



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 271 T2** 2007.11.22

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 017 817 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 271.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/19772**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 948 422.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/015665**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.09.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **01.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **07.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.11.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/16** (2006.01)

**C07K 14/59** (2006.01)

**A61K 38/24** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**939472**                      **22.09.1997**                      **US**

(73) Patentinhaber:

**University of Maryland, Baltimore, Baltimore, Md.,  
US**

(74) Vertreter:

**Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183  
Wiesbaden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**WEINTRAUB, Bruce D., Rockville, MD 20852, US;  
SZKUDLINSKI, Mariusz W., Potomac, MD 20854,  
US**

(54) Bezeichnung: **Mutanten des Thyroid-stimulierenden Hormons**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

## 1. GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Mutanten des schilddrüsenstimulierenden Hormons und Derivate und Analoge davon. Verfahren zur Herstellung von mutanten schilddrüsenstimulierenden Hormonen, Derivaten und Analogen davon werden ebenfalls bereitgestellt. Weiterhin betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen und Verfahren zur Diagnose und Behandlung.

## 2. HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Die Glycoproteinhormone sind eine Gruppe von entwicklungsgeschichtlich konservierten Hormonen, die an der Regulierung der Reproduktion und des Stoffwechsels beteiligt sind (Pierce und Parsons 1981, *Endocr. Rev.* 11: 354385). Die Familie der Hormone umfasst das follikelstimulierende Hormon (FSH), das luteinisierende Hormon (LH), das schilddrüsenstimulierende Hormon (TSH) und chorionisches Gonadotrophin (CG).

**[0003]** TSH ist ein 28–30 kDa heterodimeres Glycoprotein, das in den thyrotrophen Zellen der vorderen Hypophysendrüse produziert wird. Die Unterschiede im Molekulargewicht von TSH beruhen hauptsächlich auf der Heterogenität der Kohlenhydratketten. Seine Synthese und Sekretion werden durch das Thyrotropin-freisetzende Hormon stimuliert und durch Schilddrüsenhormon in einer klassischen endokrinen negativen Rückkopplungsschleife gehemmt. TSH kontrolliert die Schilddrüsenfunktion durch Wechselwirkung mit dem G-Protein-gekoppelten TSH-Rezeptor (TSHR) (Vassant und Dumont, 1992, *Endocr. Rev.* 13: 596–611). TSH, das an seinen Rezeptor auf den Thyrozyten bindet, führt zur Stimulierung von Second-Messenger-Pfaden, an denen überwiegend zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) beteiligt sind, und schließlich zur Modulation der thyroidalen Genexpression. Die physiologischen Rollen von TSH umfassen die Stimulierung differenzierter Schilddrüsenfunktionen, wie Jodaufnahme und Organifikation, die Freisetzung von Thyroidhormon aus der Schilddrüse und die Beschleunigung des Thyroidwachstums (Wondisford et al., 1996; Thyrotropin. In: Braveman et al. (Hrsg.), *Werner und Ingbar's The Thyroid*, Lippencott-Raven, Philadelphia, S. 190–207).

**[0004]** Strukturell sind die Glycoproteinhormone verwandte Heterodimere, die aus einer allgemeinen  $\alpha$ -Untereinheit und einer hormonspezifischen  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Die allgemeine humane  $\alpha$ -Untereinheit enthält einen Apoproteinkern von 92 Aminosäuren, der 10 Halbcysteinreste einschließt, wovon alle Disulfid-verknüpft sind. Sie wird durch ein einziges Gen codiert, das auf dem Chromosom 6 bei Menschen lokalisiert ist und das somit in der Aminosäuresequenz innerhalb einer gegebenen Spezies identisch ist (Fiddes und Goodman, 1981, *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 3–18). Die hormonspezifischen  $\beta$ -Untereinheitsgene unterscheiden sich in Länge, struktureller Organisation und chromosomaler Lokalisation. (Shupnik et al., 1989, *Endocr. Rev.* 10: 459–475). Das humane TSH- $\beta$ -Untereinheitsgen prädiert ein reifes Protein von 118 Aminosäureresten und ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert (Wondisford et al., supra). Die verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten können gemäß 12 Invarianten Halbcysteinresten, die 6 Disulfidbindungen ausbilden, aneinandergereiht sein. Trotz einer Aminosäuresequenzidentität von 30–80 % unter den Hormonen ist die  $\beta$ -Untereinheit distinkt genug, um ein differenzielles Rezeptorbinden mit hoher Spezifität zu steuern (Pierce und Parsons, supra).

**[0005]** Eine wichtige strukturelle Komponente dieser Hormone ist ihre Kohlenhydratgruppierung, die 15–35 Gew.-% ausmacht. Die allgemeine  $\alpha$ -Untereinheit besitzt zwei und die  $\beta$ -Untereinheit eine (in TSH und LH) oder zwei (in CG und FSH) Asparagin-(N)-verknüpfte Oligosaccharide. Zusätzlich besitzt die CG- $\beta$ -Untereinheit ein einziges aus 32 Resten bestehendes carboxylterminales Verlängerungspeptid (CTEP) mit vier Serin-(O)-verknüpften Glycosylierungsstellen (Baenziger, 1994, *Glycosylation and glycoprotein hormone function*, in Lustbander et al. (Hrsg.) *Glycoprotein Hormones: Structure, Function and Clinical Implications*, Springer-Verlag, New York, Seiten 167–174).

**[0006]** Traditionsgemäß wurden Struktur-Funktionsbeziehungen von humanen Glycoproteinhormonen bisher überwiegend mit Gonadotropinen, insbesondere hCG, durchgeführt. Unlängst wurde die Kristallstruktur von partiell deglycosyliertem hCG aufgelöst, was zwei relevante Strukturmerkmale ergab, die auch für die anderen Glycoproteinhormone von Relevanz sein können (Laphora et al., 1994, *Nature* 369: 455–461; Wu et al., 1994, *Structure* 2: 548–558). Sowohl die  $\alpha$ -Untereinheit als auch die hCG  $\beta$ -Untereinheit weisen eine ähnliche Gesamttopologie auf – jede Untereinheit weist zwei  $\beta$ -Haarnadelschleifen (L1 und L3) auf einer Seite eines zentralen Cystein-Knotens (gebildet durch drei Disulfidbindungen) und eine lange Schleife (L2) auf der anderen Seite auf.

**[0007]** Molekularbiologische Studien an humanem TSH wurden durch das Klonieren von TSH- $\beta$ -Untereinheit-cDNA und des -Gens (Joshi et al., 1995, *Endocrinol.* 136: 3839–3848), das Klonieren von TSH-Rezeptor-cDNA (Parmentier et al., 1989, *Science* 246: 1620–1622; Nagayama et al., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 394–403) und durch die rekombinante Expression von TSH (Cole et al., 1993; *Bio/Technol.* 11: 1014–1024; Grossmann et al., 1995, *Mol. Endocrinol.* 9: 948–958; Szkudlinski et al., 1996, *supra*) erleichtert. Bisherige Struktur-Funktionsuntersuchungen in TSH haben sich hauptsächlich auf die hochkonservierten Regionen und die Erzeugung von chimären Untereinheiten konzentriert. Diese Ansätze führten allerdings nicht zu Hormonen mit erhöhter in vitro Bioaktivität (Grossmann et al., 1997, *Endocr. Rev.* 18: 476–501).

