



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970010 A

(43) 申请公布日 2011.02.09

(21) 申请号 200980104085.5

*A61K 47/18* (2006.01)

(22) 申请日 2009.02.09

*A61K 38/24* (2006.01)

(30) 优先权数据

*A61K 9/00* (2006.01)

08151231.1 2008.02.08 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.08.04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/051451 2009.02.09

(87) PCT申请的公布数据

W02009/098318 EN 2009.08.13

(71) 申请人 拜奥吉耐里克斯股份公司

地址 德国曼海姆

(72) 发明人 S·斯托尔曾伯格 E·科勒

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

*A61K 47/10* (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 序列表 4 页  
附图 0 页

(54) 发明名称

促卵泡激素的液体制剂

(57) 摘要

本发明涉及包含促卵泡激素多肽和作为防腐剂的苯扎氯铵和苯甲醇的液体药物组合物。组合物还任选地包含一种或多种其他的可药用赋形剂。在一个实施方案中,组合物含有作为抗氧化剂的甲硫氨酸。组合物表现出良好的贮藏稳定性,并且特别用于其中促卵泡激素制剂被视为有效疗法的病症和医学适应症的预防和治疗。

1. 液体药物组合物,其包含促卵泡激素 (FSH) 或其变体和作为防腐剂的苯扎氯铵和苯甲醇。
2. 根据权利要求 1 的液体药物组合物,其中所存在的苯扎氯铵的浓度为 0.005-0.03mg/ml 和所存在的苯甲醇的浓度为 5.0-12.0mg/ml。
3. 根据权利要求 1 或 2 的液体药物组合物,其中所存在的 FSH 或其变体的浓度为 10 至 200  $\mu$ g/ml。
4. 根据上述权利要求中任意一项的液体药物组合物,其进一步包含作为抗氧化剂的甲硫氨酸。
5. 根据权利要求 4 的液体药物组合物,其中所存在的甲硫氨酸的浓度为 0.1 至 1.0mg/ml。
6. 根据上述权利要求中任意一项的液体药物组合物,其进一步包含表面活性剂。
7. 根据权利要求 6 的液体药物组合物,其中表面活性剂是聚氧乙烯脱水山梨醇烷基酯。
8. 根据权利要求 7 的液体药物组合物,其中聚氧乙烯脱水山梨醇烷基酯是聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80。
9. 根据权利要求 8 的液体药物组合物,其中所存在的聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80 的浓度为 0.05 至 0.5mg/ml。
10. 根据上述权利要求中任意一项的液体药物组合物,其进一步包含张力调节剂。
11. 根据权利要求 10 的液体药物组合物,其中张力调节剂是糖醇或糖。
12. 根据权利要求 11 的液体药物组合物,其中张力调节剂是甘露醇。
13. 根据权利要求 12 的液体药物组合物,其中所存在的甘露醇的浓度为 1.0 至 10mg/ml。
14. 根据上述权利要求中任意一项的液体药物组合物,其具有 6.5 至 7.5 的 pH 范围。
15. 根据权利要求 14 的液体药物组合物,其中 pH 范围是 6.8 至 7.2。
16. 根据权利要求 14 或 15 的液体药物组合物,其中用 NaOH 调节 pH。
17. 根据上述权利要求中任意一项的液体药物组合物,其进一步包含生理上可接受的缓冲剂。
18. 根据权利要求 17 的液体药物组合物,其中缓冲剂是磷酸盐。
19. 根据权利要求 17 或 18 的液体药物组合物,其中所存在的缓冲剂的浓度为 10-100mmol/l。
20. 根据上述权利要求中任意一项的液体药物组合物,其中组合物含有作为活性剂的 FSH 或其变体、作为表面活性剂的聚山梨醇酯 20 和 / 或聚山梨醇酯 80、作为张力调节剂的甘露醇、作为缓冲剂的磷酸盐、作为稳定剂的甲硫氨酸和作为防腐剂的苯甲醇和苯扎氯铵,并且没有其他赋形剂。
21. 药物容器,其含有根据上述权利要求中任意一项的液体药物组合物。
22. 根据权利要求 21 的药物容器,其中容器是注射器、管形瓶、输液瓶、安瓿或笔胆。
23. 根据权利要求 21 或 22 的药物容器,其中容器是在注射笔中的笔胆。
24. 制备根据权利要求 1-20 中任意一项的液体药物组合物的方法,其中将作为活性剂的 FSH 或其变体配制到水性制剂中,所述水性制剂包含作为防腐剂的苯扎氯铵和苯甲醇以

及其他药用赋形剂。

25. 制备包装的药物组合物的方法,其包括将包含 FSH 或其变体以及苯扎氯铵和苯甲醇的溶液置于管形瓶、安瓿、笔胆或药筒中。

26. 根据权利要求 1-20 中任意一项的液体药物组合物用于多剂量给药的用途。

## 促卵泡激素的液体制剂

[0001] 本发明涉及包含促卵泡激素多肽和作为防腐剂的苯扎氯铵和苯甲醇的液体药物组合物。组合物还任选地包含一种或多种其他的可药用赋形剂。在一个实施方案中,组合物含有作为抗氧化剂的甲硫氨酸。组合物表现出良好的储藏稳定性,并且特别用于其中促卵泡激素制剂被视为有效疗法的病症和医学适应症的预防和治疗。

[0002] 促卵泡激素 (FSH) 由垂体前叶的促性腺激素细胞产生并释放到循环系统中。FSH 与促黄体激素 (LH) 一同控制女性的卵母细胞成熟和男性的精子发生。FSH 和 LH 都属于由 2 个非共价连接的由不同基因编码的  $\alpha$ - 和  $\beta$ - 链组成的异源二聚体糖蛋白家族。 $\alpha$ - 和  $\beta$ - 链都是糖基化的。 $\alpha$ - 亚基由 92 个氨基酸残基组成,而  $\beta$ - 亚基由 111 个氨基酸残基组成,它们各自都有 2 个潜在的连接天冬酰胺的糖基化位点。

[0003] 人 FSH 用于治疗不排卵的女性、用于刺激多卵泡发生 (超数排卵) 和用于例如 IVF、ICSI、GIFT 或 CIFT 的辅助受孕的制剂。此外,人 FSH 用于刺激 FSH 生成量低或不产生 FSH 的女性的卵泡成熟和用于刺激患有先天的或后天的低促性腺素性功能减退症的男性的精子发生。

