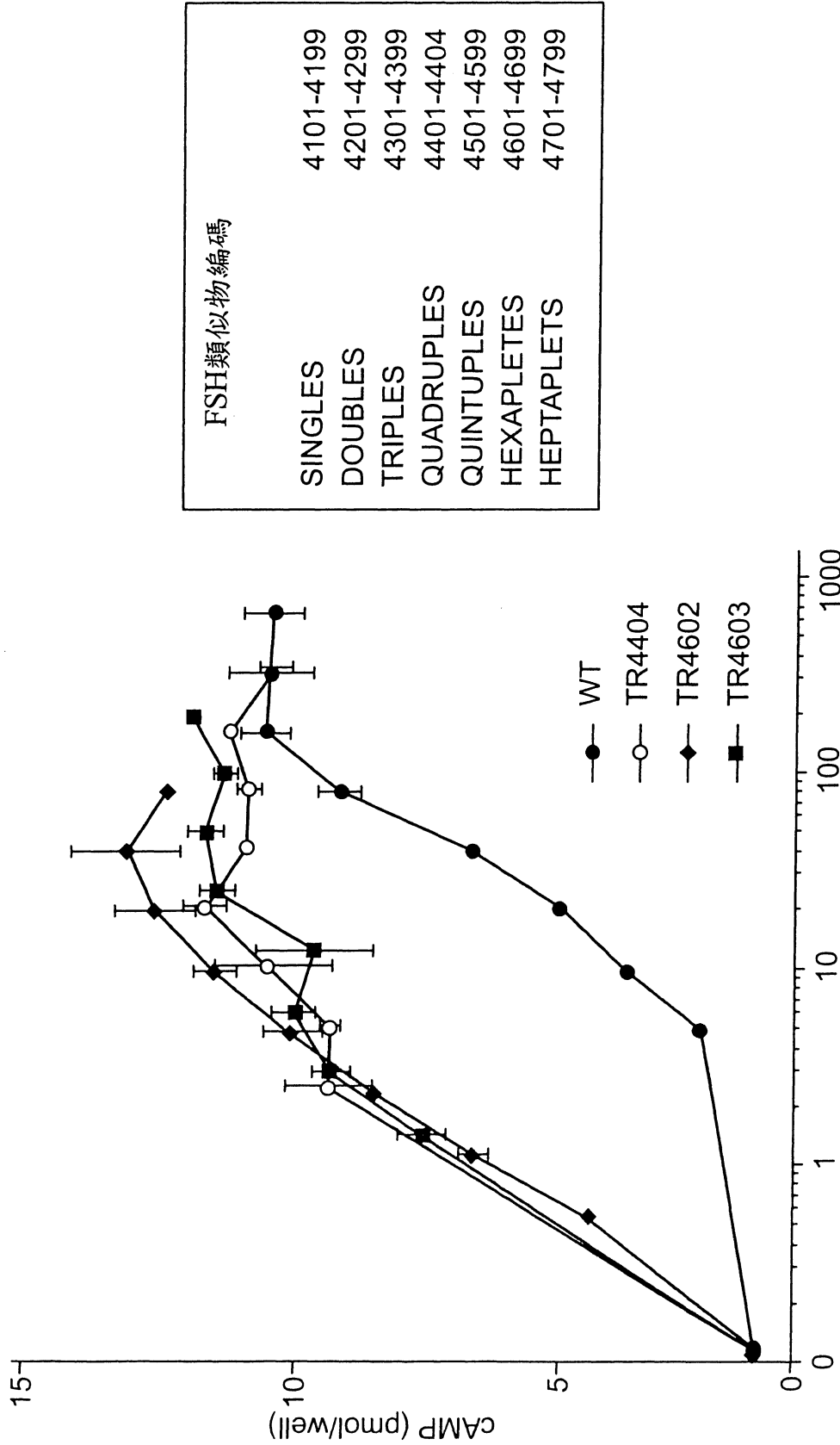


第 2 圖



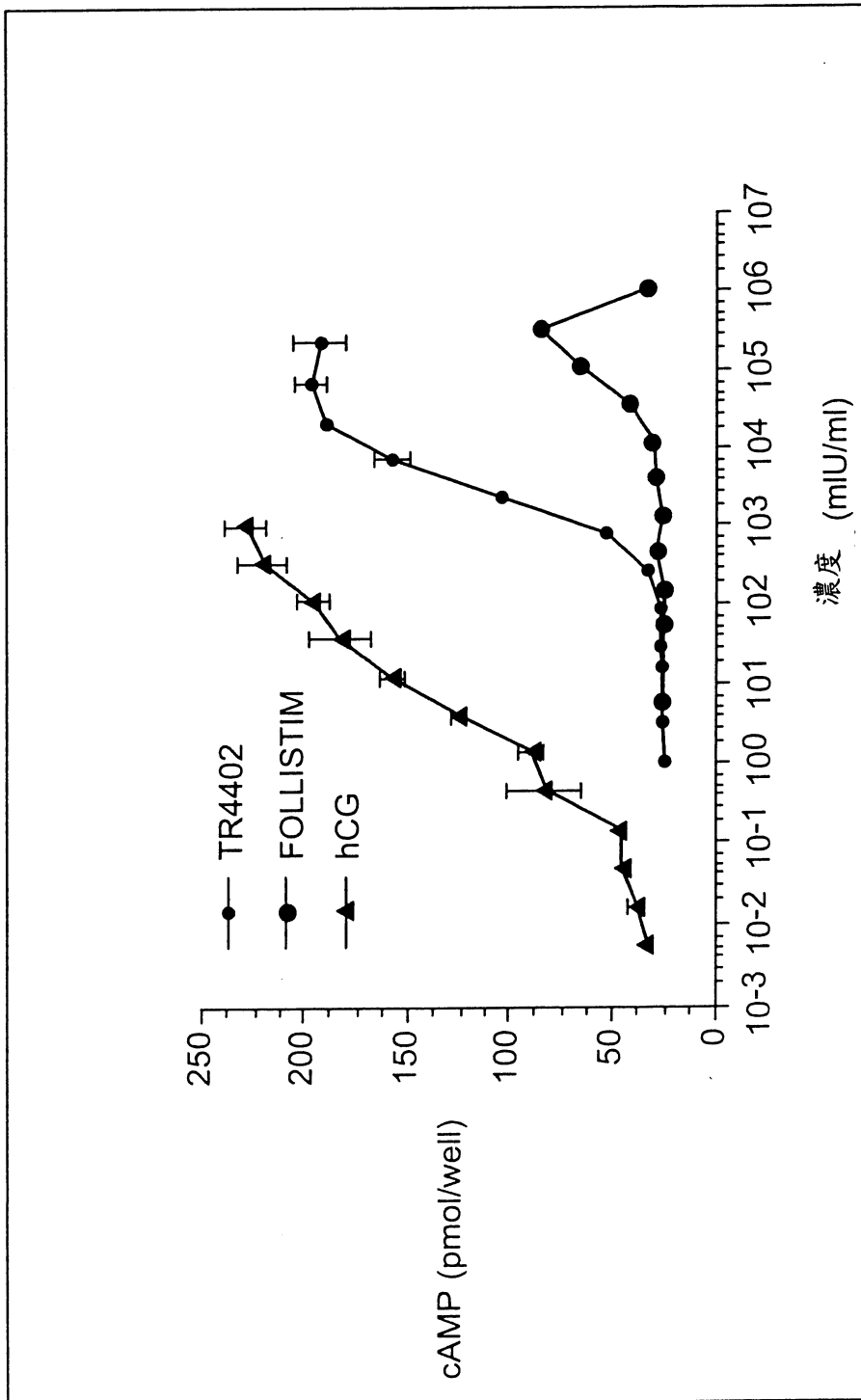
第3A圖

8/37



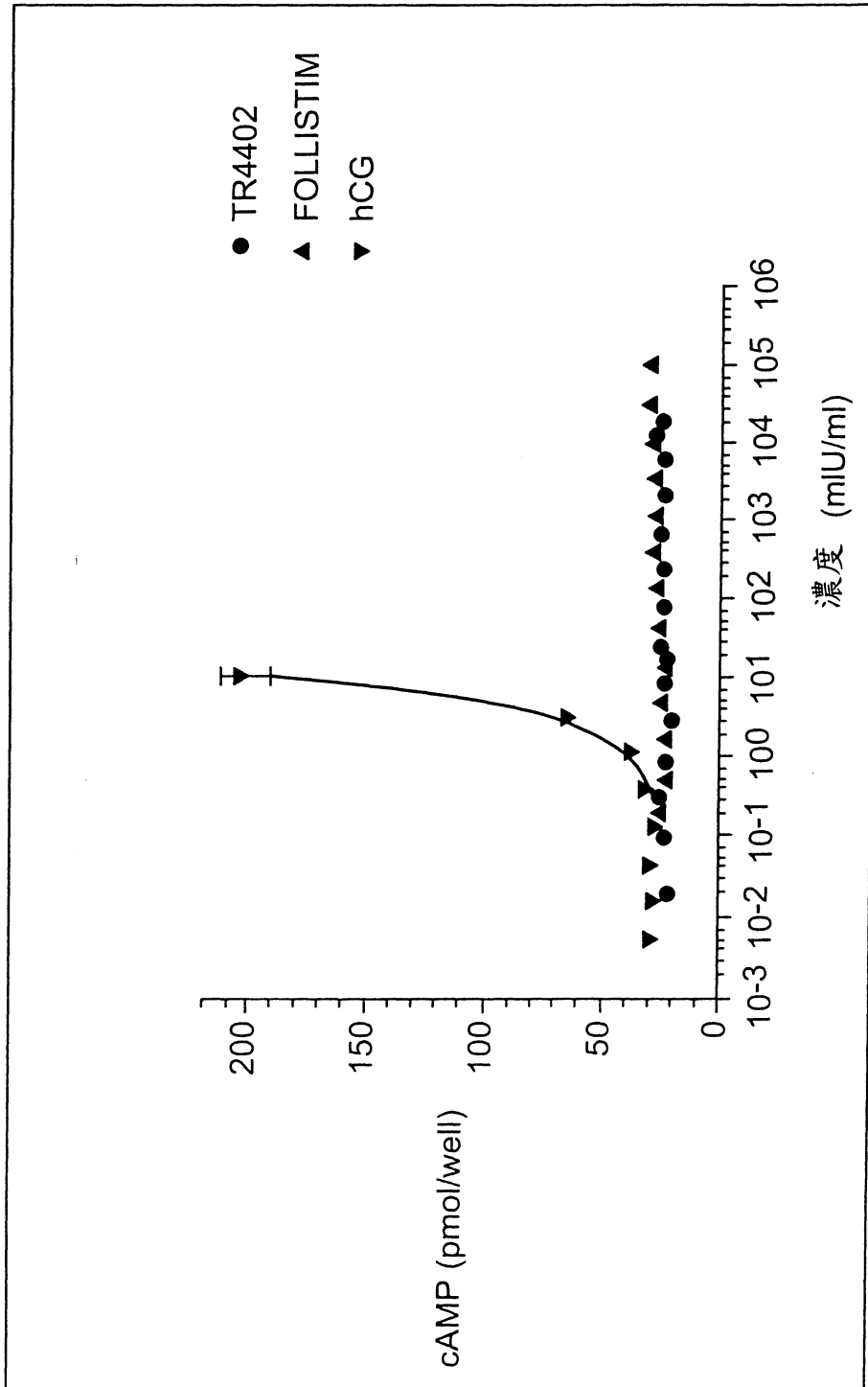
第3B圖

9/37

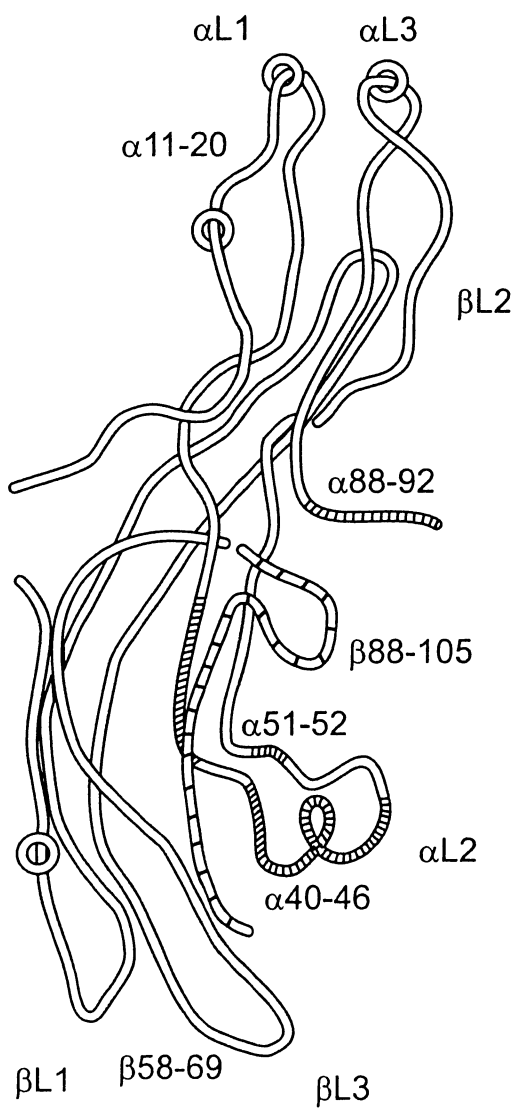


第 4A圖

10/37

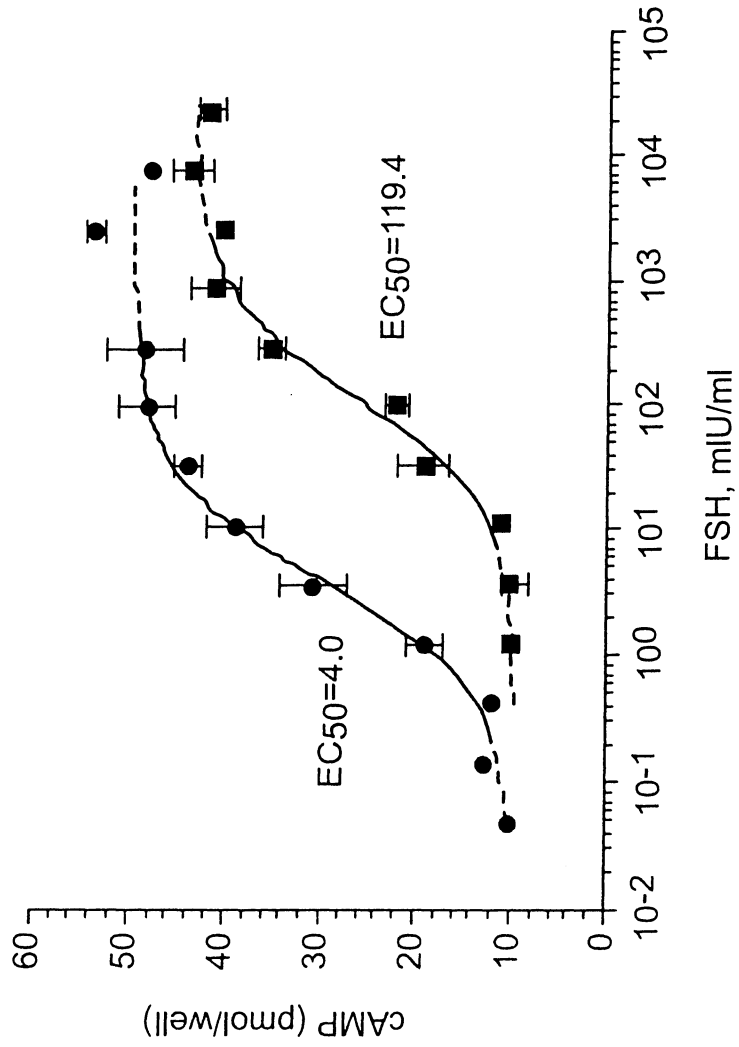


第4B圖



第 5 圖

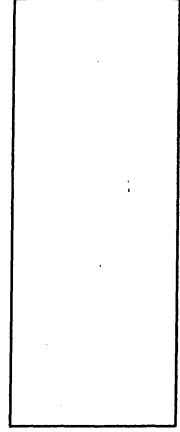
12/37



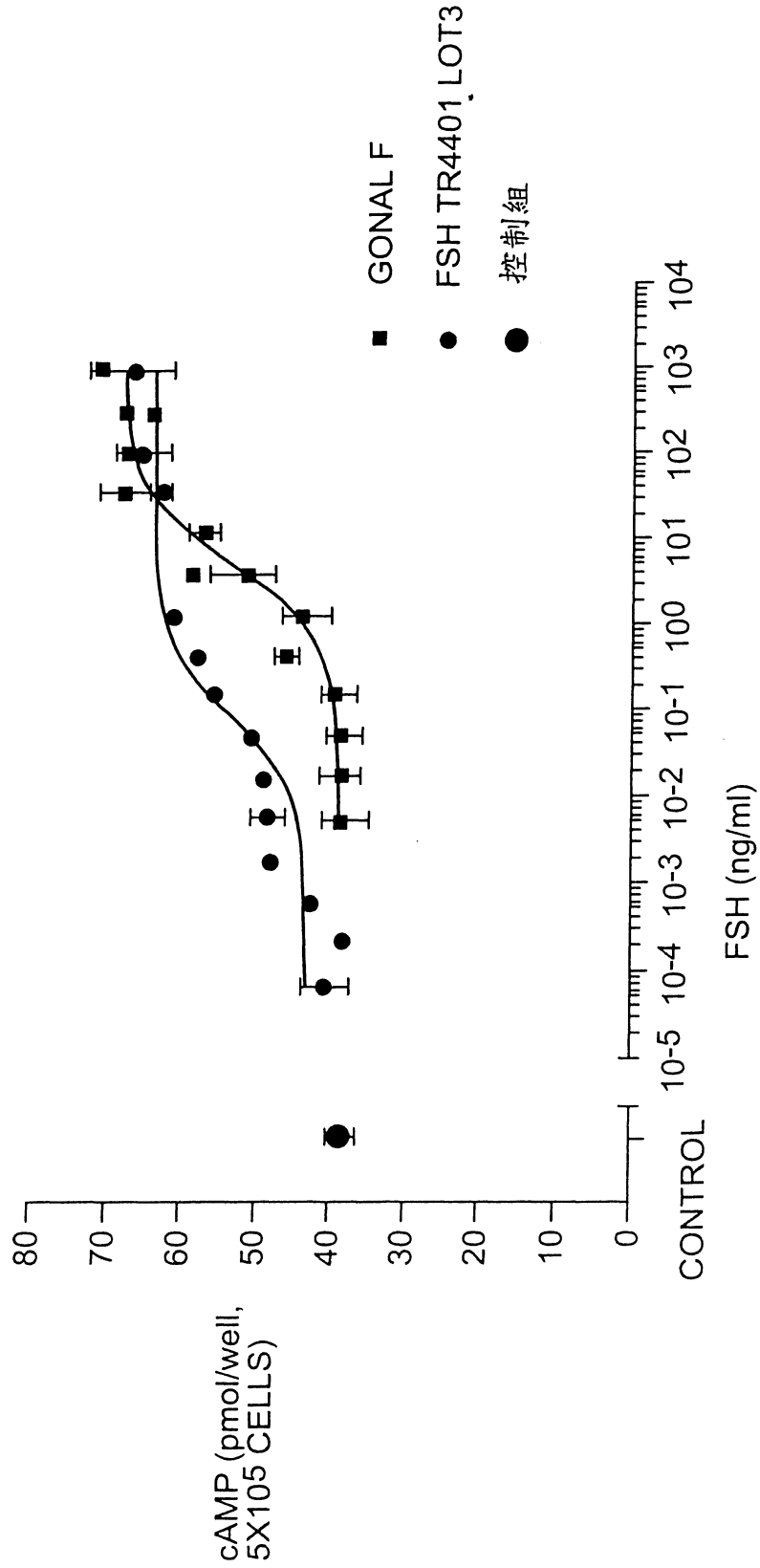
● TR4402 LOT2