**[0008]** Es wurden Strategien zur Verlängerung der hormonellen Halbwertszeit von Glycoprotein-hormonen in der Zirkulation entwickelt. In Genfusionsexperimenten wurde das Carboxy-terminale Verlängerungspeptid der hCG- $\beta$ -Untereinheit, das mehrere O-verknüpfte Kohlenhydrate enthält, an die humane TSH- $\beta$ -Untereinheit adiert (Joshi et al., 1995, *Endocrinol.* 136: 3839–3848; Grossmann et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 21312–21316). Obgleich die in vitro Aktivität dieser Chimäre nicht verändert wurde, war ihre zirkulatorische Halbwertsdauer verlängert, was zu einer erhöhten in vivo Bioaktivität führte. Zusätzlich verbesserte die Expression der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Untereinheiten, die genetisch als eine einzige Kette fusioniert waren, die Stabilität und eine verlängerte Plasma-Halbwertsdauer im Vergleich zu dem Wildtyp-Glycoprotein-hormon (Sugahara et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2041–2045; Grossmann et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 21312–21316).

## 2.1 VERWENDUNG VON TSH BEI DER DIAGNOSE UND BEIM MONITORING VON THYROIDKARZINOMEN

**[0009]** Rekombinantes TSH wurde auf die Stimulierung der  $^{131}\text{I}$ -Aufnahme und der Tg-Sekretion bei der Diagnose und Follow-up-Behandlung von 19 Patienten mit differenzierten Thyroidkarzinomen untersucht, wodurch die Nebenwirkungen des Thyroidhormon-Entzugs vermieden wurden (Meier et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 188–196). Die vorläufigen Ergebnisse aus dem ersten Versuch sind sehr ermutigend. Die Inzidenz des Thyroidkarzinoms in den USA beträgt etwa 14000 Fälle pro Jahr. Der größte Teil hiervon ist differenziert, und papilläre oder follikuläre Krebse sind die häufigsten Subtypen. Da die 10- und 20-jährige Überlebensrate von solchen differenzierten Thyroidkarzinomen 90 bzw. 60 % beträgt, wird das Langzeit-Monitoring zum Nachweis lokaler Rezidive und entfernter Metastasen beim Umgang mit solchen Patienten essentiell, insbesondere da der Tumor auch Jahrzehnte nach der Primärtherapie wieder auftreten kann. Die Hauptverfahren, die als Follow-up-Behandlung eingesetzt werden, sind Ganzkörper-Radioiod-Scanning und Serum-Thyroglobulin-(Tg)-Messungen. Zur optimalen Empfindlichkeit dieser Diagnoseverfahren ist die Stimulierung von residualem Thyroidgewebe durch TSH zur Steigerung der  $^{131}\text{I}$ -Aufnahme bzw. Tg-Sekretion erforderlich. Allerdings werden Post-Thyroidektomie-Thyroidkrebspatienten mit Thyroidhormon behandelt, um endogenes TSH zu unterdrücken, um potentielle stimulatorische Effekte von TSH auf residuales Thyroidgewebe zu vermeiden sowie Euthyroidismus beizubehalten. Darum wird levo- $\text{T}_4$  oder das nicht so oft verwendete  $\text{T}_3$  4–6 und 2 Wochen vor dem Radioiod-Scanning und der Tg-Bestimmung entzogen, um die endogene TSH-Sekretion zu stimulieren. Der damit verbundene vorübergehende, jedoch schwere Hypothyroidismus führt zu einer beträchtlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität solcher Patienten und kann ihre Arbeitsfähigkeit beeinflussen. Da TSH zudem als Wachstumsfaktor für malignes Thyroidgewebe wirken kann, können verlängerte Zeiträume einer erhöhten endogenen TSH-Sekretion ein potentielles Risiko für solche Patienten darstellen.

**[0010]** In den 60er Jahren wurde Rinder-TSH (bTSH) zur Stimulierung von residualem Thyroidgewebe verwendet, um das Erfordernis nach Erhöhung des endogenen TSH zu beheben (Blahd et al., 1960, *Cancer* 13: 745–756). Mehrere Nachteile wurden allerdings bald offensichtlich, die zum Absetzen seiner Verwendung in der klinischen Praxis führten. Im Vergleich zum Hormonentzug erwies sich bTSH beim Nachweis von residualem malignem Thyroidgewebe und von Metastasen als weniger wirksam. Zusätzlich wurden häufig allergische Reaktionen sowie die Entwicklung neutralisierender Antikörper, die die Wirkung einer späteren bTSH-Verabreichung weiter einschränken können, sowie Interferenz mit endogenen TSH-Bestimmungen erkannt (Braverman et al., 1992, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74: 1135–1139).

**[0011]** Aus diagnostischer oder therapeutischer Sicht besteht somit ein beträchtliches Interesse an der Entwicklung von neuen hTSH-Analogen mit wünschenswerten Eigenschaften. Die Hormonaktivität im Allgemeinen kann durch die Verlängerung der hormonellen Halbwertsdauer (lang wirkende Analoge) oder durch Erhöhung seiner natürlichen Aktivität (superaktive Analoge) gesteigert werden. Die vorliegenden Erfinder haben mutantes TSH und Analoge hergestellt und zeigten, dass diese neuen Moleküle in vitro und in vivo Bioaktivität besitzen, welche diejenige des Wildtyp-TSH übersteigt. Ihre Entdeckung wird hier im Folgenden beschrieben.

## 3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0012]** Die vorliegende Erfindung betrifft Mutanten des schilddrüsenstimulierenden Hormons (TSH), einschließlich von Mutanten der  $\alpha$ -Untereinheit, die Glycoproteinhormonen gemeinsam ist, vorzugsweise TSH-Heterodimere mit mutanten Untereinheiten mit einer oder mehreren Substitutionen von Aminosäureresten und/oder TSH-Heterodimere, die modifiziert wurden (wie hier im Folgenden beschrieben), um die in vivo Halbwertsdauer zu erhöhen. Die mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten und die mutanten TSH-Heterodimere sind hinsichtlich des TSH-Rezeptor-(TSHR)-Bindens und der Stimulierung der TSHR-Signaltransduktion aktiver als das Wildtyp-TSH und besitzen eine verlängerte hormonelle Halbwertsdauer in der Zirkulation.

**[0013]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein mutantes TSH mit einer Substitution nach Lysin, Arginin oder Histidin an der Aminosäureposition 22 der  $\alpha$ -Untereinheit und an den Aminosäurepositionen, die in der Nähe oder innerhalb der  $\beta$ -Haarnadel-L3-Schleife der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert sind, bereit, und am stärksten bevorzugt wird das mutante TSH modifiziert, um die in vivo Halbwertsdauer zu erhöhen, beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, Fusionieren der TSH- $\beta$ -Untereinheit mit dem Carboxy-terminalen Verlängerungspeptid (CTEP) der humanen chorionischen Gonadotropin-(hCG)- $\beta$ -Untereinheit und/oder Fusionieren der mutanten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, um ein einkettiges TSH-Analoges zu erzeugen.

**[0014]** Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit des TSH-Heterodimers mit einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit mit einer Aminosäuresubstitution zu Lysin, Arginin oder Histidin an Position 22 der humanen  $\alpha$ -Untereinheit, wie sie in [Fig. 1](#) beschrieben ist (SEQ ID NO:1), bereit.

**[0015]** Ebenfalls bereitgestellt werden Nukleinsäuresequenzen, die die Substitutionsmutanten der  $\alpha$ -Untereinheit, wie sie in den beigefügten Ansprüchen ausgeführt ist, codieren.