[0004] 直到 20 世纪 80 年代,人 FSH 的主要来源是从孕龄妇女的尿液分离出来的尿源 FSH。在 20 世纪 90 年代引入了高纯度的尿源 FSH 的进一步纯化的形式,并且最终从 1998 年起开发出重组 FSH 并得到广泛应用。随着重组 DNA 技术的出现,在被编码  $\alpha$ - 和  $\beta$ - 链的核酸序列转染的细胞培养物中生产人 FSH 成为可能。在例如 WO 88/10270、WO 86/04589 和 EP 0 735 139 中已经公开了编码  $\alpha$ - 和  $\beta$ - 链的 DNA 序列以及生产重组 FSH 的方法。

[0005] 目前,在德国市场上有两种商品化的重组人 FSH 产品, GONAL-f<sup>®</sup> 和 Puregon<sup>®</sup>, 两者都是通过在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中表达编码人野生型  $\alpha$ - 和  $\beta$ - 链的 DNA 序列来生产的。

[0006] 通常,蛋白质的半衰期非常短,并且当蛋白质暴露于各种因素 (例如不适宜蛋白质活性表达的温度、水、空气界面、高压、物理 / 机械胁迫、有机溶剂和微生物污染) 时,其发生变性,例如单体的聚集、二聚体的解离、和吸附在容器表面上。

[0007] 因此,变性蛋白丧失了内在的物理化学性质和生理活性作用。蛋白质的变性是不可逆的,因此,蛋白质一旦变性就几乎不能恢复其天然的性质而回到初始状态。

[0008] 具体地讲,具有由 2 个不同亚基组成的异源二聚体结构并且每次以低于几百微克的痕量进行给药的蛋白质 (例如人 FSH) 遭受了与相对高的蛋白损失有关的问题,包括因在水溶液中二聚体解离和蛋白质吸附在容器内表面上而引起的蛋白损失。解离的蛋白质丧失了其自身的生理活性,并且解离的单体非常易于聚集。而且,吸附在容器内表面上的蛋白质也非常容易通过变性过程聚集。当将其向人体给药时,如此变性的蛋白质可以成为形成对抗体内天然存在的蛋白质的抗体的诱因。

[0009] 某些蛋白药物制剂已经通过冷冻干燥 (冻干) 克服了稳定性问题。虽然这些冻干制剂足够稳定以致能保证足够的半衰期,但是其具有在给药前必须进行重构 (reconstitution) 的缺点。因此,患者在使用前必须在溶剂 (例如注射用水) 中重构干燥的糖蛋白,这对于患者而言是缺点和不方便。此外,必须与 FSH 的冻干制剂一起提供溶剂。

对于需要有规律地注射 FSH 的患者,例如为了诱导排卵而接受每日剂量的重组人 FSH 的患者,促性腺素制剂的易于处理、给药和注射是重要的。冻干的促性腺素制剂的重构要谨慎和小心,并且如果可能的话应避免重构。如果能够生产这些糖蛋白并将其分装为稳定的溶液,使患者无需重构就可直接注射药物,这将为促性腺素的使用提供便利。此外,冻干过程是费钱和耗时的加工步骤,如果在制备促性腺素制剂时能够避免该步骤,这将是有益的。

[0010] 因此,需要即时可用 (ready-for-use) 的注射制剂,该制剂具有足够的稳定性从而保证合理的贮藏期。

[0011] 作为应对这些限制的可选择的措施,可以通过向溶液状态的蛋白质加入稳定剂来改善蛋白质的稳定性。有用的蛋白质稳定剂的实例有已知的表面活性剂、蛋白质(例如白蛋白)、多糖、氨基酸、聚合物、盐等。然而,考虑到各种蛋白质的独特的物理化学性质,应该选择并使用最合适的稳定剂。而且,由于不同稳定剂之间的竞争作用和不良反应,不同稳定剂的联合使用可能带来预想的不良副作用。此外,由于不同的稳定剂具有特定的对稳定相应蛋白质有利的浓度范围,存在于溶液中的蛋白质的成功稳定还需要认真关注和很多努力。

[0012] 已经将 FSH 配制成在管形瓶、笔胆 (carpoule) 或安瓿中的单剂量和多剂量的液体形式。单剂量形式在使用之前的贮存中必须保持稳定和有效。多剂量形式不仅在使用之前的贮存中必须保持稳定和有效,而且在安瓿开封之后的多剂量使用方案的给药期间也必须保持稳定、有效和相对无菌。出于该原因,多剂量形式经常含有抑菌剂。

[0013] GONAL-f<sup>®</sup>, 一种人重组 FSH 的即时可用的液体制剂,可用作由注射笔给药的注射用溶液。溶液含有作为防腐剂的间甲酚 (ROTE LISTE 2007, No. 50 004)。Puregon<sup>®</sup>也可用作即时可用的注射用液体制剂,其含有作为防腐剂的苯甲醇 (ROTE LISTE 2007, No. 50 010)。

[0014] 含有防腐剂的 FSH 液体制剂也已记载于专利文献中。国际专利申请 WO-A1-00/04913 记载了包含防腐剂的 FSH 和 FSH 变体的制剂,所述的防腐剂选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢醋酸钠和硫柳汞。尽管这些防腐剂的使用以一般的方式被提及,但并未公开重组人 FSH 液体制剂中的防腐剂的特定的组合或混合物。

[0015] 此外,国际专利申请 WO 2004/037607 涉及人 FSH 的水性制剂,其包含甘氨酸、甲硫氨酸、非离子型表面活性剂和磷酸盐缓冲液作为稳定剂。另外,制剂可以任选地包括防腐剂,提及的有苯甲醇、甲酚、对羟基苯甲酸酯及其混合物。

[0016] 国际专利申请 WO 2004/087213 A1 记载了 FSH 的液体药物组合物,其包含选自 Pluronic<sup>®</sup>F77、Pluronic<sup>®</sup>F87、Pluronic<sup>®</sup>F88 和 Pluronic<sup>®</sup>F68 的表面活性剂。组合物可以进一步包含选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢醋酸钠和硫柳汞的抑菌剂。未提及抑菌剂的混合物或组合。