■ 經透析Follistim

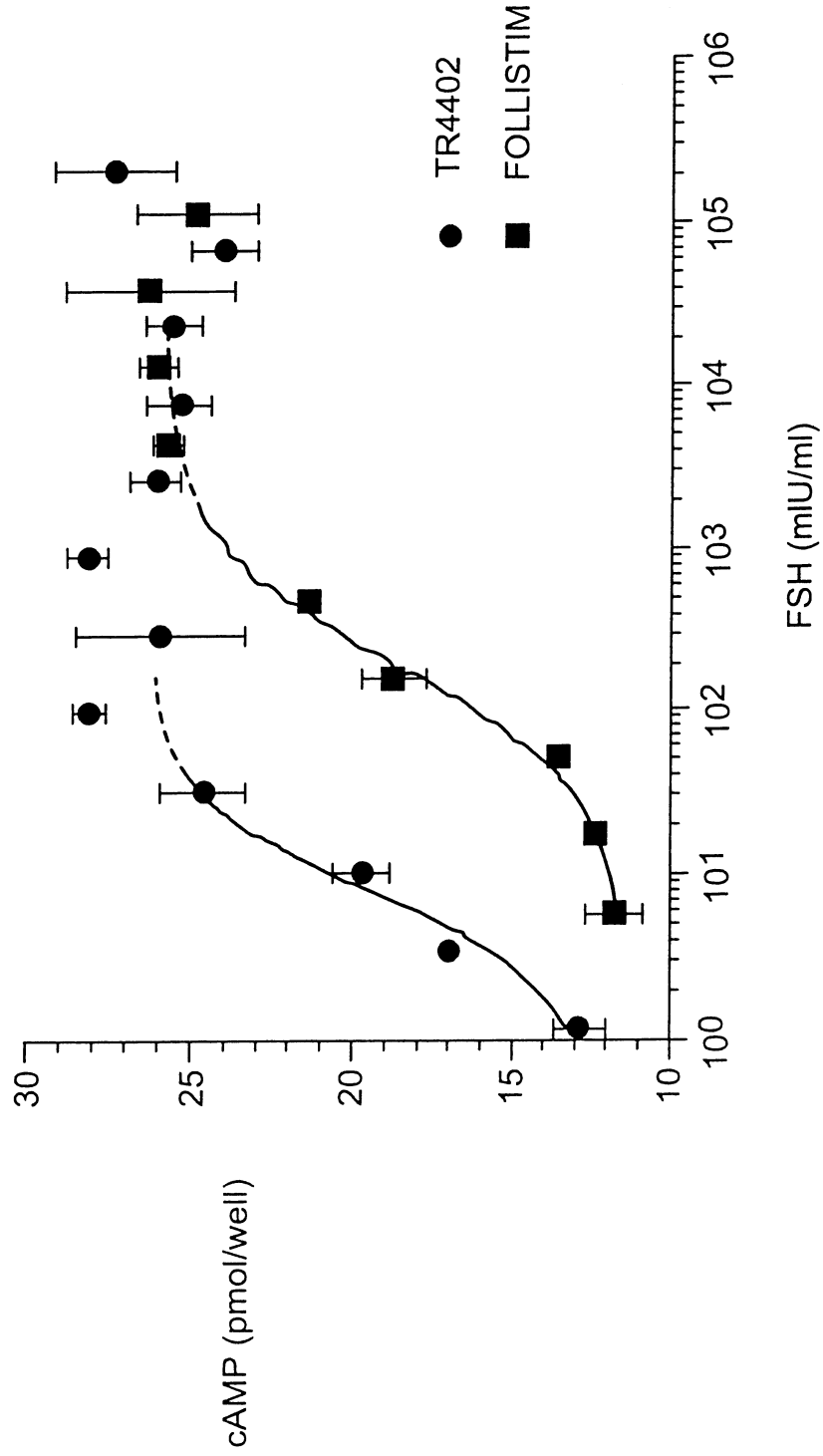
第6A圖



13/37

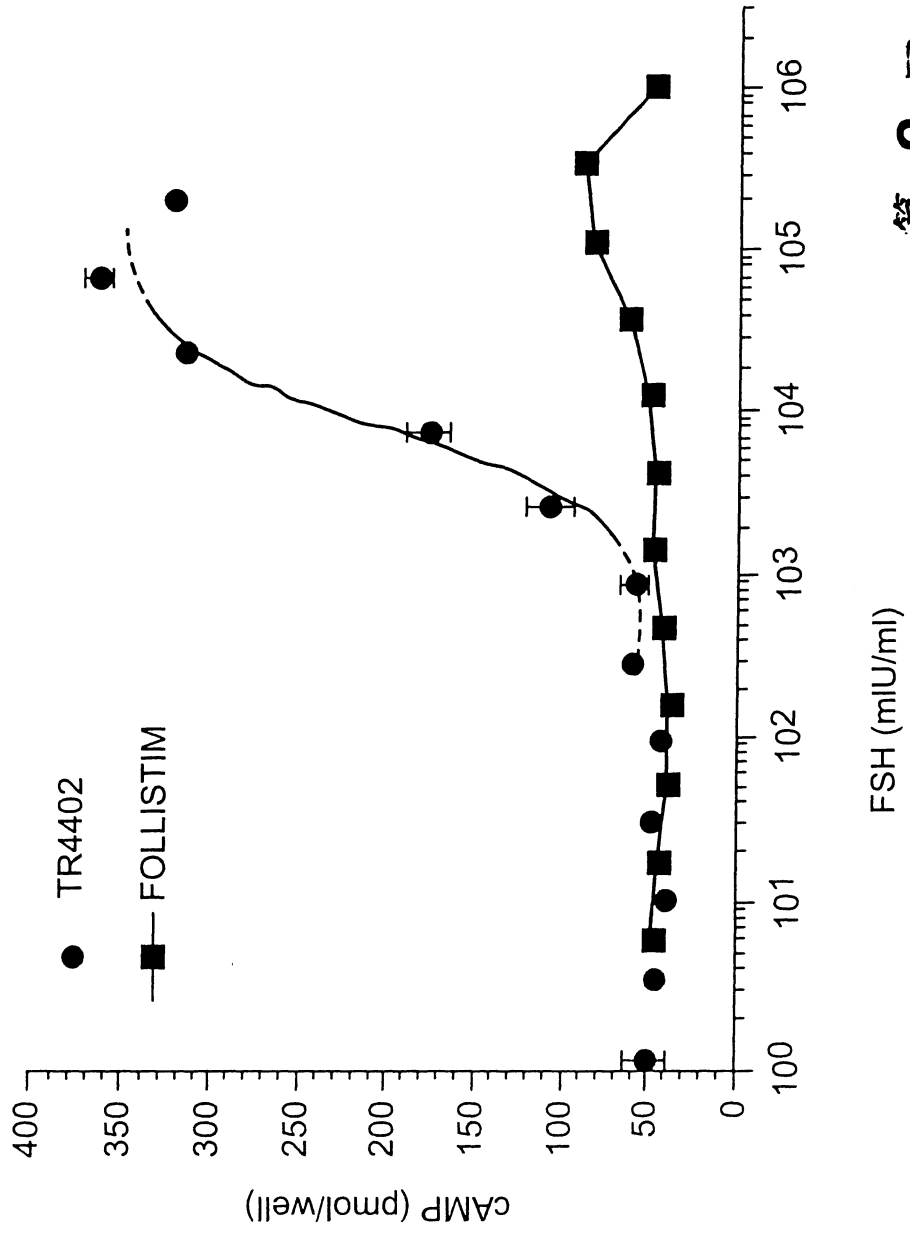


第6B圖

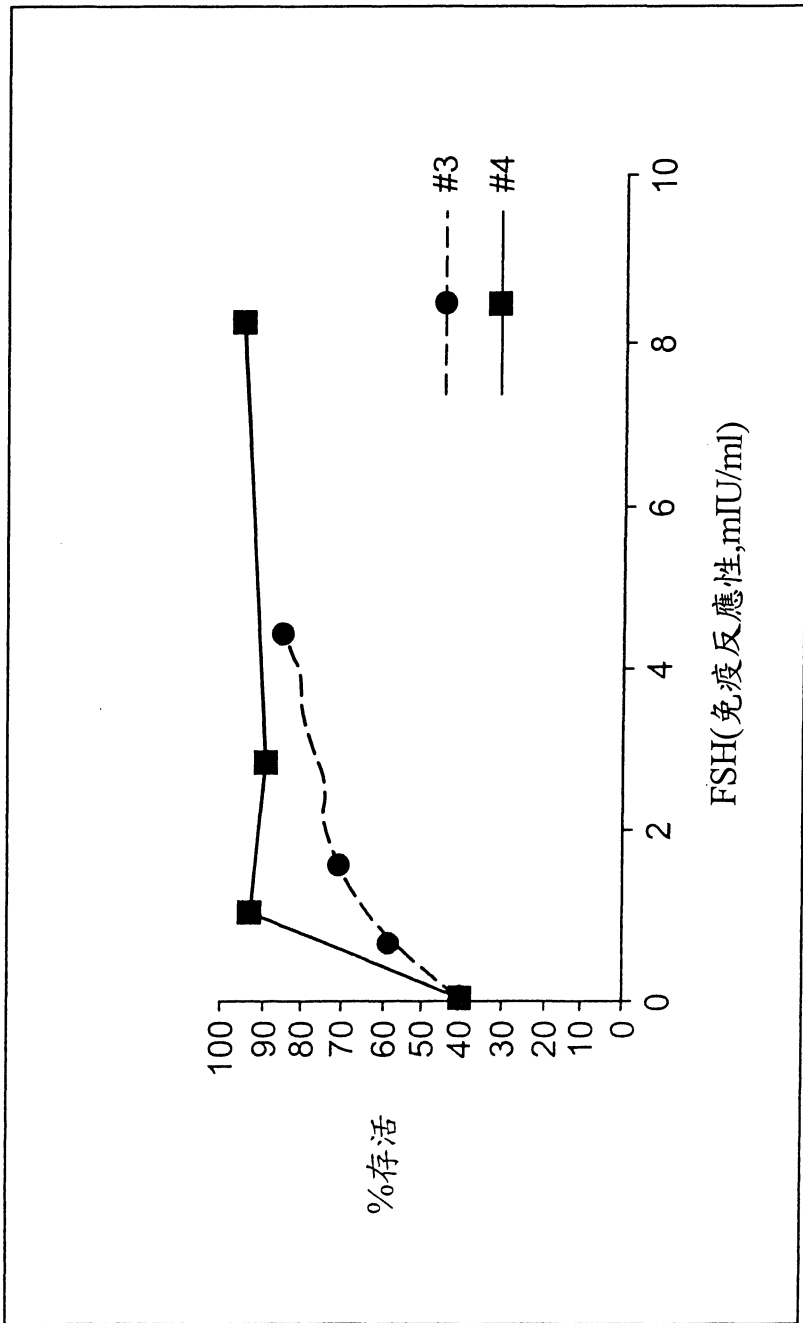


第 7 圖

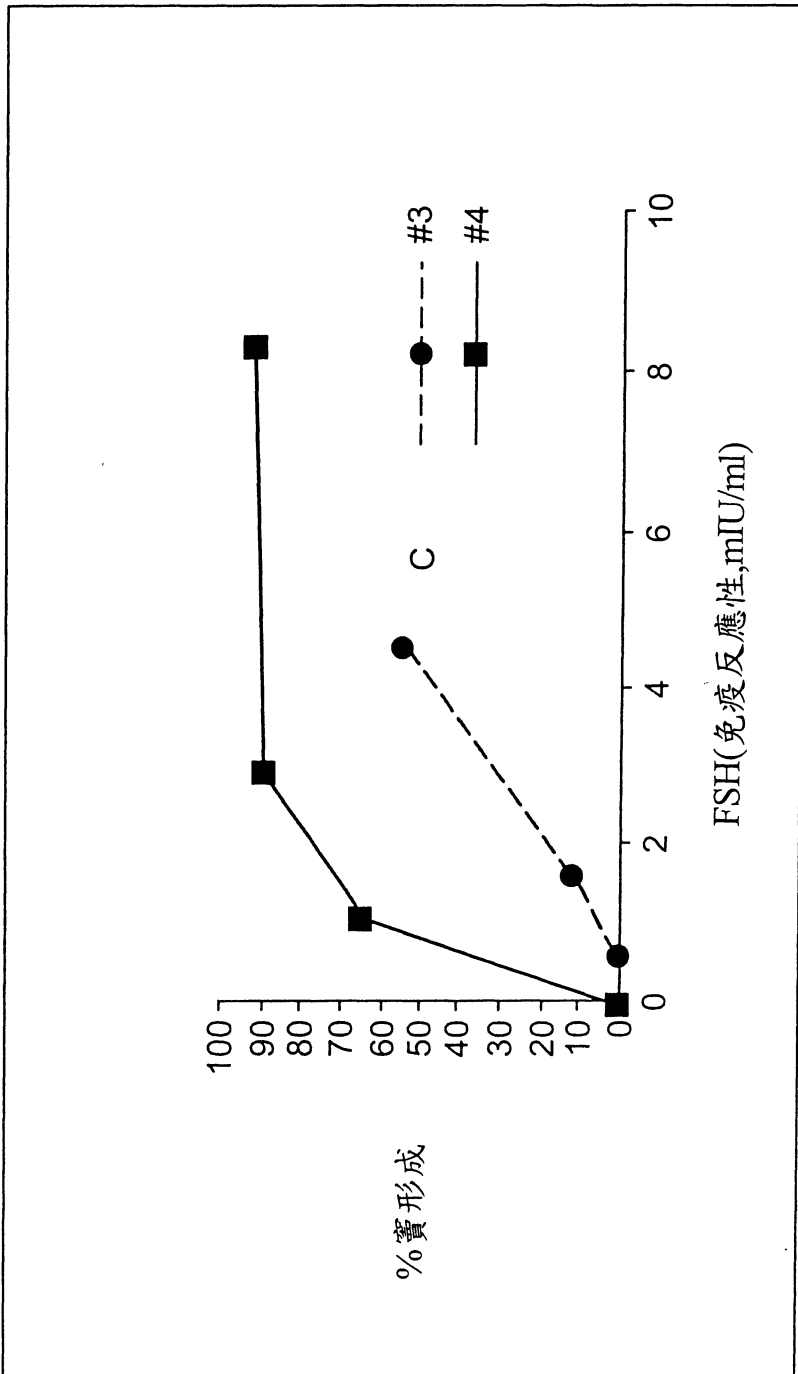
15/37



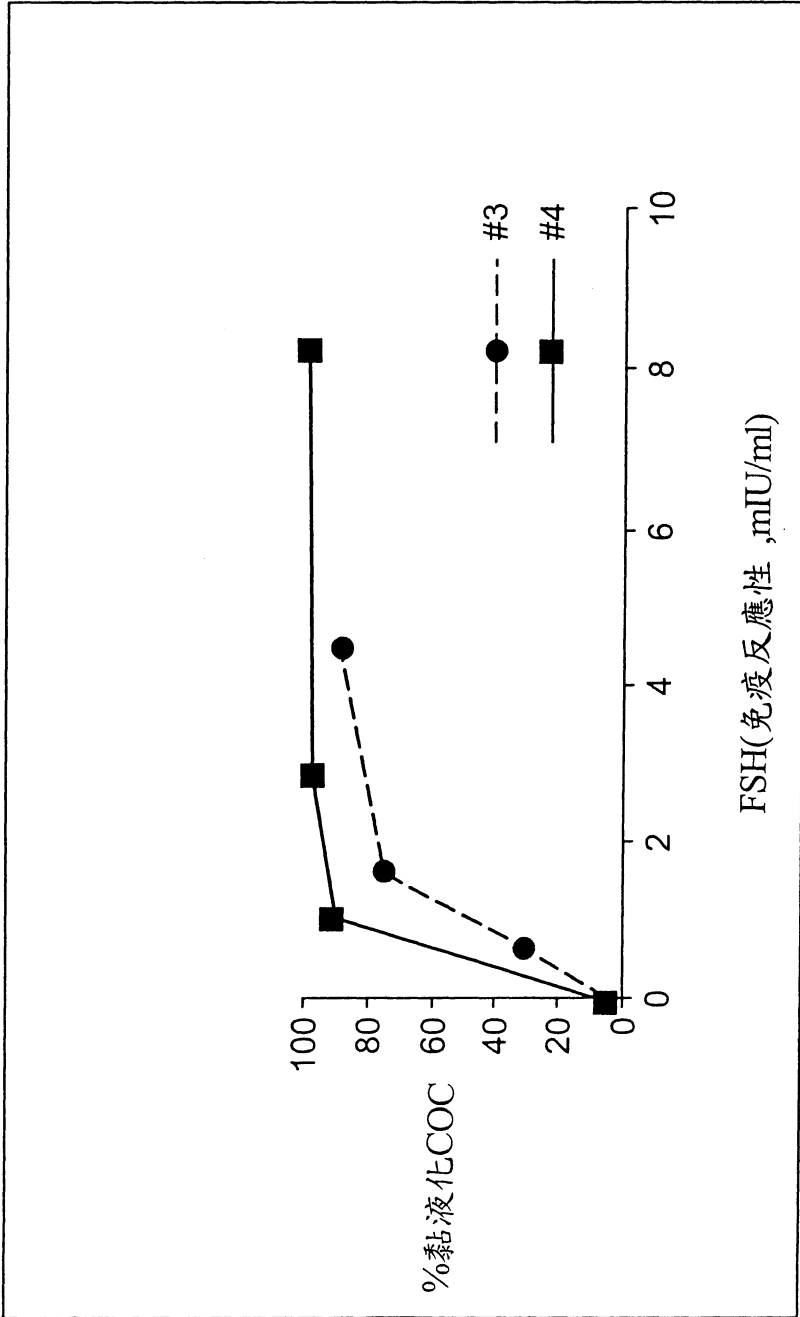
第 8 圖



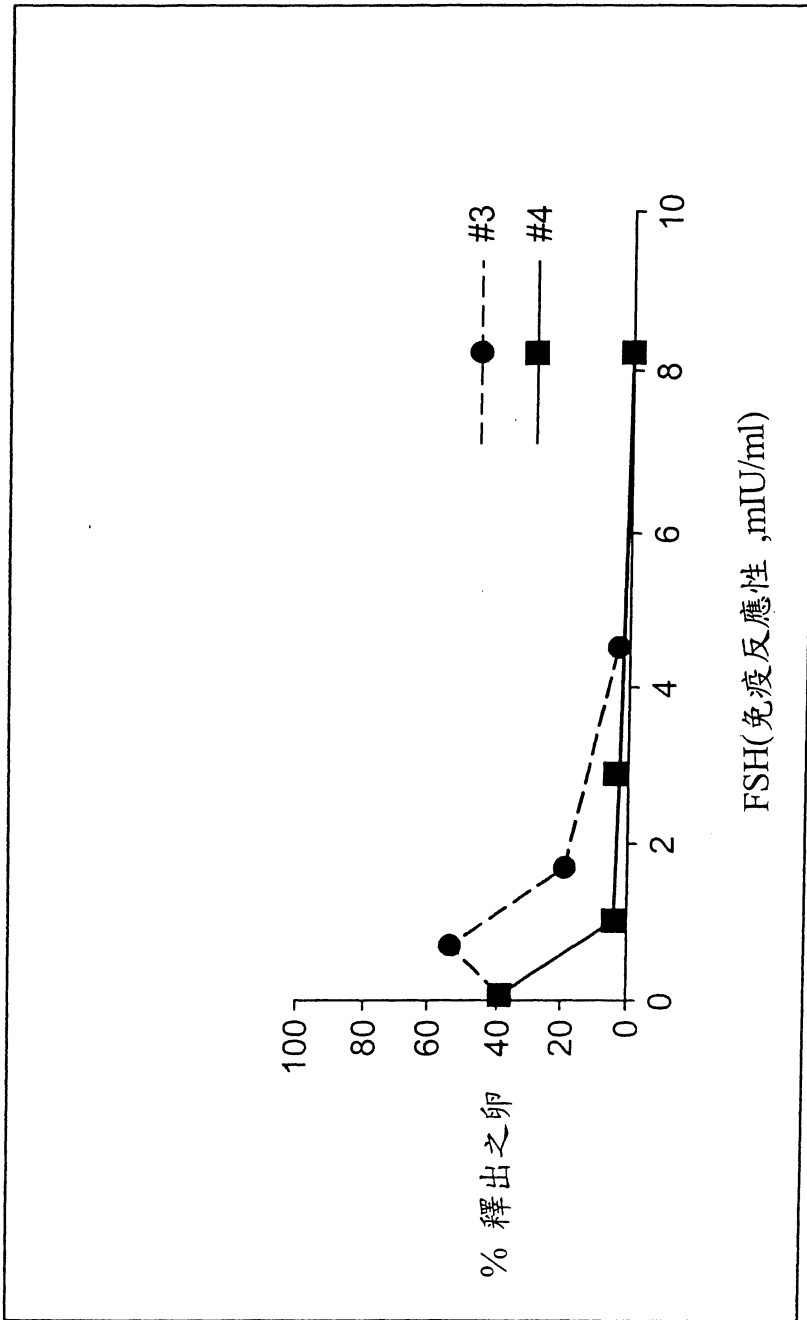
第 9 圖



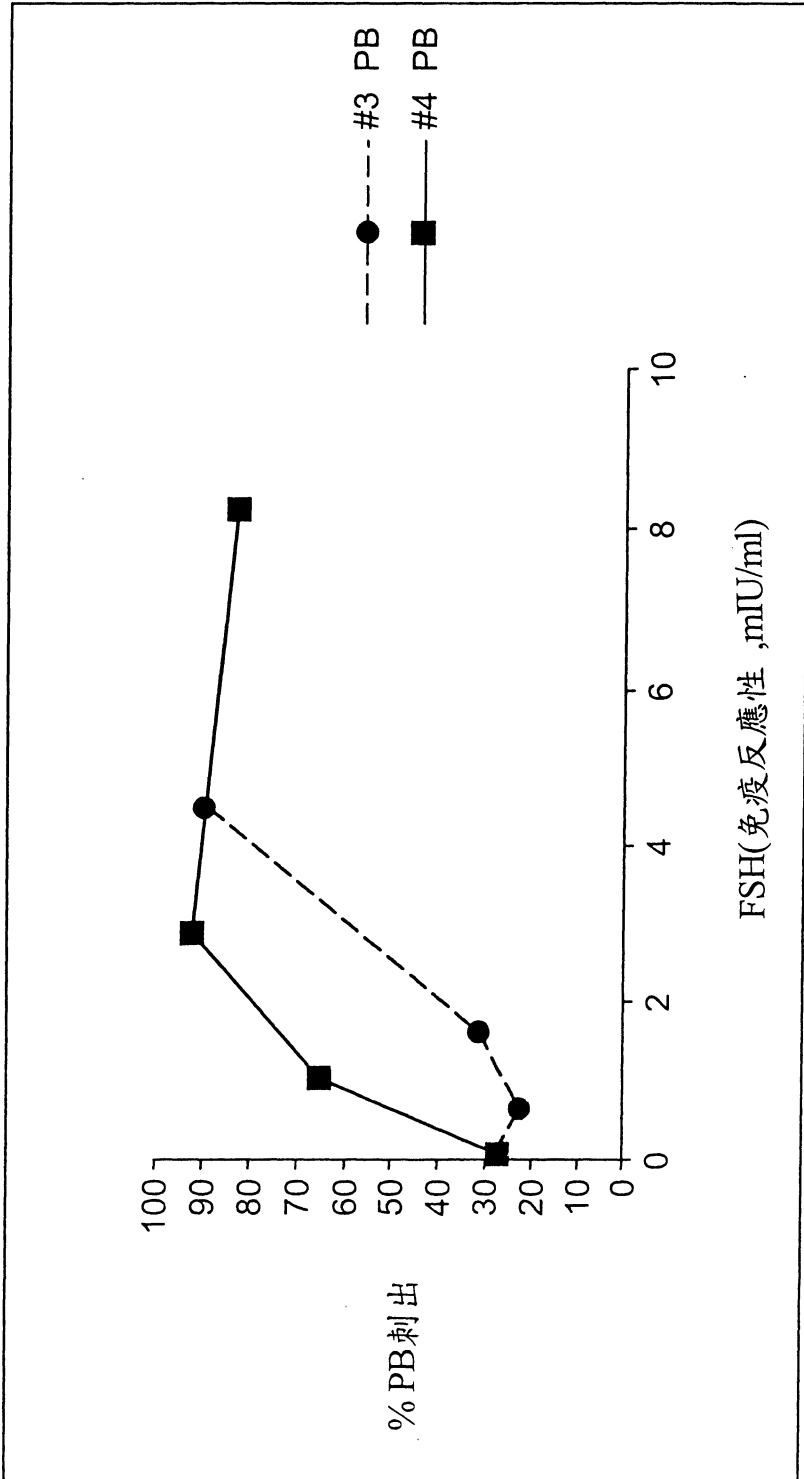
第10圖