**[0016]** Die vorliegende Offenbarung stellt Verfahren zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung von mutanten TSH und von TSH-Analogen, TSH-Derivaten und Fragmenten davon bei Hypothyroidismus und Krebs, insbesondere bei Schilddrüsenkarzinom, bereit. Mutantes TSH wird zur Stimulierung der radioaktiven Iodaufnahme und der Thyroglobulinsekretion bei der Diagnose und beim Follow-up-Monitoring von Patienten mit Schilddrüsenkrebs eingesetzt. Die erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimere können bei TSH-Rezeptorbindungs-Hemmtests verwendet werden, um die Gegenwart von Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor, z. B. für TSHR-Auto-Antikörper, die für Krankheiten und Störungen, wie die Graves-Krankheit, jedoch nicht darauf beschränkt, charakteristisch sind, nachzuweisen. Pharmazeutische und diagnostische Zusammensetzungen, die mutantes TSH enthalten, werden ebenfalls bereitgestellt.

## 3.1 DEFINITIONEN

**[0017]** Wie hier verwendet, sollen die folgenden Begriffe die angegebenen Bedeutungen besitzen:

TSH	= humanes schilddrüsenstimulierendes Hormon, es sei denn, die Spezies ist anderweitig angegeben
TSHR	= humanes schilddrüsenstimulierender Hormonrezeptor, es sei denn, die Spezies ist anderweitig angegeben
hCG	= humanes chorionisches Gonadotropin
CTEP	= Carboxylterminales Verlängerungspeptid der hCG- $\beta$ -Untereinheit
$\alpha$ -Untereinheit	= allgemeine humane Glycoproteinhormon- $\alpha$ -Untereinheit, wenn nicht anderweitig angegeben
$\beta$ -Untereinheit	= humane TSH- $\beta$ -Untereinheit, wenn nicht anderweitig angegeben.

**[0018]** Die herkömmlichen Einbuchstabencodes werden zur Bezeichnung der Aminosäurereste verwendet.

**[0019]** Wie hier verwendet, werden Mutationen in den TSH-Untereinheiten durch die TSH-Untereinheit, gefolgt von dem Wildtyp-Aminosäurerest, der Aminosäureposition und dem mutanten Aminosäurerest bezeichnet. Beispielsweise soll  $\beta$ 158R eine Mutation von Isoleucin nach Arginin an Position 58 in der humanen TSH- $\beta$ -Untereinheit bedeuten.

## 4. BESCHREIBUNG DER FIGUREN

**[0020]** [Fig. 1](#). Aminosäuresequenz (SEQ ID NO:1) der allgemeinen humanen Glycoproteinhormon- $\alpha$ -Untereinheit

nheit. Die Aminosäurereste (Positionen 8–30), die in oder in der Nähe der  $\alpha$ L1-Schleife lokalisiert sind, werden durch eine Linie über der Sequenz angegeben. Die Zahlen über der Sequenz geben die Aminosäurepositionen an, an denen eine Mutation bevorzugt ist.

[0021] [Fig. 2](#). Aminosäuresequenz (SEQ ID NO:2) der humanen TSH- $\beta$ -Untereinheit. Die Aminosäurereste (Positionen 52–87), die in oder nahe der  $\beta$ L3-Schleife lokalisiert sind, werden durch eine Linie über der Sequenz angegeben. Die Zahlen über der Sequenz geben die Aminosäurepositionen an, an denen eine Mutation bevorzugt ist.

[0022] [Fig. 3](#). Aminosäuresequenz der hCG- $\beta$ -Untereinheit. Die Aminosäurereste des CTEP werden durch eine Unterstreichung angegeben.

[0023] [Fig. 4](#). Stimulation der cAMP-Produktion in CHO-JP26-Zellen durch ein mutantes TSH-Heterodimer (ausgefüllte Dreiecke), das eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit mit der Mutation  $\alpha$ G22R und eine Wildtyp- $\beta$ -Untereinheit umfasst; und durch Wildtyp-TSH (ausgefüllte Kreise).

[0024] [Fig. 5](#). Stimulation der cAMP-Produktion in JP09-Zellen durch das mutante TSH-Heterodimer, das eine  $\alpha$ 4K-Untereinheit mit den Mutationen  $\alpha$ O13K+ $\alpha$ E14K+ $\alpha$ P16K+ $\alpha$ O20K und ein Fusionsprotein der  $\beta$ -Untereinheit und des CTEP umfasste ( $\alpha$ 4K +  $\beta$ CTEP; Rechtecke mit Kreuz), durch das mutante TSH-Heterodimer, das die  $\alpha$ O13K+ $\alpha$ E14K+ $\alpha$ P16K+ $\alpha$ O20K-Mutationen und eine Wildtyp-TSH- $\beta$ -Untereinheit umfasste ( $\alpha$ 4K, nicht-ausgefüllte Quadrate); und durch Wildtyp-TSH (ausgefüllte Kreise).

[0025] [Fig. 6](#). Mutationen in der  $\beta$ L1-Schleife der TSH-spezifischen  $\beta$ -Untereinheit. Der Liniengraph erläutert, dass  $\beta$ 13E und  $\beta$ R14E keine biologischen Aktivitäten aufwiesen, die im Wesentlichen unterschiedlich von Wildtyp-TSH waren, dass allerdings Heterodimere, die eine der  $\beta$ F1R-,  $\beta$ E6N- oder  $\beta$ A17R-mutanten Untereinheiten einschlossen, bei dem Standard-in vitro-Test auf cAMP-Produktion wesentlich höhere biologische Aktivitäten aufwiesen.

[0026] [Fig. 7](#). Die Kombinationen von Mutationen in der TSH-spezifischen  $\beta$ -Untereinheit zeigten Hormonaktivitäten, die bei dem Standard-in vitro-Test auf cAMP-Produktion im Wesentlichen größer waren als bei Wildtyp-TSH. Mutante Heterodimere umfassten entweder die Kombination von  $\beta$ F1R- und  $\beta$ E6N-Mutationen oder die Kombination von  $\beta$ F1R-,  $\beta$ E6N- oder  $\beta$ A17R-Mutationen.

[0027] [Fig. 8A–Fig. 8B](#) Liniengraph, der die in vivo Aktivität von hTSH-Analogen zeigt. [Fig. 8A](#) zeigt die T4-Spiegel im Blut von zuvor T3-supprimierten Mäusen 6 h nach intraperitonealer Injektion von entweder hTSH-Wildtyp (hTSH-wt) oder von TSH-Analogen. Die Werte sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Durchschnitts von 5 Mäusen für jeden Messpunkt. [Fig. 8B](#) ist ein Balkendiagramm, das für die einzelnen Konstrukte die Verhältnisse von Gesamt-T4 zu TSH zeigt. Die Einheiten wurden durch Division des Serum-Mittelwerts für Gesamt-T4 ( $\mu$ g/dl) durch den Serum-Mittelwert für hTSH (ng/ml) erhalten, die 6 h nach intraperitonealer Injektion bestimmt wurden. Die Rückgewinnung von 200 oder 20 ng injiziertem Material 6 Stunden nach der intraperitonealen Injektion war vergleichbar (2%, 1 % und 1 % für Wildtyp,  $\alpha$ 4K bzw.  $\alpha$ 4k/ $\beta$ 3R).