[0017] 因此,虽然需要提供含有防腐剂的促性腺素制剂,以便制剂适合于多次给药,但生产含有人蛋白的防腐的药物制剂已经证明是困难的。已经发现,当使用防腐剂时,如果药物制剂贮存较长时间,其引起稳定性问题。在该过程中,人蛋白失活并且形成团块,这可能是造成所观察到的对注射溶液不耐受的原因。在活性的人蛋白成分存在的情况下,不能用通常的方法生产用于输液或注射的防腐的药物制剂,这是因为在 121°C 的高压灭菌器中的灭

菌条件下活性物质被灭活并且其结构被破坏。也已知药剂学中通常所用的防腐剂与有活性的人蛋白成分发生反应从而使之灭活。所用的防腐剂的类型对于耐受性有重要作用。所有防腐剂都具有或高或低的过敏率。因此,为了实现良好的防腐,而且使与某种人糖蛋白组合的特定的防腐剂的缺点最小化,选择人蛋白制剂中的防腐剂是关键。

[0018] 因此,仍然迫切需要开发新的人重组 FSH 液体制剂,其由防腐剂进行防腐并且能够在延长的时间内稳定维持人重组 FSH 的活性。

[0019] 根据本发明,该问题和其他的问题能够通过主权利要求的特征解决。

[0020] 有利的实施方案在从属权利要求中进行定义。

[0021] 令人惊讶地,已经发现在包含作为活性剂的 FSH 或其变体和作为防腐剂的苯扎氯铵和苯甲醇的液体药物组合物中配制重组人 FSH 提供了良好的组合物稳定性,以致其能够用于单剂量和多剂量用途。本发明的组合物不需冷藏就能在延长的时间内贮存,没有显著的活性损失并且没有显著的降解。推测作为防腐剂的苯扎氯铵和苯甲醇的组合特别有利于与糖激素 FSH 组合,这是因为其提供了更好的防腐效果和确保与 FHS 之间的不利的相互作用保持最低水平。

[0022] 除非另有说明,以下定义是用来对用于描述本发明的各种术语的含义和范围进行举例说明和定义。

[0023] 术语“FSH”是指作为全长成熟蛋白的促卵泡激素多肽,其非限制性地包括人 FSH 或“hFSH”,不论其是重组生产的还是从人源分离得到的(例如绝经后妇女的尿液)。技术人员根据科学文献和专利文献(参见例如 WO 2004/087213)可以获知该人糖蛋白的蛋白质序列和人 FSH  $\beta$ -亚基的蛋白质序列。

[0024] 如本说明书所附的,人 FSH 的  $\alpha$ -链的氨基酸序列记载于 SEQ ID No. 1 中,人 FSH 的  $\beta$ -链的氨基酸序列记载于 SEQ ID No. 2 中。这些氨基酸序列对应于分别以登录号 J 00152 记载于 EMBL 数据库中和以登录号 NM\_000510 记载于 NCBI 数据库中的人 FSH 的  $\alpha$ -链和  $\beta$ -链的野生型氨基酸序列。

[0025] 编码人 FSH 的野生型核酸序列在 SEQ ID No. 3(= $\alpha$ -链)和 No. 4(= $\beta$ -链)中显示。

[0026] 重组 FSH 可以按照如在人类中天然发现的野生型核酸序列编码,或者其可以被改变的核酸序列编码,所述的改变的核酸序列表达产生具有野生型氨基酸序列的 FSH,即,与在人类中天然发现的野生型蛋白质序列相同。

[0027] 例如,编码人 FSH 的核酸序列能够以这种方式发生改变:为了增加在这些宿主细胞中的重组 FSH 的表达水平和产率,使编码人 FSH 的  $\alpha$ -和  $\beta$ -链的核酸序列中的一者或两者调整为在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中选择使用的密码子。

[0028] 编码人 FSH 并且按照 CHO 细胞中的密码子选择方面进行改良的核酸序列的实例记载于国际专利申请 WO 2009/000913 中。编码人 FSH 的  $\beta$ -链的改良核酸序列是记载于 SEQ ID No. 5 中的核酸序列的编码区(在 SEQ ID No. 5 中,编码区起始于核苷酸 56 并且延伸到核苷酸 442),编码人 FSH 的  $\alpha$ -链的改良核酸序列是记载于 SEQ ID No. 6 中的核酸序列的编码区(在 SEQ ID No. 6 中,编码区起始于核苷酸 19 并且延伸到核苷酸 366)。含有重组核苷酸分子(其包括编码人 FSH 的  $\beta$ -链的第一种改良的核酸序列和编码人 FSH 的  $\alpha$ -链的第二种改良的核酸序列)的 CHO 细胞系以保藏号 DSM ACC2833 于 2007 年 3 月 28 日存放于

在 Braunschweig 的 DSMZ。

[0029] 在优选的实施方案中,本发明的 FSH 液体制剂含有通过由 FSH 核酸序列的重组基因表达得到的重组人野生型 FSH,就人 FSH 的  $\beta$ -链和 FSH 的  $\alpha$ -链而言,所述的 FSH 核酸序列按照 CHO 细胞中的密码子选择进行了改良。在另一个优选的实施方案中,通过 WO 2009/000913 所公开的 FSH 核酸序列表达得到重组 FSH。

[0030] 表述“FSH 变体”是指包括与人 FSH 在氨基酸序列、糖基化类型或亚基间连接上有所不同,但表现出 FSH 活性的那些分子。实例包括 CTP-FSH,长效的改良的重组 FSH,由野生型  $\alpha$ -亚基和杂合的  $\beta$ -亚基组成,其中 hCG 的羧端肽已经与 FSH 的  $\beta$ -亚基的 C 末端融合,如 LaPolit 等人在内分泌学 (Endocrinology), 131, 2514-2520 (1992) 中或者 Klein 等人在 Human Reprod., 18, 50-56 (2003) 中所述的。也包括单链 CTP-FSH,由 Klein 等人在 Fertility & Sterility, 77, 1248-1255 (2002) 中所述的单链分子。FSH 变体的其他的实例包括具有引入  $\alpha$ -和 / 或  $\beta$ -亚基的另外的糖基化位点的 FSH 分子,如 WO 01/58493 中所公开的,和具有亚基间 S-S 键的 FSH 分子,如 WO 98/58957 中所公开的。FSH 变体的其他实例在 WO 2004/087213 中公开,其特征在于  $\beta$ -亚基的羧基端缺失。FSH 变体的其他实例包括因蛋白质的氨基酸序列变化(其中该变化引入了另外的糖基化位点或者缺失天然存在的糖基化位点)而与野生型 FSH 相比具有改变的糖基化程度的 FSH 分子。