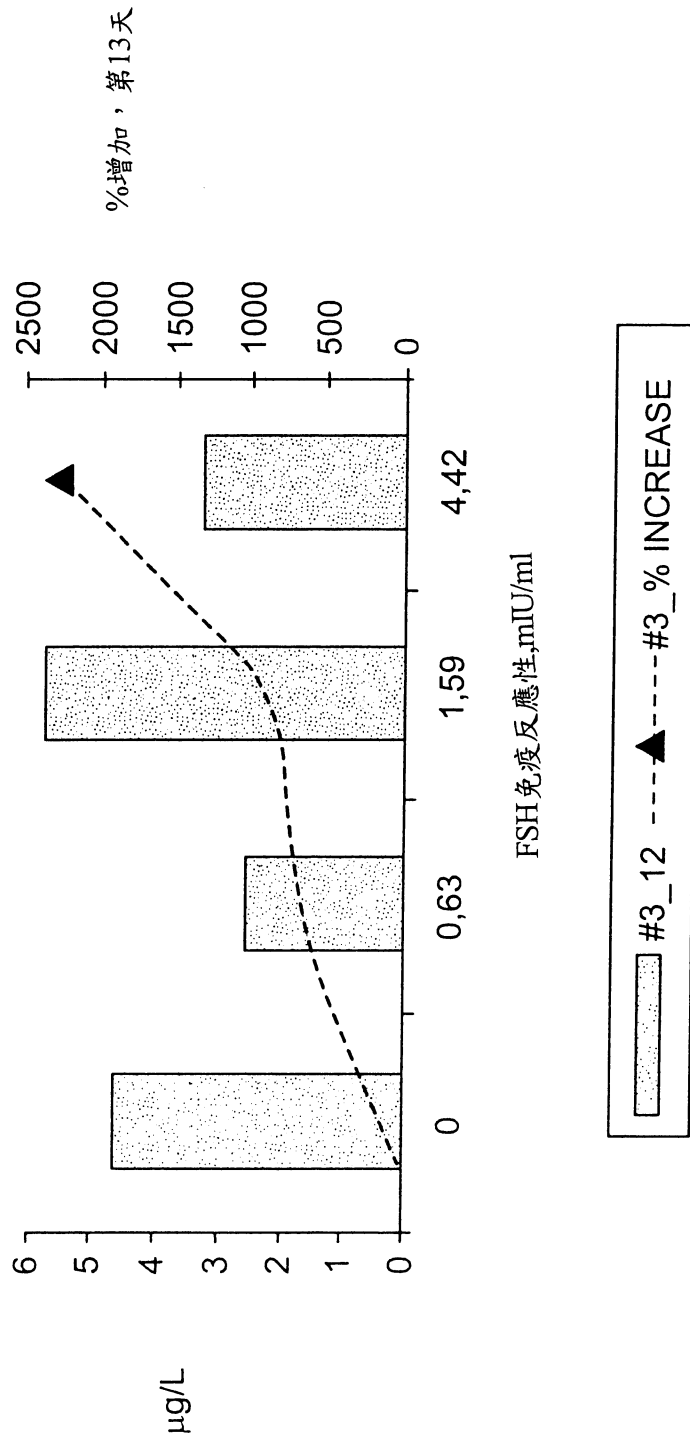
第 11A 圖



第 11B 圖

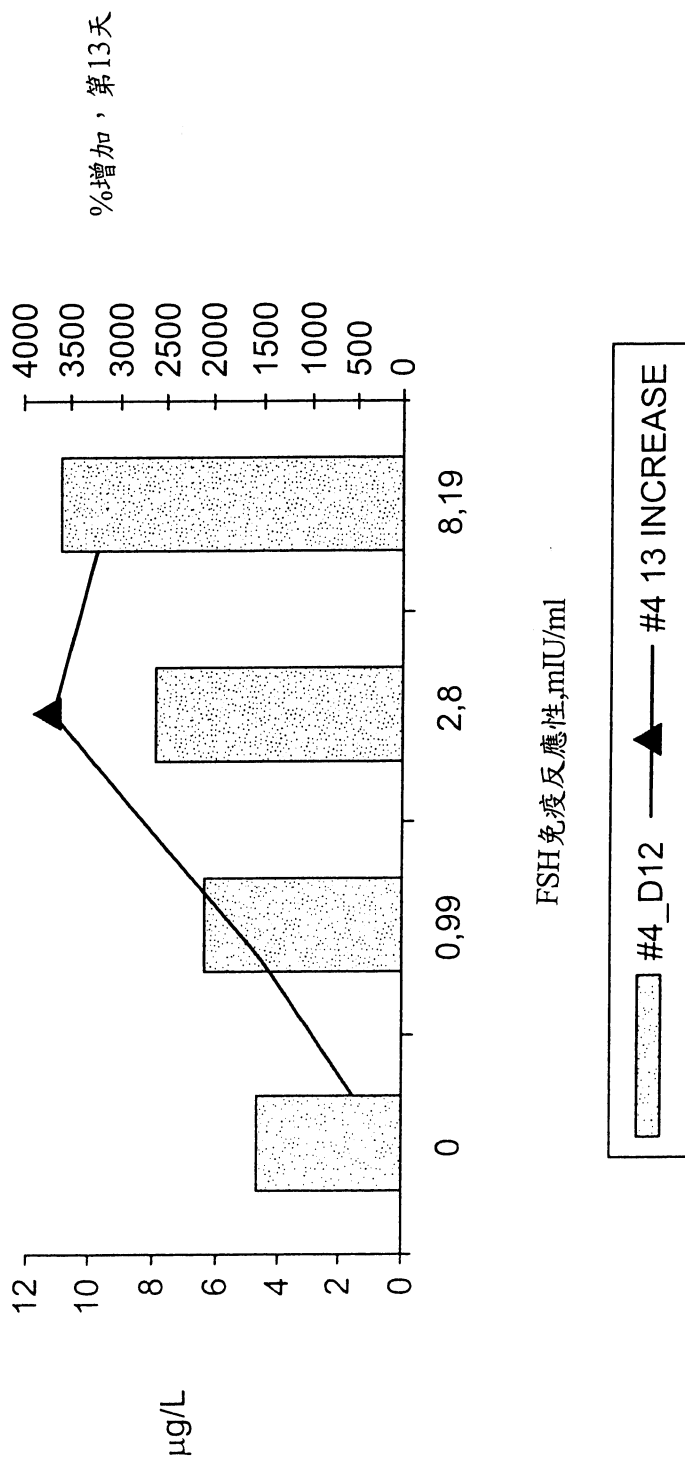


第12圖

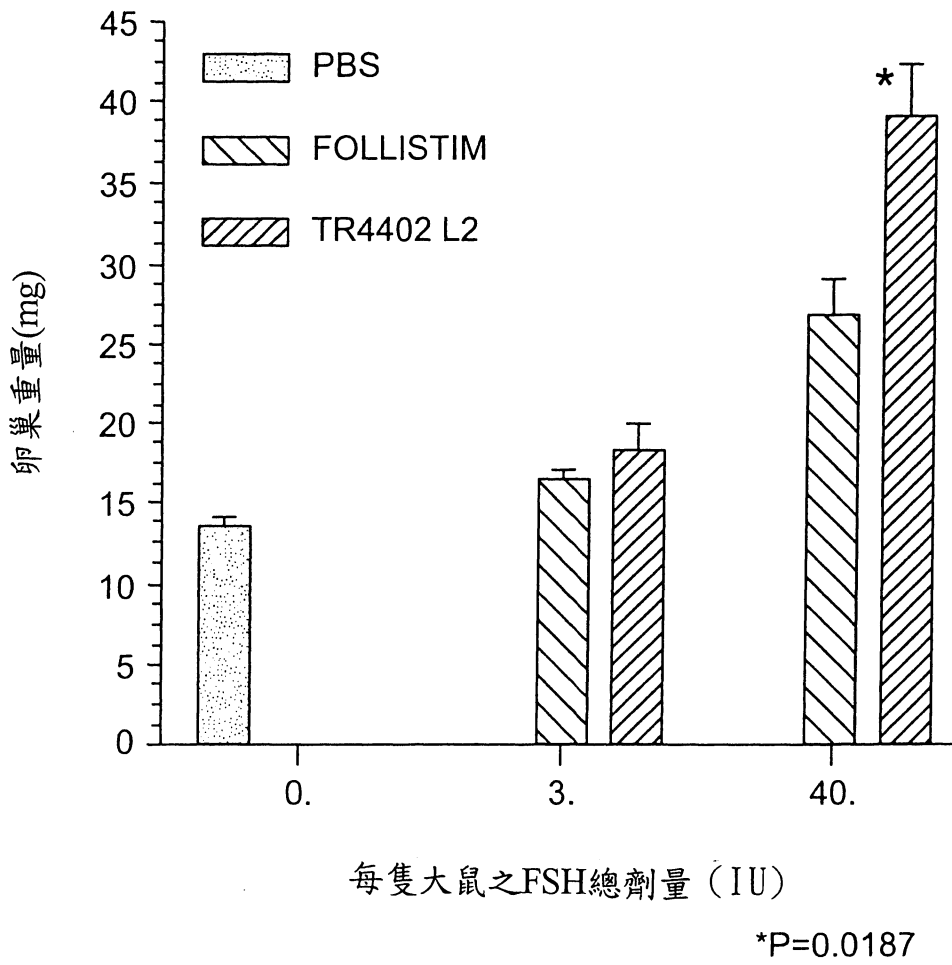


第 13A 圖

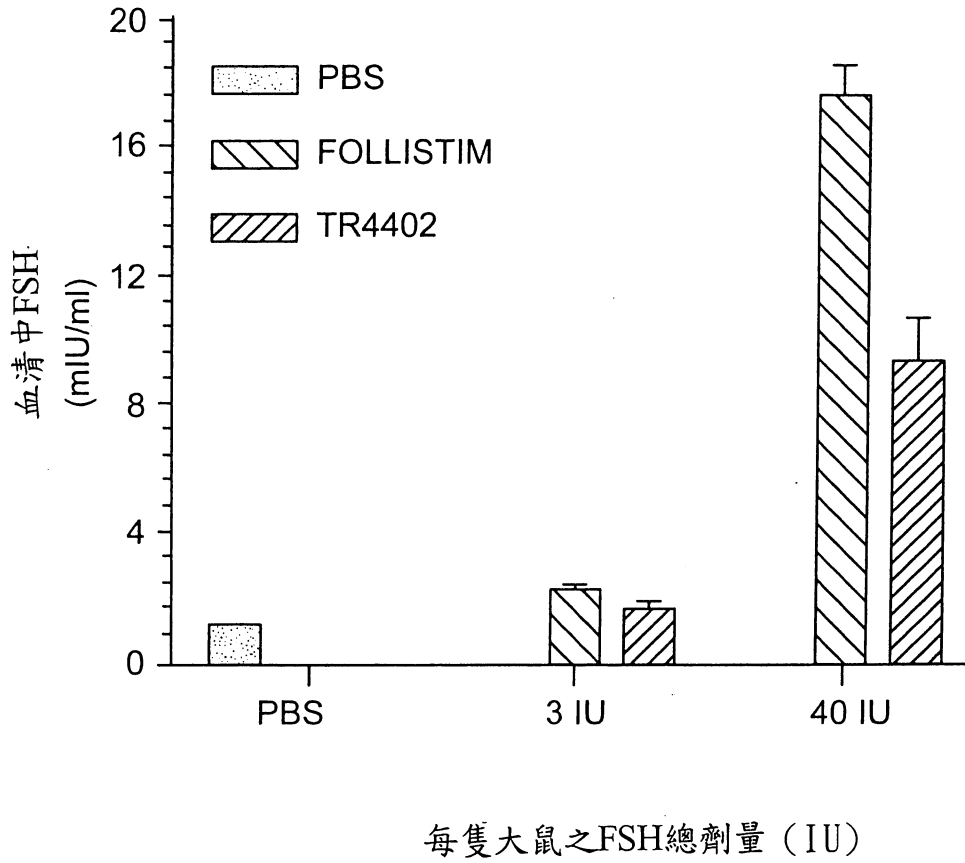
22/37



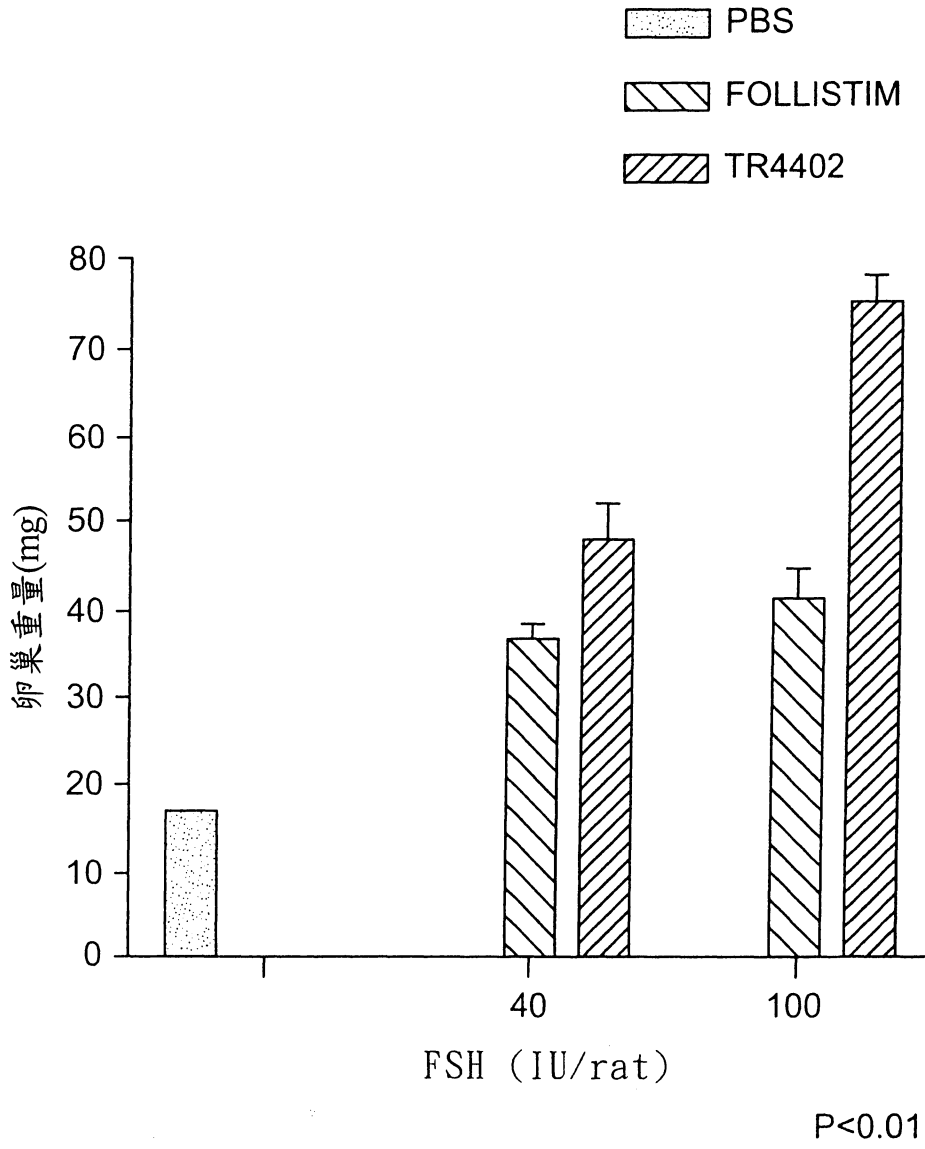
第 13B 圖



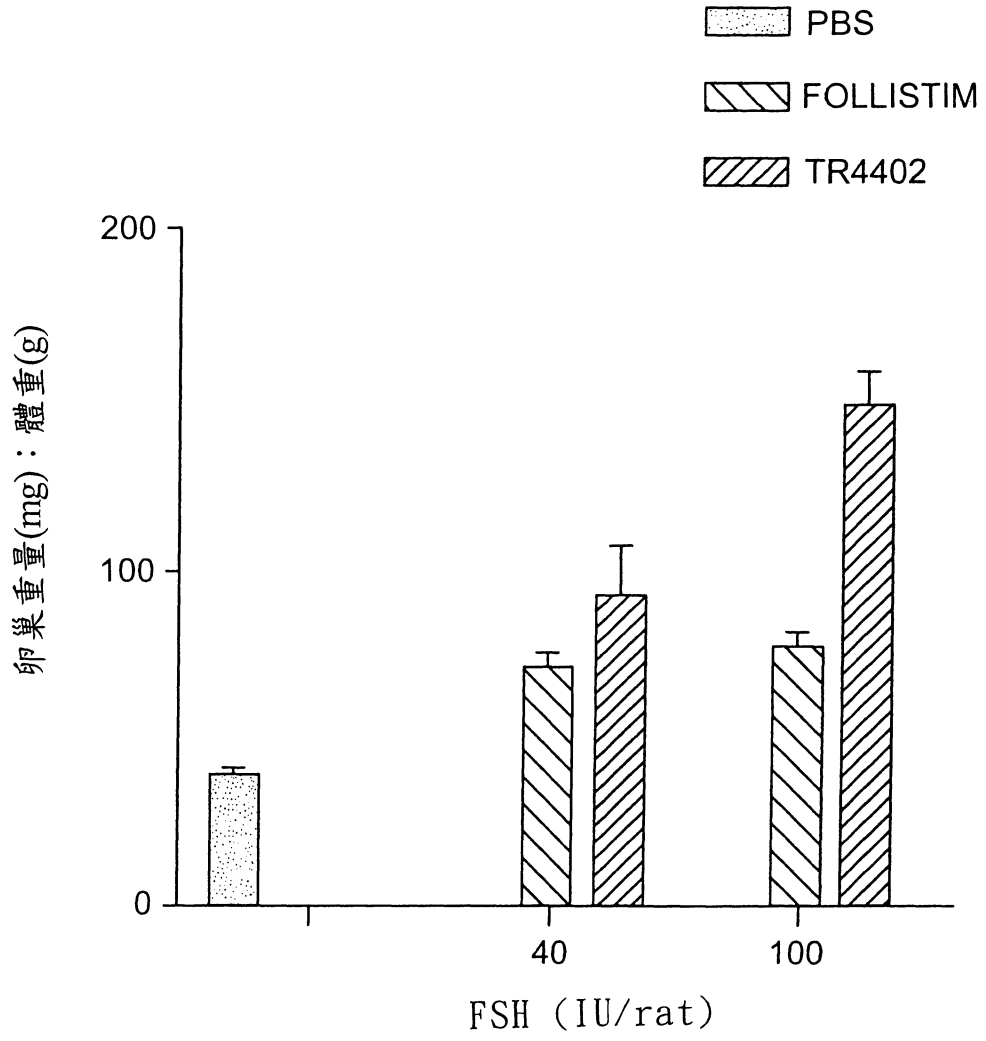
第 14A 圖



第 14B 圖

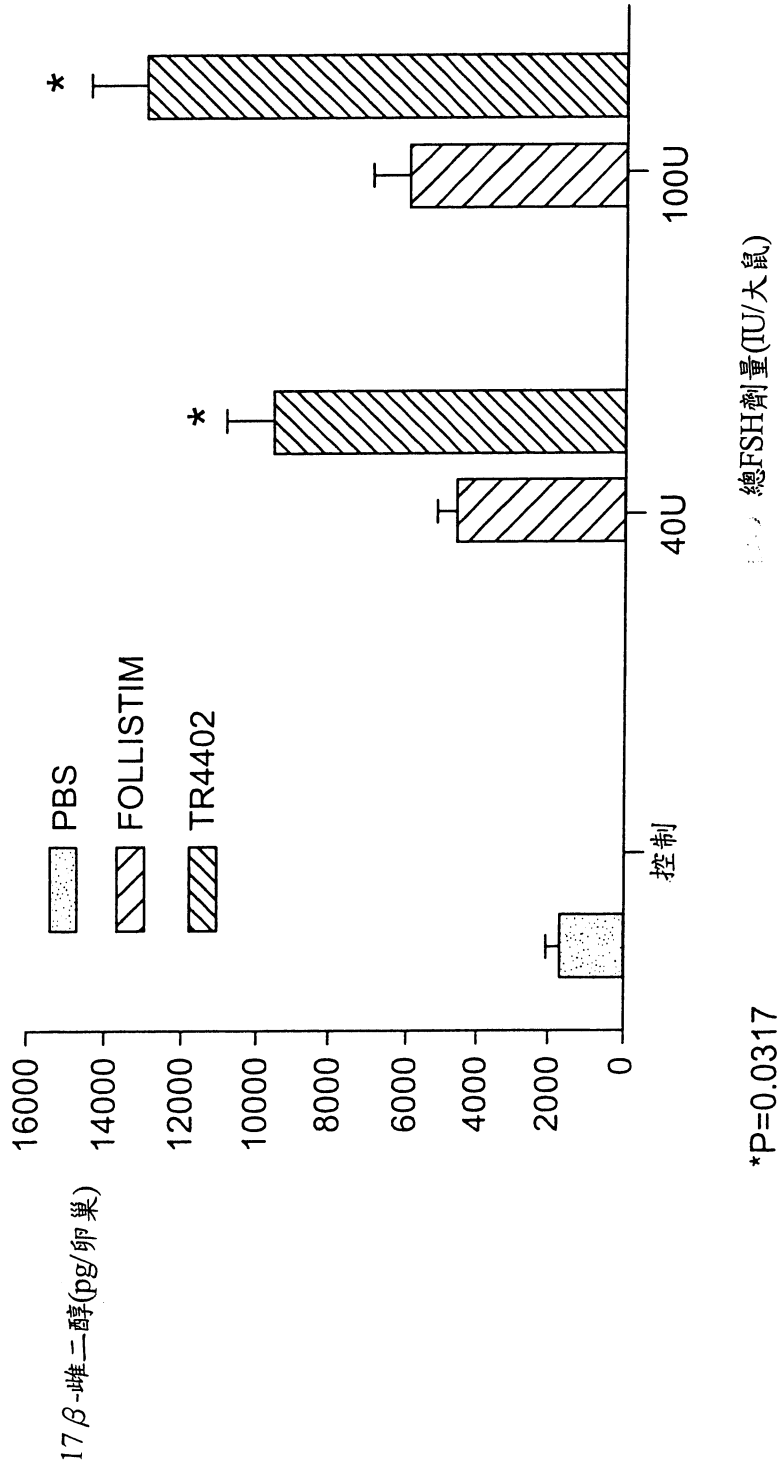


第 14C 圖