## 5. AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0028] Die vorliegende Erfindung betrifft neue mutante TSH-Proteine und Nukleinsäuremoleküle, die mutante TSH- $\alpha$ -Untereinheiten codieren. Die vorliegenden Erfinder haben schilddrüsenstimulierende Hormone (TSH) konstruiert und hergestellt, die sowohl Aminosäuresubstitutionen in der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aufweisen, die die Bioaktivität des TSH-Heterodimers, das aus diesen Untereinheiten besteht, relativ zu der Bioaktivität von Wildtyp-TSH erhöhen als auch modifiziert sind, um die hormonelle Halbwertsdauer in der Zirkulation zu erhöhen. Die vorliegenden Erfinder haben festgestellt, dass diese Mutationen zur Erhöhung der Bioaktivität und die Strategien zur Steigerung der hormonellen Halbwertszeit synergistisch wirken, derart, dass TSH-Heterodimere, die sowohl die superaktiven Mutationen als auch die lang wirkenden Modifikationen aufweisen, eine viel höhere Bioaktivität besitzen, als es aus der Summe der additiven Aktivität erwartet werden würde, zu der die superaktiven Mutationen und die lang wirkenden Mutationen einzeln beitragen.

[0029] Die vorliegenden Erfinder haben festgestellt, dass eine Aminosäuresubstitution an der Aminosäure 22 der humanen  $\alpha$ -Untereinheit (wie in [Fig. 1](#) (SEQ ID NO:1) gezeigt), vorzugsweise eine Substitution einer basischen Aminosäure, wie Lysin oder Arginin, stärker bevorzugt Arginin, die Bioaktivität von TSH relativ zu Wildtyp-TSH erhöht.

**[0030]** Die vorliegenden Erfinder haben mutante Untereinheiten durch Kombinieren einzelner Mutationen innerhalb einer einzigen Untereinheit und Modifizieren der Untereinheiten und Heterodimere, um die Halbwertsdauer des Heterodimers in vivo zu erhöhen (wie hier im Folgenden beschrieben), konstruiert. Insbesondere haben die Erfinder mutante  $\alpha$ -, mutante  $\beta$ -, mutante TSH-Heterodimere mit Mutationen, insbesondere Mutationen in speziellen Domänen, konstruiert. Diese Domänen umfassen die  $\beta$ -Haarnadel-L1-Schleife der allgemeinen  $\alpha$ -Untereinheit (wie in [Fig. 1](#) beschrieben) und die  $\beta$ -Haarnadel-L3-Schleife der TSH- $\beta$ -Untereinheit (wie sie in [Fig. 2](#) beschrieben ist). Bei einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit und TSH-Heterodimere bereit, umfassend eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit, wobei die mutante  $\alpha$ -Untereinheit eine Substitution an Position 22 zu Lysin, Arginin oder Histidin umfasst, und wobei diese mutante  $\beta$ -Untereinheit einzelne oder mehrere Aminosäuresubstitutionen umfasst, die vorzugsweise in oder nahe der  $\beta$ -Haarnadel-L3-Schleife der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert sind (vorzugsweise erhöhen diese Mutationen die Bioaktivität des TSH-Heterodimers, das die mutante Untereinheit umfasst, und das TSH-Heterodimer mit der mutanten Untereinheit wurde ebenfalls modifiziert, um die Serum-Halbwertsdauer relativ zu dem Wildtyp-TSH-Heterodimers zu erhöhen).

**[0031]** Erfindungsgemäß kann eine mutante  $\beta$ -Untereinheit, die einzelne oder mehrere Aminosäuresubstitutionen umfasst, die vorzugsweise in oder nahe der  $\beta$ -Haarnadel-L3-Schleife der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert sind, an ihrem Carboxyterminus mit CTEP fusioniert werden. Eine solche mutante  $\beta$ -Untereinheit-CTEP-Untereinheit kann mit entweder einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit unter Bildung eines funktionellen TSH-Heterodimers, welches eine Bioaktivität und eine Serum-Halbwertsdauer besitzt, die größer sind als die von Wildtyp-TSH, co-exprimiert und/oder zusammengebaut werden.

**[0032]** Bei einer anderen Ausführungsform werden eine mutante  $\beta$ -Untereinheit, die einzelne oder mehrere Aminosäuresubstitutionen umfasst, die vorzugsweise in oder in der Nähe der  $\beta$ -Haarnadel-L3-Schleife der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert sind, und eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit, die eine Substitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin umfasst, unter Bildung eines einkettigen TSH-Analogs fusioniert. Eine solche mutante  $\beta$ -Untereinheit-mutante- $\alpha$ -Untereinheit-Fusion besitzt eine Bioaktivität und eine Serum-Halbwertsdauer, die größer sind als diejenigen von Wildtyp-TSH.

**[0033]** Bei wieder einer anderen Ausführungsform werden die mutante  $\beta$ -Untereinheit, die einzelne oder mehrere Aminosäuresubstitutionen umfasst, die vorzugsweise in oder in der Nähe der  $\beta$ -Haarnadel-L3-Schleife der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert sind, und die weiterhin das CTEP im Carboxyterminus einschließt, und eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit, die eine Substitution in Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin umfasst, unter Bildung eines einkettigen TSH-Analogs fusioniert.

**[0034]** Nukleinsäuremoleküle, die solche Proteine und mutante  $\alpha$ -Untereinheiten codieren, werden ebenfalls bereitgestellt.

**[0035]** Bei bestimmten Aspekten stellt die Erfindung Aminosäuresequenzen der mutanten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bereit.

**[0036]** Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin Nukleinsäuresequenzen bereit, die die mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten codieren. Die Mutationen in den  $\alpha$ -Untereinheiten werden ausführlicher in Abschnitt 5.1 bzw. 5.2, hier im Folgenden, beschrieben.

**[0037]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch therapeutische und diagnostische Zusammensetzungen auf der Grundlage von mutanten TSH-Heterodimeren. Auch diagnostische Kits werden erfindungsgemäß bereitgestellt.

**[0038]** Zur Klarheit der Offenbarung und nicht einschränkend wird die ausführliche Beschreibung der Erfindung in die folgenden Unterabschnitte eingeteilt.

### 5.1 MUTANTEN DER ALLGEMEINEN $\alpha$ -UNTEREINHEIT

**[0039]** Die allgemeine humane  $\alpha$ -Untereinheit der Glycoprotein hormone enthält 92 Aminosäuren, wie es in [Fig. 1](#) (SEQ ID NO:1) beschrieben ist, einschließlich von 10 Halbcysteinresten, wovon alle sich in Disulfid-Verknüpfungen befinden. Die Erfindung betrifft Mutanten der  $\alpha$ -Untereinheit von humanen Glycoprotein hormones, wobei die Untereinheit eine Substitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin umfasst. Die Aminosäurereste, die in oder nahe der  $\alpha$ L1-Schleife lokalisiert sind, ausgehend von Position 8–30, wie es in [Fig. 1](#) beschrieben ist, werden bei der Wirkung der Rezeptorbindung und der Signaltransduktion als wichtig befunden.

den. Die Aminosäurereste, die in der  $\alpha$ L1-Schleife lokalisiert sind, wie diejenigen an Position 11–22, bilden ein Cluster basischer Reste in sämtlichen Vertebraten, ausschließlich von Hominoiden, und besitzen die Fähigkeit zur Beschleunigung der Rezeptorbindung und der Signaltransduktion. Insbesondere wird festgestellt, dass der Aminosäurerest an Position 22 einer der Reste ist, die die Wirksamkeit von TSH beeinflussen.

**[0040]** Erfindungsgemäß weisen die mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten eine Substitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin auf.

**[0041]** Bei einer Ausführungsform weisen die mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten eine oder mehrere zusätzliche Substitutionen von Aminosäureresten relativ zu der Wildtyp- $\alpha$ -Untereinheit.