[0031] 进一步地,本发明的 FSH 或 FSH 变体可以是已经被化学部分修饰的 FSH 分子。例如,这类 FSH 偶联物可包含聚亚烷基二醇(例如 PEG)、羟烷基淀粉(例如 HES)或其他聚合物部分。

[0032] FSH 异源二聚体或 FSH 变体异源二聚体能够用任意合适的方法来生产,例如根据具体情况通过重组技术生产、从天然来源分离或纯化、或者通过化学合成,或者它们的任意组合。

[0033] 术语“重组”的使用是指使用重组 DNA 技术(参见例如 WO 85/01958)生产的 FSH 或 FSH 变体的制剂。有若干种的  $\alpha$ -和  $\beta$ -亚基已知道 FSH 的基因组和 cDNA 克隆的序列。用重组技术生产重组 FSH 或 FSH 变体的各种方法记载于现有技术中,参见例如欧洲专利申请 EP 0 711 894 和欧洲专利申请 EP 0 487 512。

[0034] 本发明所用的 FSH 或 FSH 变体不但可以用重组方法(包括从哺乳动物细胞、例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)来生产,而且可以从其他生物来源(例如从尿液来源)纯化得到。现有技术中公开了可用的方法。

[0035] 重组人 FSH 可以从宿主细胞培养上清液通过 1 个或多个纯化步骤纯化得到。合适的纯化方法是技术人员已知的并且包括离子交换色谱法、疏水作用色谱法、羟磷灰石色谱法、亲和色谱法和凝胶过滤。纯化重组人 FSH 的方法在例如 WO 00/63248、WO 2006/051070 和 WO 2005/063811 中公开。

[0036] 在本发明优选的实施方案中,FSH 或 FSH 变体分别对应于人 FSH 或源自人 FSH。在本发明的优选的实施方案中,FSH 或 FSH 变体已经用重组技术生产。

[0037] 更优选地,FSH 是已经重组生产的人 FSH,特别优选在用载体或包含编码 FSH 的人糖蛋白  $\alpha$ -亚基和  $\beta$ -亚基(由 SEQ ID No. 3 和 4(=野生型核酸序列)或者由 SEQ ID No. 5 和 6(=密码子优化的核酸序列)编码)的 DNA 的载体转染的中国仓鼠卵巢细胞中生产。编码  $\alpha$ -和  $\beta$ -亚基的 DNA 可以存在于相同或不同的载体上。

[0038] 重组 FSH 与其来自尿液的对应物相比具有若干优点。使用重组细胞的培养和分离技术保证批次间的一致性。相反地,不同批次的尿液的 FSH 在亚基的纯度、糖基化类型、唾液酸化作用和氧化方面差别巨大。由于重组 FSH 具有更好的批次间一致性和纯度,该激素可使用例如等电聚焦法 (IEF) 的技术容易地进行定性和定量。能够容易地对重组 FSH 进行定性和定量允许按激素重量填充管形瓶,而不是按生物测定来填充。

[0039] 术语“FSH 活性”是指 FSH 制剂引发与 FSH 相关的生物响应的能力,例如女性患者体内的在 Steelman-Pohley 检验 (Steelman 等人 (1953) 内分泌学 (Endocrinology) 53, 604-616) 中的卵巢重量增加或者卵泡生长。通过超声能够评估女性患者体内的卵泡生长,例如根据在刺激第 8 天平均直径为约 16mm 的卵泡的数量。用针对 FSH 的可接受的标准评估生物活性。

[0040] 术语“水性稀释剂”是指含水的液体溶剂。水性溶剂系统可以仅由水组成,或者可以由水加上 1 种或多种可混溶的溶剂组成,并且可以含有溶解的溶质,例如糖、缓冲剂、盐或其他赋形剂。更常用的非水溶剂是短链有机醇 (例如甲醇、乙醇、丙醇)、短链酮 (例如丙酮) 和多元醇 (例如甘油)。在本发明的优选的实施方案中,水性稀释剂是水,即,本发明的即时可用的液体制剂是水性制剂。

[0041] “张力调节剂”或“等渗剂”是身体上耐受的并且为制剂赋予适当的张力从而防止穿过与制剂接触的细胞膜的水的净流量。合适的等渗剂非限制性地包括甘油、氨基酸或蛋白质 (例如甘氨酸或白蛋白)、盐 (例如氯化钠)、糖 (例如右旋糖、蔗糖、海藻糖和乳糖) 和糖醇 (例如甘露醇和山梨醇)。

[0042] 术语“抑菌的”或“抑菌剂”或“防腐剂”是指加入到制剂中的用作抗菌剂的成分或物质。本发明的含 FSH 或 FSH 变体的防腐制剂优选符合对于防腐效果的法律或法规,从而成为在商业上可行的多用途产品,优选用于人。

[0043] 用于本发明的制剂的抑菌剂是苯扎氯铵和苯甲醇的组合。虽然组合物中可能包括其他防腐剂 (即,除了苯扎氯铵和苯甲醇之外),例如苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、对羟基苯甲酸烷基酯 (甲基、乙基、丙基、丁基等)、苜索氯铵、脱氢醋酸钠或硫柳汞,但优选仅有苯扎氯铵和苯甲醇作为防腐剂存在。

[0044] 术语“缓冲剂”或“生理上可接受的缓冲剂”是指制剂中已知安全的药用或兽医用的并且具有维持或控制制剂的 pH 在制剂所需的 pH 范围内的作用的化合物溶液。用于控制 pH 在适度酸性的 pH 至适度碱性的 pH 的可接受的缓冲剂非限制性地包括诸如磷酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、精氨酸、三羟甲基氨基甲烷和组氨酸的化合物。优选的缓冲剂是磷酸盐缓冲剂。