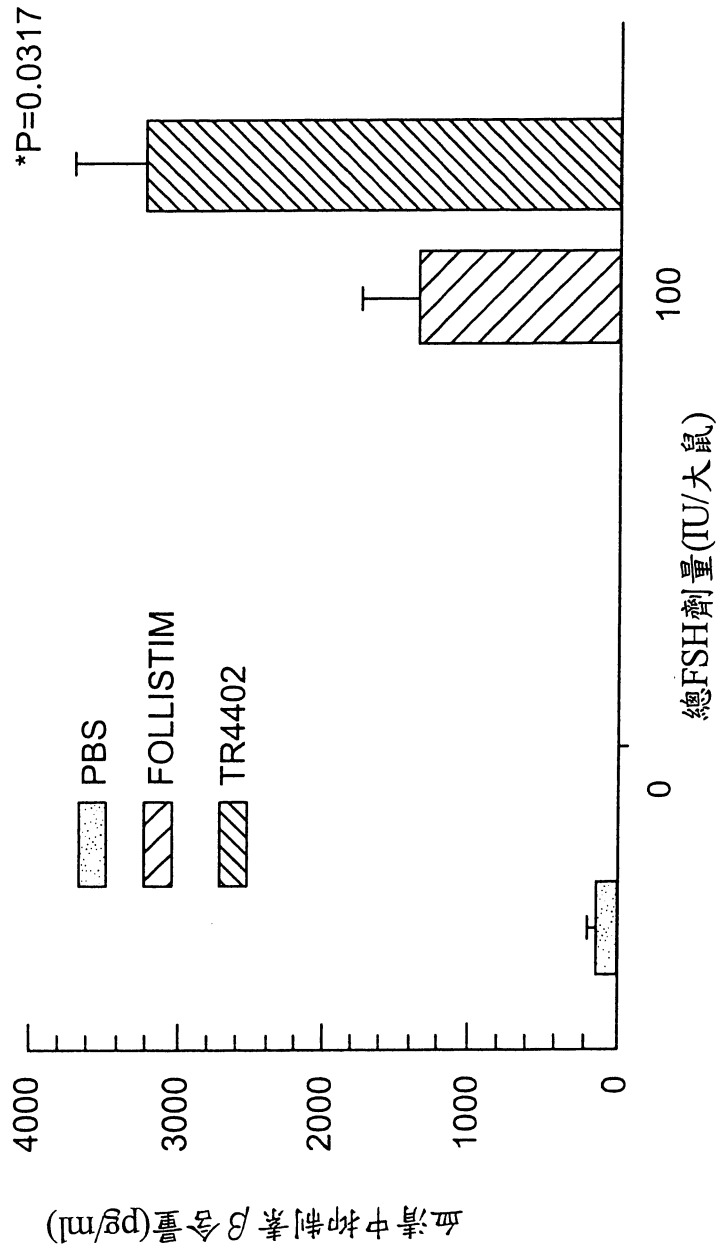
第 14D 圖

27/37



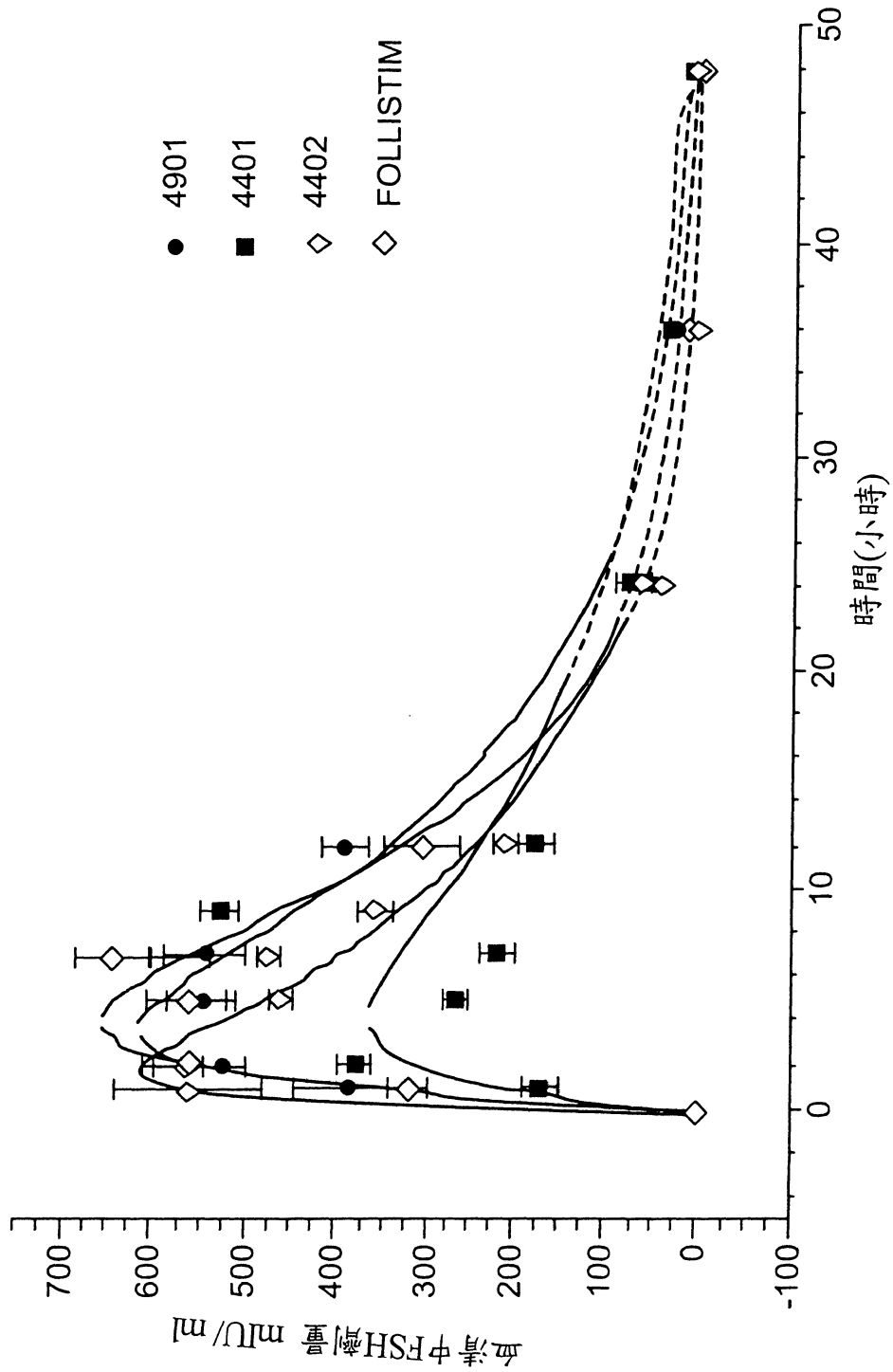
第 15 圖

28/37



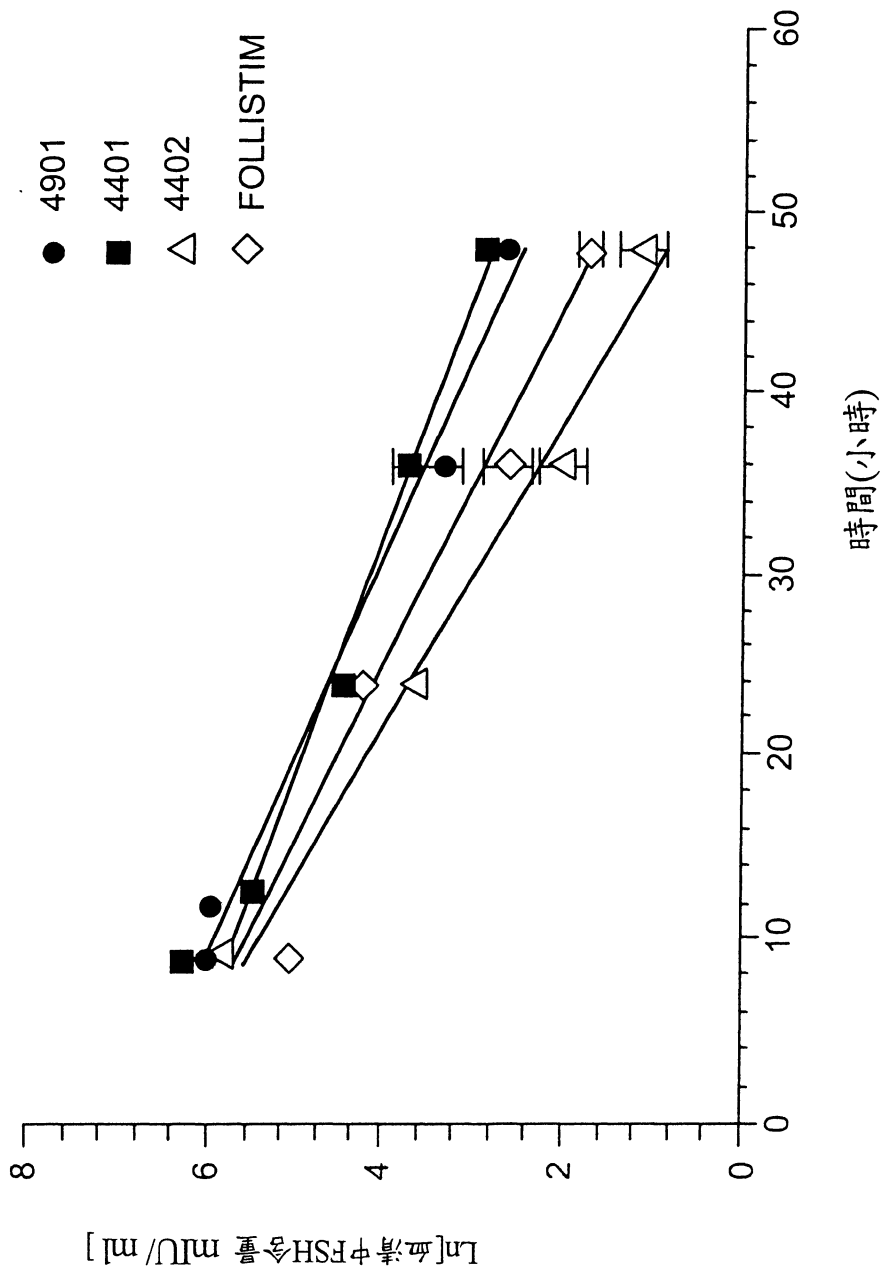
第16圖

29/37



第 17A 圖

30/37



第 17B 圖

LONGER ACTING TR4402-LA - MODIFIED, NOT BACK TO SCREENING

**#1 N-TERMINAL EXTENSION (ANITV)**

ANITVApdvqd cpecltqenp ffsqpgapil qcmgccfsra yptplrskkt mlvqkntse stccvaksyn  