**[0042]** Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung weist die mutante  $\alpha$ -Untereinheit eine einzige zusätzliche Aminosäuresubstitution an den Positionen 11, 13, 14, 16, 17 oder 20 der  $\alpha$ -Untereinheitssequenz auf. Bei wieder einer anderen Ausführungsform der Erfindung weist die mutante  $\alpha$ -Untereinheit mehrere zusätzliche Aminosäuresubstitutionen in den Aminosäureresten auf, die unter den Resten an den Positionen 11, 13, 14, 16, 17 oder 20 der  $\alpha$ -Untereinheitssequenz ausgewählt sind.

**[0043]** Bei verschiedenen Ausführungsformen wird die Aminosäuresubstitution mit einem positiv geladenen Rest oder mit einem basischen Rest aus der Gruppe, bestehend aus Lysin, Arginin, und weniger bevorzugt Histidin, vorgenommen.

**[0044]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße mutante  $\alpha$ -Untereinheit eine einzige Aminosäuresubstitution an Position 22 auf, wobei ein Glycinrest mit einem Arginin substituiert ist, d. h.  $\alpha$ G22R. Eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit mit der  $\alpha$ G22R-Mutation kann mindestens eine oder mehrere zusätzliche Aminosäuresubstitutionen aufweisen, wie, jedoch nicht beschränkt auf,  $\alpha$ T11K,  $\alpha$ O13K,  $\alpha$ E14K,  $\alpha$ P16K,  $\alpha$ F17R und  $\alpha$ O20K. Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen besitzt die mutante  $\alpha$ -Untereinheit eine, zwei, drei, vier oder mehrere zusätzliche Aminosäuresubstitutionen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus  $\alpha$ T11K,  $\alpha$ O13K,  $\alpha$ E14K,  $\alpha$ P16K,  $\alpha$ F17R und  $\alpha$ O20K.

**[0045]** Die erfindungsgemäßen mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten sind funktionell aktiv, d. h. sie sind in der Lage, eine oder mehrere funktionelle Aktivitäten aufzuzeigen, die mit der Wildtyp- $\alpha$ -Untereinheit zusammenhängen. Vorzugsweise ist die mutante  $\alpha$ -Untereinheit zum nicht-kovalenten Assoziieren mit einer Wildtyp- oder mutanten  $\beta$ -Untereinheit unter Bildung eines TSH-Heterodimers, das an den TSHR bindet, in der Lage. Vorzugsweise löst ein solches TSH-Heterodimer auch die Signaltransduktion auf. Besonders bevorzugt besitzt ein solches TSH-Heterodimer, das eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit umfasst, eine in vitro Bioaktivität und/oder in vivo Bioaktivität, die größer ist als die von Wildtyp-TSH. Bei der vorliegenden Erfindung wird davon ausgegangen, dass mehr als eine Mutation innerhalb einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit kombiniert werden kann, um eine superaktive  $\alpha$ -Mutante herzustellen, die in Assoziation mit einer Wildtyp- oder mutanten  $\beta$ -Untereinheit ein TSH-Heterodimer bildet, das relativ zu dem Wildtyp-TSH eine signifikante Zunahme in der Bioaktivität aufweist. Es wird auch davon ausgegangen, dass die  $\alpha$ -Untereinheit-Mutationen mit Strategien kombiniert werden, um die Serum-Halbwertsdauer des TSH-Heterodimers mit der mutanten  $\alpha$ -Untereinheit (d. h. ein TSH-Heterodimer mit einer  $\beta$ -Untereinheit-CTEP-Fusion oder einer  $\beta$ -Untereinheit- $\alpha$ -Untereinheit-Fusion) zu erhöhen. Die Mutationen innerhalb einer Untereinheit und die lang wirkenden Modifikationen wirken synergistisch, um eine unerwartete Zunahme in der Bioaktivität hervorzuführen.

**[0046]** Als weiteres Beispiel können solche mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten, die die gewünschte Immunogenizität oder Antigenizität aufweisen, beispielsweise in Immuntests, zur Immunisierung, zur Hemmung der TSHR-Signaltransduktion etc. eingesetzt werden. Die mutante  $\alpha$ -Untereinheit kann durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahrensweisen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, die in Abschnitt 5.8 beschriebenen Tests, auf die gewünschte Aktivität getestet werden.

## 5.2 MUTANTEN DER TSH- $\beta$ -UNTEREINHEIT

**[0047]** Die allgemeine humane  $\beta$ -Untereinheit der Glycoprotein hormone enthält 118 Aminosäuren, wie es in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO:2) beschrieben ist. Die Erfindung betrifft Mutanten der  $\beta$ -Untereinheit von TSH, wobei die Untereinheit einzelne oder mehrere Aminosäuresubstitutionen einschließt, die vorzugsweise in oder nahe der  $\beta$ -Haarnadel-L3-Schleife der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert sind, wo solche mutanten  $\beta$ -Untereinheiten Teil eines TSH-Heterodimers mit einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit mit einer Aminosäuresubstitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin (wie es in [Fig. 1](#) (SEQ ID NO:1) beschrieben ist) einschließen. Die in oder nahe der  $\beta$ L3-Schleife an den Positionen 52–87 der humanen TSH- $\beta$ -Untereinheiten lokalisierten Aminosäurereste wer-

den auf die Aminosäurereste in hCG kartiert, die peripher lokalisiert und anscheinend an der Oberfläche der Kristallstruktur exponiert sind. Von besonderem Interesse ist ein Cluster basischer Reste in hCG, welches in TSH nicht vorhanden ist (ausgehend von Position 58–69). Die Substitution von basischen oder positiv geladenen Resten in dieser Domäne des humanen TSH führt zu einer zusätzlichen und wesentlichen Zunahme in der TSHR-Bindungsaffinität sowie in der natürlichen Aktivität.

**[0048]** Die erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimere besitzen  $\beta$ -Untereinheiten mit Substitutionen, Deletionen oder Insertionen von ein, zwei, drei, vier oder mehreren Aminosäureresten in der Wildtyp-Untereinheit und einer  $\alpha$ -Untereinheit mit einer Substitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin.

**[0049]** Bei einer Ausführungsform besitzt die mutante  $\beta$ -Untereinheit in dem TSH-Heterodimer eine oder mehrere Substitutionen von Aminosäureresten relativ zu der Wildtyp- $\beta$ -Untereinheit, vorzugsweise eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen in den Aminosäureresten, ausgewählt aus den Resten an Position 52–87, 52–69, 58–69 oder 58–87, der  $\beta$ -Untereinheit, wie es in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO:2) beschrieben ist. Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung besitzt die mutante  $\beta$ -Untereinheit in dem TSH-Heterodimer eine einzige Aminosäuresubstitution an Position 58, 63 oder 69 der  $\beta$ -Untereinheitssequenz, wie es in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO:2) beschrieben ist. Bei wieder einer anderen Ausführungsform der Erfindung besitzt die mutante  $\beta$ -Untereinheit in dem TSH-Heterodimer mehrere Aminosäuresubstitutionen in den Aminosäureresten, ausgewählt aus Resten an den Positionen 58, 63 oder 69 der  $\beta$ -Untereinheitssequenz, wie sie in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO:2) beschrieben ist.

**[0050]** Bei verschiedenen Ausführungsformen wird die Aminosäuresubstitution mit einem positiv geladenen Rest oder einem basischen Rest aus der Gruppe bestehend aus Lysin, Arginin und, weniger bevorzugt, Histidin, vorgenommen.