[0045] 术语“磷酸盐缓冲剂”是指调整到需要的 pH 的含有磷酸或其盐的溶液。通常,磷酸盐缓冲剂是由磷酸或磷酸的盐 (其非限制性地包括钠盐和钾盐) 制成的。一些磷酸盐是本领域已知的,例如酸的钠和钾一价、二价和三价盐。磷酸的盐也已知以存在的盐的水合物存在。磷酸盐缓冲剂可以覆盖例如约 pH4 至约 pH10 的 pH 范围,优选的范围是约 pH 5 至约 pH 9,最优选的 pH 范围是约 6.0 至约 8.0,最优选是 pH 7.0 或约 pH 7.0。在优选的实施方案中,缓冲系统仅由磷酸盐缓冲剂组成,即,制剂中除了磷酸盐之外不存在其他缓冲剂。

[0046] 术语“管形瓶”宽泛地指适合于以液体形式在无菌状态保存 FSH 的容器。本文所用的管形瓶的实例包括安瓿、药筒、泡罩包装或其他适合于通过注射器、泵 (包括渗透泵)、

导管、透皮贴剂、肺或跨粘膜喷雾剂向患者递送 FSH 的贮库。适合于包装胃肠外、肺、跨粘膜或经皮给药的产品的管形瓶是本领域熟知和公认的。

[0047] 术语“稳定性”是指本发明的制剂中的 FSH 的物理、化学和构象的稳定性（包括生物活性的保持）。蛋白制剂的不稳定性可能由蛋白质分子的化学降解或聚集从而形成更高数量级的聚合物引起，由异源二聚体离解成单体、去糖基化、糖基化修饰、氧化（特别是  $\alpha$ -亚基的氧化）或任何其他降低本发明所包括的 FSH 多肽的至少 1 种生物活性的结构变化导致。

[0048] “稳定的”溶液或制剂或药物组合物是指其中蛋白质的降解程度、修饰、聚集、生物活性丧失等受到可接受地控制，并且不会随着时间而发生不可接受地增加。优选地，制剂保留至少 80% 或约 80% 的 FSH 活性并且在约 2-8°C 的温度下保持至少 6 个月时间。通过使用 Steelman-Pohley 卵巢增重生物检定法能够测量 FSH 活性。

[0049] 术语“治疗”是指对需要以刺激卵巢或睾丸或者由 FSH 调节的任何其他生理反应为目的而施用 FSH 的患者进行给药、随访、管理和 / 或照料。因此，治疗可以非限制性地包括为了诱导或改善精子质量、刺激男性体内的睾酮释放或女性体内的卵泡发育或诱导排卵而施用 FSH。

[0050] 用语“多剂量给药”或“多剂量使用”是指包括用于 1 次以上注射（例如 2、3、4、5、6 或更多次注射）的 FSH 制剂的单个管形瓶、安瓿、笔胆或药筒的使用。优选在至少约 12 个小时、24 个小时、48 个小时等的时间内、优选多达约 12 天的时间内进行注射。可以间隔时间进行注射，例如间隔 6、12、24、48 或 72 小时。

[0051] 发明人已经发现通过将 FSH 或 FSH 变体与作为防腐剂的苯扎氯铵和苯甲醇二者进行配制，得到了表现出高的蛋白稳定性同时具有良好防腐作用的制剂。而且，人们认为本发明的 FSH 制剂组合物与本领域中已知的 FSH 制剂相比表现出改进的局部耐受性（例如在注射点没有刺激）。

[0052] 苯扎氯铵优选以足以在需要的贮藏期（例如 6 至 12 至 24 个月）内维持 FSH 稳定性并且足以防止细菌生长的浓度存在于制剂中。

[0053] 优选地，本发明的液体制剂中的苯扎氯铵的浓度为约 0.005mg/ml 至约 0.05mg/ml、更优选为约 0.01mg/ml 至约 0.04mg/ml、最优选为 0.02mg/ml 或约 0.02mg/ml (0.002% (w/v))。

[0054] 苯甲醇优选以足以在需要的贮藏期（例如 6 至 12 至 24 个月）内维持 FSH 稳定性并且足以防止细菌生长的浓度存在于制剂中。

[0055] 优选地，本发明的液体制剂中的苯甲醇的浓度为约 0.5mg/ml 至约 20.0mg/ml、更优选为约 1.0mg/ml 至约 15.0mg/ml、更特别优选为约 5.0mg/ml 至约 12.0mg/ml、最优选为 10.0mg/ml 或约 10.0mg/ml (1.0% (w/v))。

[0056] 本发明的液体制剂之中的促卵泡激素 (FSH) 的浓度优选为约 150IU/ml 至约 2,000IU/ml、更优选为约 300IU/ml 至约 1,500IU/ml、更特别优选为约 450IU/ml 至约 750IU/ml、最优选为 600IU/ml 或约 600IU/ml。

[0057] 重组 FSH 的体内生物比活性通常在约 8,000IU FSH/mg 蛋白质至约 16,000IU FSH/mg 蛋白质的范围。例如，可从商业上购买到的产品 Puregon (来自 Organon) 中的重组人 FSH 具有约 10,000IE/mg 蛋白质的生物比活性，而对于来自 Serono 的 Gonal-f，重组人 FSH 的生

物活性为约 13,600IE/mg 蛋白质。

[0058] 通过与 FSH 和其他促性腺素相关的已知方法可以测定 FSH 活性。这些方法包括例如酶免疫测定法 (EIA) 或报道基因测定法。通常用欧洲药典第 5 版中所述的源自尿液的 FSH 的生物检定法来测定生物活性。在这一过程中,通过将 FSH 增大用绒促性素处理的未成熟大鼠的卵巢的效果与标准制剂的同样效果相比较来评价生物活性。

[0059] 本发明的液体药物组合物中的 FSH 或 FSH 变体的浓度通常在 10 至 200  $\mu$ g/ml 的范围。如果组合物是用于多用途给药 (例如通过使用注射笔),FSH 或 FSH 变体的可用浓度将在 30 至 150  $\mu$ g/ml 的范围、优选在 40 至 100  $\mu$ g/ml 的范围。