rvtvmggfkv ehhtachst cyyhks

**#2 N-TERMINAL EXTENSION (ANITV) +E14R+Q20R+G73R+βE4R**

ANITVApdvqd cpecltqRnp ffsRpgapil qcmgccfsra yptplrskkt mlvqkntse  
stccvaksyn rvtvmgRfkv ehhtachst cyyhks

**#3 N-TERMINAL EXTENSION (ANITVNITV)**

ANITVNITVApdvqd cpecltqenp ffsqpgapil qcmgccfsra yptplrskkt mlvqkntse  
stccvaksyn rvtvmggfkv ehhtachst cyyhks

**#4 N-TERMINAL EXTENSION (ANITVNITV) +E14R+Q20R+G73R+βE4R**

ANITVNITVApdvqd cpecltqRnp ffsRpgapil qcmgccfsra yptplrskkt mlvqkntse  
stccvaksyn rvtvmgRfkv ehhtachst cyyhks

**#5 V78N**

ns cEltnitiai ekeecrfcis inttwcagyc ytrdlvykdp arpkiqktct fkelvNetvr vpgcahhads  
lytypNatqc hcgkcdsdst dctvrglgps ycsfgemke

**#6 E4R + V78N**

ns cRltnitiai ekeecrfcis inttwcagyc ytrdlvykdp arpkiqktct fkelvNetvr vpgcahhads  