**[0051]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform weist die mutante  $\beta$ -Untereinheit in dem TSH-Heterodimer eine, zwei, drei oder mehrere der Aminosäuresubstitutionen auf, die aus der Gruppe bestehend aus  $\beta$ 158R,  $\beta$ E63R und  $\beta$ L69R ausgewählt sind. Beispielsweise umfasst eine der bevorzugten mutanten  $\beta$ -Untereinheiten, die hier auch als  $\beta$ 3R bezeichnet wird, drei Mutationen:  $\beta$ 158R+ $\beta$ E63R+ $\beta$ L69R.

**[0052]** Das erfindungsgemäße mutante TSH mit mutanten  $\beta$ -Untereinheiten besitzt auch eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit mit einer Aminosäuresubstitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin (wie sie in [Fig. 1](#) (SEQ ID NO:1) beschrieben ist) und einer Serum-Halbwertsdauer, die größer ist als diejenige von Wildtyp-TSH. Bei einer Ausführungsform ist eine mutante  $\beta$ -Untereinheit, die eine oder mehrere Substitutionen von Aminosäureresten relativ zu den Wildtyp- $\beta$ -Untereinheiten umfasst, kovalent an das Carboxyl-terminale Verlängerungspeptid (CTEP) von hCG gebunden. Das CTEP, das die Carboxyl-terminalen 32 Aminosäuren der hCG- $\beta$ -Untereinheit (wie sie in [Fig. 3](#) beschrieben ist) umfasst, ist kovalent an die mutante  $\beta$ -Untereinheit gebunden, vorzugsweise ist der Carboxylterminus der mutanten  $\beta$ -Untereinheit kovalent an den Aminosäureterminus von CTEP gebunden. Die  $\beta$ -Untereinheit und das CTEP können kovalent durch jedes auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren gebunden sein, z. B. durch eine Peptidbindung oder durch ein heterobifunktionelles Reagens, das in der Lage ist, eine kovalente Bindung zwischen dem Aminoterminus und dem Carboxylterminus eines Proteins auszubilden, einschließlich beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, einen Peptidlinker. Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die mutante  $\beta$ -Untereinheit und CTEP über eine Peptidbindung verknüpft. Bei verschiedenen bevorzugten Ausführungsformen können die mutanten  $\beta$ -Untereinheit-CTEP-Fusionen eine, zwei, drei oder mehrere der Aminosäuresubstitutionen umfassen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus  $\beta$ 158R,  $\beta$ E63R und  $\beta$ L69R.

**[0053]** Bei einer anderen Ausführungsform ist eine mutante  $\beta$ -Untereinheit fusioniert, d. h. kovalent an eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit (z. B. wie sie in Abschnitt 5.2, supra, beschrieben ist) gebunden.

**[0054]** Vorzugsweise ist die mutante  $\beta$ -Untereinheit zur nicht-kovalenten Assoziation mit einer  $\alpha$ -Untereinheit in der Lage, um ein TSH-Heterodimer auszubilden, das an den TSHR bindet.

**[0055]** Vorzugsweise löst ein solches TSH-Heterodimer auch die Signaltransduktion aus. Besonders bevorzugt besitzt ein solches TSH-Heterodimer, das eine mutante  $\beta$ -Untereinheit und eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit umfasst, eine in vitro Bioaktivität und/oder in vitro Bioaktivität, die größer ist als die Bioaktivität von Wildtyp-TSH. Es wird bei der vorliegenden Erfindung davon ausgegangen, dass mehr als eine Mutation innerhalb einer mutanten  $\beta$ -Untereinheit kombiniert werden kann, um ein mutantes TSH-Heterodimer herzustellen, das eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit umfasst, das eine signifikante Zunahme in der Bioaktivität relativ zu der von Wildtyp-TSH aufweist. Die Erfinder stellten fest, dass mehrere Mutationen innerhalb einer Untereinheit und mehre-

re Modifikationen zur Erhöhung der Halbwertsdauer des TSH-Heterodimers (d. h. die  $\beta$ -Untereinheit-CTEP-Fusion und/oder die  $\beta$ -Untereinheit- $\alpha$ -Untereinheit-Fusion) synergistisch wirken können, um eine Bioaktivität zu erreichen, die größer ist als die Summe der Zunahme der Mutationen und die lang wirkenden Modifikationen.

**[0056]** Die mutante  $\beta$ -Untereinheit kann auf die gewünschte Aktivität durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahrenswesen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, die in Abschnitt 5.8 beschriebenen Tests, getestet werden.

### 5.3 MUTANTE TSH-HETERODIMERE UND TSH-ANALOGE

**[0057]** Die vorliegende Erfindung stellt mutante humane TSH-Heterodimere bereit, umfassend eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit und eine mutante  $\beta$ -Untereinheit, wobei die mutante  $\alpha$ -Untereinheit eine Substitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin einschließt (wie es in Abschnitt 5.1 beschrieben ist) und die mutante  $\beta$ -Untereinheit einzelne oder mehrere Aminosäuresubstitutionen einschließt, die vorzugsweise in oder nahe der  $\beta$ -Haarnadel-L3-Schleife der  $\beta$ -Untereinheit (wie es in Abschnitt 5.2 beschrieben ist) lokalisiert sind, wobei das Heterodimer zur Erhöhung der Serum-Halbwertsdauer modifiziert ist (z. B. durch  $\beta$ -Untereinheit-CTEP-Fusion oder durch  $\alpha$ -Untereinheit- $\beta$ -Untereinheit-Fusion). Die einzelnen oder die mehreren zusätzlichen Aminosäuresubstitutionen in der mutanten  $\alpha$ -Untereinheit können in Aminosäureresten, ausgewählt aus den Positionen 8–30 und vorzugsweise aus den Positionen 11–21 der Aminosäuresequenz der humanen  $\alpha$ -Untereinheit, vorgenommen werden. Die einzelnen oder die mehreren Aminosäuresubstitutionen in der mutanten TSH- $\beta$ -Untereinheit können in Aminosäureresten vorgenommen werden, ausgewählt aus den Positionen 52–87 und vorzugsweise 58–69 der Aminosäuresequenz der humanen TSH- $\beta$ -Untereinheit.

**[0058]** Bei einer Ausführungsform stellt die Erfindung TSH-Heterodimere bereit, umfassend eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit, die eine  $\beta$ -Untereinheit, vorzugsweise eine mutante  $\beta$ -Untereinheit, umfasst, wobei entweder die mutante  $\alpha$ - oder die mutante  $\beta$ -Untereinheit an das CTEP der  $\beta$ -Untereinheit von hCG (wie es in Abschnitt 5.2 beschrieben ist) fusioniert ist. Der Begriff Fusionsprotein bezieht sich hier auf ein Protein, das das Produkt des kovalenten Bindens zweier Peptide ist. Kovalentes Binden umfasst jedes auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren zum Binden von zwei Peptiden kovalent an ihre Amino- bzw. Carboxyl-Termini; solche Verfahren umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Verknüpfen über eine Peptidbindung oder über ein heterobifunktionelles Reagens, beispielsweise, jedoch nicht einschränkend, ein Peptidlinker. Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann das mutante TSH-Heterodimer eine mutante humane  $\alpha$ -Untereinheit und eine mutante humane TSH- $\beta$ -Untereinheit umfassen, wobei die mutante humane TSH- $\beta$ -Untereinheit an ihrem Carboxylterminus kovalent an den Aminoternus von CTEP gebunden ist.