[0060] 一般而言,FSH 浓度取决于用途 (单剂量或多剂量)、给药方式、给药工具和 FSH 或 FSH 变体的生物活性。

[0061] 优选地,FSH 或 FSH 变体是药物组合物中唯一存在的药物活性剂,虽然可能包括其他的促性腺激素 (例如 LH)。

[0062] 为了防止 FSH 或 FSH 变体吸附到管形瓶、安瓿、笔胆、药筒或注射器的表面上,本发明的药物组合物可以进一步包含表面活性剂,优选非离子表面活性剂。在此,非离子表面活性剂降低蛋白质溶液的表面张力,从而防止蛋白质吸附或聚集在疏水表面上。能够用于本发明的非离子表面活性剂的优选的实例可以包括基于聚山梨醇酯的非离子表面活性剂和基于泊洛沙姆的非离子表面活性剂。这些非离子表面活性剂可以单独或者以其任意组合使用。基于聚山梨醇酯的非离子表面活性剂是特别优选的。基于聚山梨醇酯的非离子表面活性剂的具体实例包括聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60 和聚山梨醇酯 80。聚山梨醇酯 20 和聚山梨醇酯 80 是更特别优选的,聚山梨醇酯 20 是最优选的。聚山梨醇酯 20 具有相对低的临界胶束浓度。因此,聚山梨醇酯 20 不仅在即使低浓度下减少或防止蛋白质的表面吸附,而且抑制蛋白质的化学降解。在本发明的液体组合物中使用高浓度的非离子表面活性剂是不合适的。这是因为使用高浓度的非离子表面活性剂导致干扰效应,因此当使用如紫外光谱或等电聚焦的分析方法进行蛋白质的浓度测定或稳定性评价时,很难精确地评价蛋白质的稳定性。因此,本发明的水性制剂含有浓度低于 1.0mg/ml 和更优选 0.05 至 0.5mg/ml 的非离子表面活性剂。

[0063] 在优选的实施方案中,聚山梨醇酯 20 是制剂中唯一存在的表面活性剂。

[0064] 优选地,本发明的 FSH 制剂的 pH 在约 6.0 和约 8.0 之间、更优选约 6.5 至约 7.5、包括约 pH 6.8、pH 7.0、pH 7.2 和 pH 7.4。优选的缓冲剂是磷酸盐,优选的反荷离子是钠或钾离子。

[0065] 在总溶液中缓冲剂浓度能够在 5mM、10mM、50mM、100mM、150mM、200mM、250mM 和 500mM 之间变化。优选地,缓冲剂的浓度是 50mM 或约 50mM。具有 pH 7.0 的 50mM 的磷酸盐缓冲剂是特别优选的。

[0066] 能够通过加入适量的合适酸或碱来调制剂剂的 pH。在一个实施方案中,用 NaOH 调节液体药物组合物的 pH。

[0067] 优选地,本发明的制剂含有抗氧化剂,例如甲硫氨酸、亚硫酸氢钠、乙二胺四乙酸 (EDTA) 的盐、丁羟甲苯 (BHT) 和丁羟茴醚 (BAH)。最优选甲硫氨酸。抗氧化剂防止 FSH (特别是  $\alpha$ -亚基) 的氧化。

[0068] 液体药物组合物中的甲硫氨酸的浓度优选是约 0.1 至约 1.0mg/ml、更优选约 0.2

至 0.8mg/ml、最优选是 0.5mg/ml 或约 0.5mg/ml。

[0069] 在优选的实施方案中,甲硫氨酸是本发明的制剂中唯一存在的抗氧化剂。

[0070] 优选地,本发明的制剂含有作为稳定剂和张力调节剂单糖或二糖或者糖醇,例如蔗糖、右旋糖、乳糖、山梨醇和 / 或甘油。最优选的是糖醇,特别优选甘露醇。

[0071] 糖或糖醇的浓度优选为约 1.0 至 10mg/ml、最优选的浓度为 5.0mg/ml 或约 5.0mg/ml。在一个实施方案中,本发明的组合物中所存在的甘露醇的量为 5.0mg/ml

[0072] 在优选的实施方案中,甘露醇是本发明的制剂中唯一存在的张力调节剂。

[0073] 在优选的实施方案中,本发明的制剂不含任何甘氨酸。

[0074] 在一个实施方案中,本发明的液体药物组合物含有作为活性剂的 FSH 或其变体、作为表面活性剂的聚山梨醇酯 20 和 / 或聚山梨醇酯 80、作为张力调节剂的甘露醇、作为缓冲剂的磷酸盐、作为稳定剂的甲硫氨酸和作为防腐剂的苯甲醇和苯扎氯铵、以及水,并且没有其他赋形剂。

[0075] 如上所述,本发明提供单次使用和多剂量使用的液体制剂,其含有至少 2 种抑菌剂的组合。本发明的制剂适合于药用或兽医用。

[0076] 在一个实施方案中,本发明提供了用于人药用的制备物品,其包括包装材料和容器,所述容器包含在水性稀释剂中的 FSH 或 FSH 变体以及苯甲醇和苯扎氯铵、任选地含有缓冲剂和 / 或其他赋形剂的溶液,其中所述的包装材料包含标明该溶液可以在第一次使用后保存 24 小时或更长的时间的书面材料。容器优选是注射器、管形瓶、输液瓶、安瓿或笔胆。最优选地,容器是在注射笔中的笔胆。

[0077] 在第一次使用之前,在容器封闭前,管形瓶、安瓿、笔胆或药筒已经被打破,本发明的制剂可以保持至少约 6 个月、12 个月或 24 个月。在优选的贮藏条件下,在第一次使用前,本发明的药物组合物保持远离强光(优选在暗处)、在约 2-8°C 温度下。

[0078] 本发明的制剂能够使用公认的装置进行给药。包含这些单个的管形瓶系统的实例包括用于递送溶液的笔注射器装置,例如已知的 EasyJect<sup>®</sup>、GONAL-F<sup>®</sup>笔、Humaject<sup>®</sup>、Novopen<sup>®</sup>、B-D<sup>®</sup>笔、AutoPen<sup>®</sup>、Follistim<sup>®</sup>-笔、Puregon<sup>®</sup>-笔和 OptiPen<sup>®</sup>。

[0079] 可以将稳定的防腐的制剂以澄清溶液提供给患者。溶液可以单次使用或者其可以重复多次使用并且可以满足单次或多次循环的患者治疗,因此提供了比当前可用的治疗方案更方便的治疗方案。