lytypNatqc hcgkcdsdst dctvrglgps ycsfgemke

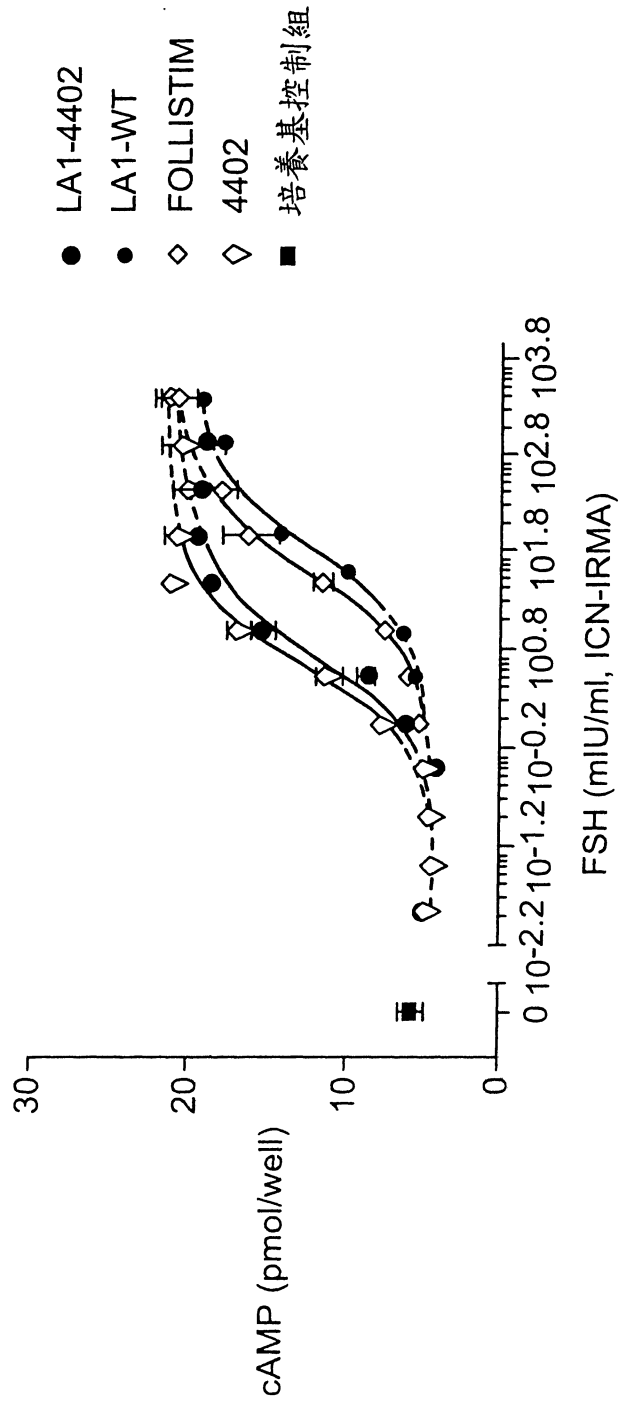
**#7 Y58N**

ns cEltnitiai ekeecrfcis inttwcagyc ytrdlvykdp arpkiqktct fkelvNetvr vpgcahhads  
lytypVatqc hcgkcdsdst dctvrglgps ycsfgemke

**#8 E4R) + Y58N**

ns cRltnitiai ekeecrfcis inttwcagyc ytrdlvykdp arpkiqktct fkelvNetvr vpgcahhads  
lytypVatqc hcgkcdsdst dctvrglgps ycsfgemke