**[0059]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch einkettige humane TSH-Analoga, die eine mutante humane  $\alpha$ -Untereinheit umfassen, die kovalent (wie es vorstehend für die  $\beta$ -Untereinheit-CTEP-Fusion beschrieben ist) an eine mutante humane TSH- $\beta$ -Untereinheit gebunden ist, wobei die mutante  $\alpha$ -Untereinheit eine Substitution in Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin einschließt und die mutante humane TSH- $\beta$ -Untereinheit mindestens eine Aminosäuresubstitution in der Aminosäuresequenz der Untereinheit umfasst. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist die mutante  $\beta$ -Untereinheit über einen Peptidlinker an eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Bei einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist das CTEP von hCG, welches einen hohen Serin/Prolin-Gehalt aufweist und dem eine signifikante Sekundärstruktur fehlt, der Peptidlinker.

**[0060]** Vorzugsweise ist eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit, die einzelne oder mehrere zusätzliche Aminosäuresubstitutionen einschließt, die in oder nahe der  $\beta$ -Haarnadel-L1-Schleife der  $\alpha$ -Untereinheit, (wie es in Abschnitt 5.1, supra beschrieben ist), lokalisiert sind, kovalent an eine mutante  $\beta$ -Untereinheit gebunden, die einzelne oder mehrere Aminosäuresubstitutionen einschließt, die vorzugsweise in oder nahe der  $\beta$ -Haarnadel-L1-Schleife der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert sind (wie es in Abschnitt 5.2, supra beschrieben ist).

**[0061]** Bei einer Ausführungsform ist die mutante humane TSH- $\beta$ -Untereinheit, die mindestens eine Aminosäuresubstitution in den Aminosäureresten, ausgewählt aus den Positionen 52–87, vorzugsweise den Positionen 58–69 der Aminosäuresequenz der humanen TSH- $\beta$ -Untereinheit einschließt, an ihrem Carboxylterminus kovalent mit dem Aminoternus einer mutanten TSH- $\alpha$ -Untereinheit gebunden, die eine Substitution in Position 22 zu Lysin, Arginin oder Histidin umfasst.

**[0062]** Der mutanten  $\alpha$ -Untereinheit oder mutanten humanen TSH- $\beta$ -Untereinheit kann jeweils ihre Signalsequenz fehlen.

**[0063]** Die vorliegende Erfindung stellt auch ein humanes TSH-Analog bereit, das eine mutante humane

TSH- $\beta$ -Untereinheit umfasst, die kovalent an CTEP gebunden ist, welches wiederum kovalent an eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit gebunden ist, wobei die mutante  $\alpha$ -Untereinheit eine Substitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin einschließt und die mutante humane TSH- $\beta$ -Untereinheit mindestens eine Aminosäuresubstitution in der Aminosäuresequenz der Untereinheit einschließt.

**[0064]** Bei einer speziellen Ausführungsform ist eine mutante  $\beta$ -Untereinheit-CTEP-Fusion so an eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit kovalent gebunden, dass der Carboxylterminus der mutanten  $\beta$ -Untereinheit mit dem Aminoterminus der mutanten  $\alpha$ -Untereinheit über das CTEP oder hCG verknüpft ist. Vorzugsweise ist der Carboxylterminus einer mutanten  $\beta$ -Untereinheit kovalent an den Aminoterminus von CTEP gebunden, und der Carboxylterminus des CTEP ist kovalent an den Aminoterminus einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit ohne das Signalpeptid gebunden.

**[0065]** Demnach umfasst bei einer speziellen Ausführungsform das humane TSH-Analog eine mutante humane TSH- $\beta$ -Untereinheit, die mindestens eine Aminosäuresubstitution in Aminosäureresten umfasst, die unter den Positionen 58–69 der Aminosäuresequenz der humanen TSH- $\beta$ -Untereinheit ausgewählt sind, die kovalent an den Carboxylterminus der mutanten humanen TSH- $\beta$ -Untereinheit mit dem Aminoterminus von CTEP gebunden ist, das kovalent an den Carboxylterminus des carboxyterminalen Verlängerungspeptids gebunden ist, wobei der Aminoterminus einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit eine Substitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin einschließt.

**[0066]** Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das mutante TSH-Heterodimer eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit mit einer Aminosäuresubstitution an Position 22 der humanen  $\alpha$ -Untereinheitssequenz (wie in [Fig. 1](#) (SEQ ID NO:1) beschrieben), vorzugsweise eine Substitution mit einer basischen Aminosäure (wie Arginin, Lysin und weniger bevorzugt Histidin), stärker bevorzugt mit Arginin.

**[0067]** Bei speziellen Ausführungsformen ist das mutante TSH-Heterodimer, das mindestens eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit umfasst, oder das Einzelketten-TSH-Analog, wie vorstehend beschrieben, funktionell aktiv, d. h. in der Lage, eine oder mehrere funktionelle Aktivitäten aufzuweisen, die mit dem Wildtyp-TSH zusammenhängen, wie TSHR-Binden, TSHR-Signalisieren und extrazelluläre Sekretion. Vorzugsweise ist das mutante TSH-Heterodimer oder das einkettige TSH-Analog in der Lage, an den TSHR zu binden, vorzugsweise mit einer Affinität, die größer ist als bei Wildtyp-TSH. Es ist auch bevorzugt, dass ein solches mutantes TSH-Heterodimer oder ein Einzelketten-TSH-Analog die Signaltransduktion auslöst. Besonders bevorzugt besitzt das mutante TSH-Heterodimer, das mindestens eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit umfasst, oder das erfindungsgemäße Einzelketten-TSH-Analog eine *in vitro* Bioaktivität und/oder *in vivo* Bioaktivität, die größer ist als bei Wildtyp-TSH und eine längere Serumhalbwertszeit als bei Wildtyp-TSH besitzt. Die erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimere und Einzelketten-TSH-Analoga können durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahrenswegen auf die gewünschte Aktivität getestet werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, die in Abschnitt 5.8 beschriebenen Tests. Arbeitsbeispiele für mutante TSH-Heterodimere sind in Abschnitt 6 beschrieben.

#### 5.4 POLYNUKLEOTIDE, DIE MUTANTES TSH UND -ANALOGUE CODIEREN

**[0068]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle, die Sequenzen umfassen, die die erfindungsgemäßen mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten von humanem TSH codieren, wobei die Sequenzen mindestens eine Basis-Substitution enthalten, die zu einer Substitution an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin führt, relativ zu dem Wildtyp-TSH. Eine Grundmutation, die das Leseraster der codierenden Region nicht ändert, ist bevorzugt. Wie hier verwendet, ist, wenn gesagt wird, dass zwei codierende Regionen fusioniert sind, das 3'-Ende eines Nukleinsäuremoleküls so an das 5'-Ende des anderen Nukleinsäuremoleküls ligiert (oder über eine Nukleinsäure, die einen Peptidlinker codiert), dass die Translation von der codierenden Region des einen Nukleinsäuremoleküls zu dem anderen ohne eine Rasterverschiebung abläuft.

**[0069]** Aufgrund der Degeneration von Nukleinsäure-codierenden Sequenzen können alle anderen DNA-Sequenzen, die die gleiche Aminosäuresequenz für eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit codieren, in der Praxis der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Diese umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Nukleotidsequenzen, die alles oder Teile der codierenden Region der  $\alpha$ -Untereinheit einschließen, die durch Substitution verschiedener Kodons verändert sind, die den gleichen Aminosäurerest innerhalb der Sequenz codieren, und somit eine stumme Änderung erzeugen.