[0080] 本发明的水性制剂是即时可用的溶液,FSH 制剂在任何时间点都不需重构。

[0081] 可以通过本领域中熟知的多种给药方法将本文所述的稳定的防腐制剂中的 FSH 或 FSH 变体给予符合本发明的患者,包括皮下或肌肉注射、经皮、肺、跨粘膜、植入、渗透泵、药筒、微量泵、口服或技术人员理解的其他方法。

[0082] 提供以下实施例,仅仅是用来进一步地举例说明本发明的制剂和组合物的制备。本发明的范围不应解释为仅仅由以下实施例组成。

[0083] 本发明也涉及含有本发明的液体药物组合物的药物容器。合适的药物容器可从现有技术获知。例如,容器可以是注射器、管形瓶、输液瓶、安瓿或笔胆。在优选的实施方案中,当容器是注射器时,注射器装配有针头保护系统。可从现有技术获知的该针头保护系统帮助降低伤害的危险。在另一个实施方案中,容器是注射笔中的笔胆。

[0084] 本发明也涉及制备本发明的液体药物组合物的方法,其中将作为活性剂的 FSH 或

FSH 变体配制在包含作为防腐剂的苯扎氯铵和苯甲醇以及其他药用赋形剂的水性制剂中。

[0085] 在另一方面,本发明涉及本发明的液体药物组合物用于多剂量给药的用途。本发明的药物组合物能够有利地用于治疗不育症和与 FSH 相关的其他病症。在优选的实施方案中,本发明的 FSH 制剂用于人的治疗。然而,通常也可将本发明药物组合物给予其他哺乳动物,例如绵羊、牛、猪或马。

[0086] 发现本发明的药物液体制剂表现出非常好的贮藏稳定性。在本发明的范围内,术语“贮藏稳定的”被理解为指在 25°C 下制剂贮藏 3 个月之后,活性的 FSH 或 FSH 变体的含量仍然达到原始浓度的 80% 或更多。优选地,在 25°C 贮藏 3 个月之后,FSH 活性的剩余含量仍达到原始活性的至少 85%、更优选至少 90% 和最优选至少 95%。

[0087] FSH 或 FSH 变体的生物活性能够通过给定的条件下,将其增大用绒促性素处理的未成熟大鼠的卵巢的效果与国际标准制剂或以国际单位标定的参照制剂的同样效果相比较来进行评价(欧洲药典,第 5 版)。

[0088] 例如,Albanese 等人在 *Mol. Cell Endocrinol.* 101 :211-219 (1994) 中描述了 FSH 体外活性的测定。

[0089] 用于本发明的制剂的 FSH 或 FSH 变体的纯度应当为至少 95%、优选至少 97%、更优选至少 99% 和最优选高于 99%。借助 HPLC 分析能够测定纯度。实施该分析的合适的材料和方案能够从例如 Vydac 或 TOSOH Bioscience 的商业供应商获得。

[0090] 配制本发明的溶液的组分能够从常规来源获得,例如从如 Sigma 或 Merck 公司获得。

[0091] 本发明的制剂能够根据常规的方法来进行生产。制剂的组分能够溶解于水性缓冲液中。或者,由于纯化过程,已经能够在水性缓冲液中得到 FSH 或 FSH 变体。

[0092] 最后,将制成的液体制剂填充到合适的药物容器中,在其中贮藏直至给药。

[0093] 以下实施例是为了举例说明本发明,而不是限制其范围。

## 实施例

[0094] 实施例 1

[0095] 通过重组技术制备重组人 FSH

[0096] 用标准方法在转染的 CHO 宿主细胞中生产重组人 FSH。这些方法包括 CHO 细胞克隆的传代(所述克隆产生来自编码人 FSH 的  $\alpha$ -链和  $\beta$ -链的一种或多种重组核酸分子的重组人 FSH)、在合适的条件下培养宿主细胞和从细胞培养物中提纯重组人 FSH。合适的方法记载于如上所述的现有技术中。

[0097] 在优选的实施方案中,重组人 FSH 按照国际专利申请 W02009/000913 所述生产。

[0098] 实施例 2

[0099] 液体 FSH 制剂

[0100] 通过在水性磷酸盐缓冲溶液中配制以下组分来制备包含重组人 FSH 的液体制剂。

[0101]

组分	
重组人 FSH	600IU/ml

聚山梨醇酯 20	0.2mg/ml
磷酸钠	50mM
甘露醇	5.0mg/ml
L- 甲硫氨酸	0.5mg/ml
苯甲醇	10.0mg/ml
苯扎氯铵	0.02mg/ml
注射用水	
PH	7.0

[0102] 测定重组人 FSH 的活性为约 10,000IU/mg。

[0103] 通过加入 NaOH 调节组合物的 pH 值。所有组分的质量都符合欧洲药典 (Ph. Eur.)。制剂具有 254mOsmol/kg 的张力。

[0104] 此外,制备 2 个现有技术中的 FSH 制剂作为对比制剂:

[0105] A) 对比制剂 Gonal-f:10mM 磷酸钠,60mg/ml 蔗糖,0.1mg/ml 甲硫氨酸,0.1mg/ml 泊洛沙姆 188,3mg/ml 间甲酚,pH 7.0。

[0106] B) 对比制剂 Puregon:50mM 柠檬酸钠,50mg/ml 蔗糖,0.5mg/ml 甲硫氨酸,0.2mg/ml 聚山梨醇酯 20,10mg/ml 苯甲醇,pH 7.0。

[0107] 实施例 3

[0108] 本发明的制剂的稳定性试验

[0109] 如实施例 2 中所述的水性制剂等分为 1ml/瓶并且在 2-8°C、25°C 和 37°C 贮藏。在 25°C 贮藏 12 周和在 37°C 贮藏 9 周之后,检验样品的各试验参数。根据欧洲药典第 5 版检验充分的防腐效果。用 SE-HPLC 和 SDS-PAGE 测定 % FSH 的回收率、% 二聚体 FSH 的减少 (FSH 离解成单体) 和 FSH 的纯度。

[0110] 在 2-8°C、25°C 和 37°C 贮藏,本发明的制剂表现出高于 95% 的重组人 FSH 的回收率。此外,在 2-8°C、25°C 和 37°C 贮藏,该制剂表现出低于 5% 的二聚体 FSH 的减少。进一步地,在 2-8°C、25°C 和 37°C 贮藏,该制剂表现出高于 95% 的 FSH 的纯度。