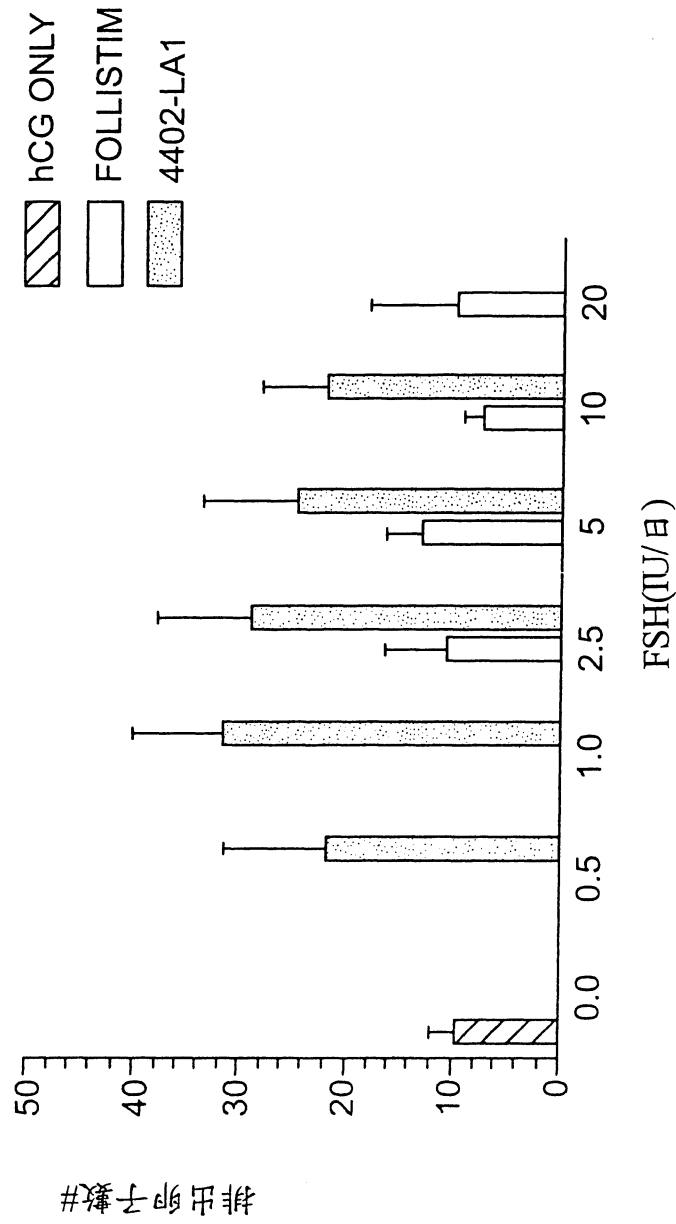
第 18 圖



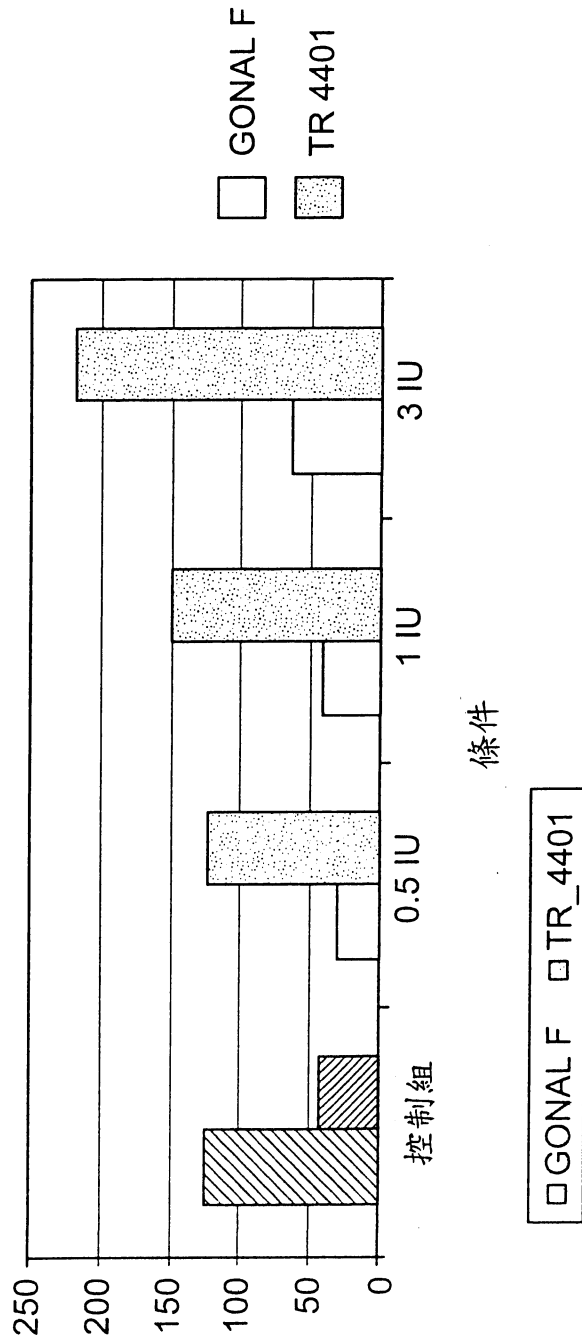
	LA1-4402	LA1-WT	FOLLISTIM	4402
EC50	5.939	65.81	41.14	4.324

第19圖

在未成熟混種B6D2F1小鼠中排卵試驗



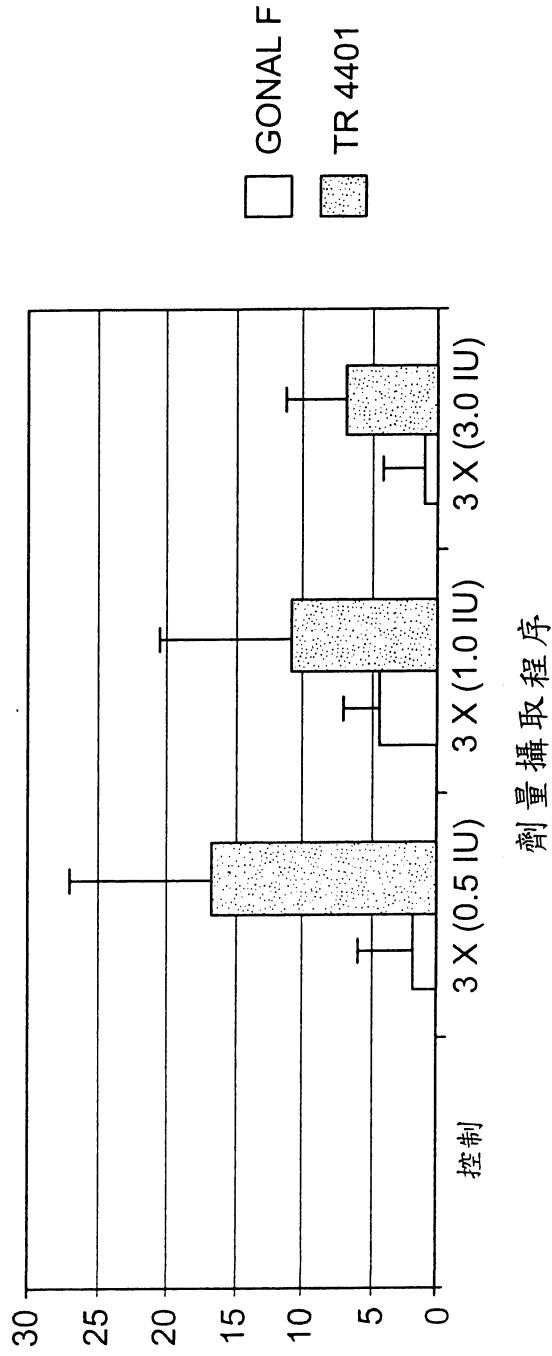
第20圖



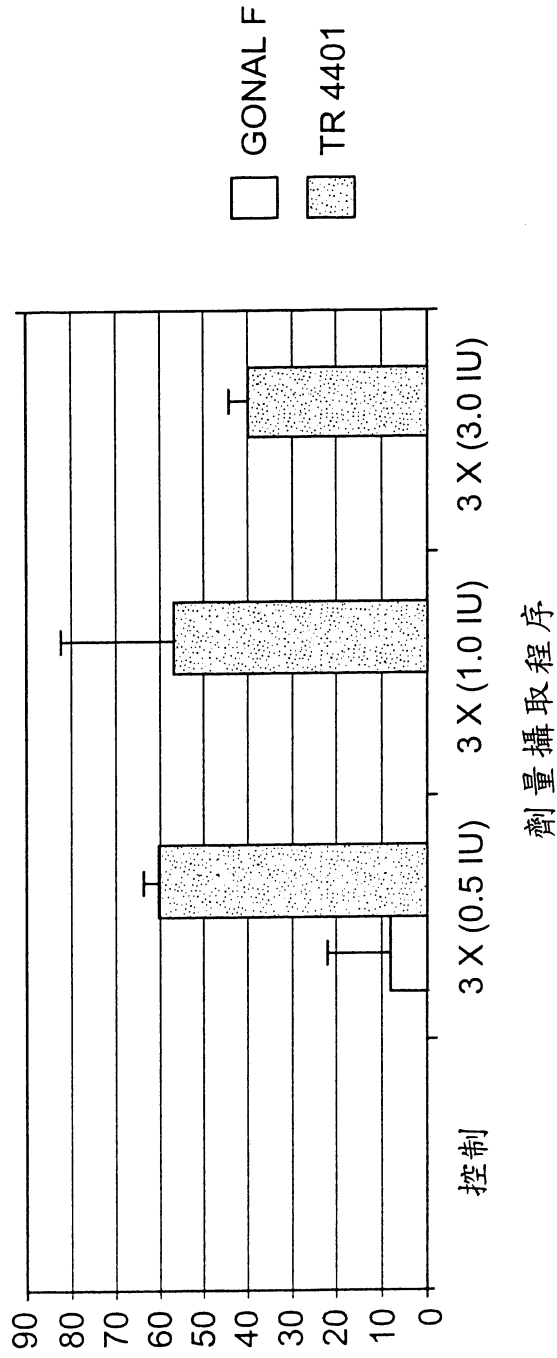
控制組 ▨ : 正面控制組(2.5 IU Folligon)

控制組 ▩ : 僅投予HCG

第 21 圖



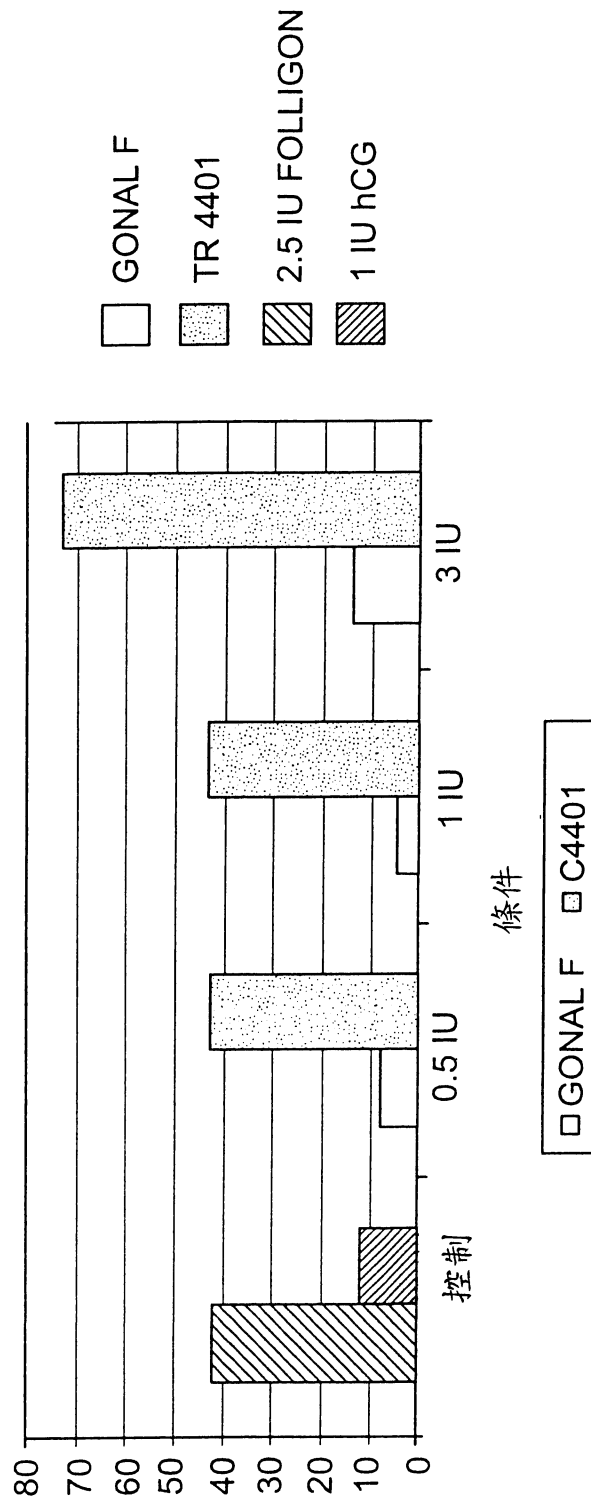
第 22 圖



控制組：3 × (1 IU hCG)

第 23 圖

37/37



第24圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 ( 5 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)