[0111] 从这些结果,可见本发明的 FSH 水性制剂 (包含作为表面活性剂的聚山梨醇酯 20、作为张力调节剂的甘露醇、作为缓冲剂的磷酸盐、作为稳定剂的甲硫氨酸和作为防腐剂的苯甲醇和苯扎氯铵) 防止蛋白质损失和变性以及蛋白质离解为构成的单体,并且使 FSH 在延长的时间内稳定。此外,由于其有益的防腐性能,该制剂是用于多剂量给药的有用的制剂。

[0112] 用根据欧洲药典第 5 版的挑战试验 (challenge test) 测定本发明的 FSH 制剂的抗菌防腐效果。试验包括:用限定的微生物的规定的接种物接种水性制剂组合物、在规定的温度贮藏接种后的制剂、在规定的的时间间隔从制剂中取样和计数所取出的样品中的微生物。如果制剂的防腐性足够,微生物的数量有显著降低或至少不增加。

[0113] 本发明的FSH制剂表现出微生物数量显著降低,从而证明有非常良好的防腐性。

[0114] 此外,发现本发明的制剂具有与现有技术的对比制剂Gonal-f和Puregon的稳定性相当的稳定性。

[0115] 序列表:

[0116] SEQ ID No. 1:人FSH的 $\alpha$ -链的氨基酸序列

[0117] SEQ ID No. 2:人FSH的 $\beta$ -链的氨基酸序列

[0118] SEQ ID No. 3:编码人FSH的 $\alpha$ -链的野生型核酸序列

[0119] SEQ ID No. 4:编码人FSH的 $\beta$ -链的野生型核酸序列

[0120] SEQ ID No. 5:编码人FSH的 $\beta$ -链的密码子优化的核酸序列

[0121] SEQ ID No. 6:编码人FSH的 $\alpha$ -链的密码子优化的核酸序列

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 拜奥吉耐里克斯股份公司

&lt;120&gt; 促卵泡激素的液体制剂

&lt;130&gt; B 8299

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn 版本3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CHAIN

&lt;222&gt; (1)..(116)

<223> 人FSH的 $\alpha$ -链

&lt;400&gt; 1

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 Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro  
 20 25 30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro  
 35 40 45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro  
 50 55 60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu  
 65 70 75 80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly  
 85 90 95

Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr  
 100 105 110

Tyr His Lys Ser  
 115

&lt;210&gt; 2

[0002]

<211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> CHAIN  
 <222> (1)..(129)  
 <223> 人FSH的 $\beta$ -链

<400> 2

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

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys  
 20 25 30

Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly  
 35 40 45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys  
 50 55 60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg  
 65 70 75 80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val  
 85 90 95

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys  
 100 105 110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys  
 115 120 125

Glu

<210> 3  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 编码人FSH的 $\alpha$ -链的野生型核酸序列

[0003]

<400> 3  
 cttaatattag cegccagcat ggattactac agaaaatatg cagctatctt tctggtcaca 60  
 ttgtcgggtgt ttctgcatgt tctccattcc gctcctgatg tgcaggattg cccagaatgc 120  
 acgtacagg aaaaccatt cttctcccag cggggtgccc caatacttca gtgcatgggc 180  
 tgctgcttct ctagagcata tcccactcca ctaaggtcca agaagacgat gttgggtccaa 240  
 aagaacgtca cctcagagtc cacttgctgt gtagctaaat catataacag ggtcacagta 300  
 atgggggggtt tcaaagtgga gaaccacacg gcgtgccact gcagtacttg ttattatcac 360  
 aaatcttaa 369

<210> 4  
 <211> 474  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 编码人FSH的 $\beta$ -链的野生型核酸序列

<400> 4  
 aggatecccc ggctacctcc ccgcggggag gcgcgccctt taattaagcc gccaccatga 60  
 agacactcca gtttttcttc cttttctggt gctggaaagc aatctgctgc aatagctgtg 120  
 agctgaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc ataagcatca 180  
 acaccacttg gtgtgctggc tactgctaca ccagggatct ggtgtataag gaccagcca 240  
 ggccccaaat ccagaaaaca tgtaccttca aggaactggt atatgaaaca gtgagagtgc 300  
 ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacataccc agtggccacc cagtgtcact 360  
 gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggccctgggg cccagctact 420  
 gtccttttgg tgaaatgaaa gaataaacat gccatggcat gcgagctcga attc 474

<210> 5  
 <211> 471  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 编码人FSH的 $\beta$ -链的密码子优化的核酸序列

<400> 5  
 aggatecccc ggtacctccc ccgcggggagg gcgcgccctt aattaagccg ccaccatgaa 60

[0004]

gaccctgcag ttctttctcc tgttctgctg ctggaaggcc atctgctgca acagctgcga	120
gctgaccaac atcaccatcg ccatcgagaa ggaggagtgc aggttctgca tcagcatcaa	180
caccacctgg tgcgccgat actgctacac caggacactg gtgtacaagg accccgccag	240
gcccaagatc cagaagacct gcacctcaa ggagctggtg tacgagaccg tgagggtgcc	300
cggctgcgcc caccacgcc acagcctgta cacctacccc gtggccaccc agtgccactg	360
cggcaagtgc gacagcgaca gcaccgactg caccgtgagg ggctgggcc ccagctactg	420
cagcttcggc gagatgaagg agtaatgacc atggcatgcg agctcgaatt c	471

<210> 6  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 编码人FSH的 $\alpha$ -链的密码子优化的核酸序列

<400> 6	
cttaattaag cggccagcat ggactactac aggaagtacg ccgcatctt cctggtgacc	60
ctgagcgtgt tcctgcacgt getgcacagc gccccagacg tgcaggactg ccccgagtgc	120
accctgcagg agaaccatt ettcagccag cccggagccc ccatcctgca gtgcatgggc	180
tgctgcttca gcagggccta cccaccccc ctgaggagca agaagaccat gctggtgcag	240
aagaacgtga ccagcgagag cacctgctgc gtggccaaga gctacaacag ggtgaccgtg	300
atgggcggct tcaaggtgga gaaccacacc gctgcccact gcagcacctg ctactaccac	360
aagagctaat ga	372