**[0070]** Bei einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung Nukleinsäuremoleküle bereit, die Sequenzen umfassen, die mutante  $\alpha$ -Untereinheiten codieren, wobei die mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten eine Substitution

an Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin umfassen (wie in Abschnitt 5.1 beschrieben). Bei einer speziellen Ausführungsform stellt die Erfindung Nukleinsäuren bereit, die mutante  $\alpha$ -Untereinheiten mit einer Aminosäuresubstitution nach Lysin, Arginin oder Methionin in Position 22 der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Untereinheit codieren, wie in [Fig. 1](#) (SEQ ID NO:1) gezeigt, vorzugsweise Substitution mit Arginin.

**[0071]** Die einkettigen erfindungsgemäßen Analoge können durch Ligation der Nukleinsäuresequenzen, die die mutanten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten codieren, durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren miteinander im richtigen Leserahmen und durch Expression des Fusionsproteins durch allgemein auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren hergestellt werden. Alternativ kann ein solches Fusionsprotein durch Proteinsynthesetechniken, z. B. unter Verwendung eines Peptidsynthesegerätes, hergestellt werden.

## 5.5 HERSTELLUNG VON MUTANTEN TSH-UNTEREINHEITEN UND -ANALOGEN

### 5.5.1 TSH-GEN-KLONIERUNG

**[0072]** Die Nukleotidsequenzen der cDNA und das Gen, das die humane allgemeine  $\alpha$ -Untereinheit (Fiddes und Goodman, 1979, Nature 281: 351–356; Fiddes und Goodman, 1981, J. Mol. Appl. Gen. 1: 3–18) und die humane TSH- $\beta$ -Untereinheit (Hayashizaki et al., 1985, FEBS Lett. 88: 394–400; Wondisford et al., 1988, J. Bio. Chem. 263: 12538–12542; Wondisford et al., 1988, Mel. Endocrinol. 2: 32–39) codiert, sind veröffentlicht.

**[0073]** Die codierenden Regionen für die Untereinheiten können durch auf dem Fachgebiet bekannte Standardvorgehensweisen aus klonierter DNA (z. B. eine DNA-"Bibliothek"), durch chemische Synthese, durch cDNA-Klonieren oder durch das Klonieren von genomischer DNA oder von Fragmenten davon, die aus der gewünschten Zelle gereinigt wurden (siehe beispielsweise Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (Hrsg.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd. Oxford, UK, Bd. I, II), erhalten werden. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) kann zur Amplifikation von Sequenzen verwendet werden, die die allgemeine  $\alpha$ - oder TSH- $\beta$ -Untereinheit in einer genomischen oder cDNA-Bibliothek codieren. Synthetische Oligonukleotide können als Primer zur Amplifikation durch PCR-Sequenzen aus einer Quelle (RNA oder DNA), vorzugsweise aus einer cDNA-Bibliothek, verwendet werden. Die DNA, die amplifiziert wird, kann cDNA oder genomische DNA aus jedem Menschen einschließen. Nach erfolgreicher Isolierung oder Amplifikation eines Abschnittes einer Untereinheit kann der Abschnitt molekular kloniert und sequenziert und als Sonde zur Isolierung einer kompletten cDNA oder eines genomischen Klons verwendet werden. Dies wiederum erlaubt die Charakterisierung der Nukleotidsequenz des Gens und die Produktion seines Proteinprodukts zur funktionellen Analyse und/oder zur therapeutischen oder diagnostischen Anwendung, wie nachstehend beschrieben.

**[0074]** Alternativen zur Isolierung der codierenden Regionen für die Untereinheiten umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, chemisches Synthetisieren der Gensequenz selbst aus der veröffentlichten Sequenz. Andere Verfahren sind möglich und liegen im Umfang der Erfindung. Die obigen Verfahren sollen die folgende allgemeine Beschreibung und die Verfahren, durch die Mutanten der Hormonuntereinheiten erhalten werden können, nicht einschränken.

**[0075]** Das identifizierte und isolierte Gen kann in einen geeigneten Klonierungsvektor zur Amplifikation der Gensequenz inseriert werden. Eine große Anzahl von Vektor-Wirtssystemen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, kann verwendet werden. Mögliche Vektoren umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Plasmide oder modifizierte Viren, allerdings muss das Vektorsystem mit der verwendeten Wirtszelle kompatibel sein. Solche Vektoren umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Bakteriophagen, wie Lambda-Derivate oder Plasmide, wie pBR322- oder pUC-Plasmidderivate oder der BLUESCRIPT-Vektor (Stratagene). Die Insertion in einen Klonierungsvektor kann beispielsweise durch Ligation des DNA-Fragments in einen Klonierungsvektor erfolgen, der komplementär-kohäsive Termini aufweist. Wenn jedoch die komplementären Restriktionsstellen, die zur Fragmentierung der DNA verwendet werden, in dem Klonierungsvektor nicht vorhanden sind, können die Enden der DNA-Moleküle enzymatisch modifiziert werden. Alternativ kann jede gewünschte Stelle durch Ligation von Nukleotidsequenzen (Linker) an die DNA-Termini produziert werden; diese legierten Linker können spezielle chemisch synthetisierte Oligonukleotide einschließen, die Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen einschließen. Bei einem alternativen Verfahren können der abgespaltene Vektor und das mutante Untereinheit-Gen durch homopolymeres Tailing modifiziert werden. Die rekombinanten Moleküle können über Transformation, Transfektion, Infektion, Elektroporation etc. in Wirtszellen eingebracht werden, so dass viele Kopien der Gensequenz generiert werden.

**[0076]** Bei einem alternativen Verfahren kann das gewünschte Gen nach Insertion in einen geeigneten Klo-

nierungsvektor in einem "Shot Gun"-Ansatz identifiziert und isoliert werden. Die Anreicherung des gewünschten Gens, beispielsweise durch Größenfraktionierung, kann vor der Insertion in den Klonierungsvektor erfolgen.

**[0077]** Die Wirtszellen können mit rekombinanten DNA-Molekülen transformiert werden, die das mutante Untereinheitsgen, die cDNA oder die synthetisierte DNA-Sequenz umfassen, die die Erzeugung von mehreren Kopien des Gens ermöglicht. Somit kann das Gen in großen Mengen durch Züchten von Transformanten, Isolieren der rekombinanten DNA-Moleküle aus den Transformanten und, wenn notwendig, Gewinnen des inserierten Gens aus der isolierten rekombinanten DNA erhalten werden. Kopien des Gens werden in Mutageneseexperimenten zum Studium der Struktur und Funktion mutanter Untereinheiten, TSH-Heterodimere und TSH-Analoga verwendet.

### 5.5.2 MUTAGENESE

**[0078]** Die in mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten, mutanten TSH-Heterodimeren, einkettigen erfindungsgemäßen TSH-Analogen vorliegenden Mutationen können auf verschiedene auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren erzeugt werden. Die Manipulationen, die zu ihrer Produktion führen, können auf Gen- oder Proteinniveau stattfinden. Beispielsweise kann die klonierte codierende Region der Untereinheiten durch eine von zahlreichen auf dem Fachgebiet bekannten Strategien modifiziert werden (Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Die Sequenz kann an entsprechenden Stellen mit Restriktionsendonuklease(n) gespalten werden, gefolgt von weiterer enzymatischer Modifikation, sofern gewünscht, isoliert und in vitro ligiert werden. Bei der Herstellung einer mutanten Untereinheit ist Vorsicht geboten, um zu gewährleisten, dass das modifizierte Gen innerhalb des gleichen translationalen Leserasters, durch translationale Stoppsignale ununterbrochen, in der Genregion, wo die Untereinheit codiert wird, verbleibt.

**[0079]** Zusätzlich kann die Nukleinsäuresequenz, die die Untereinheiten codiert, in vitro oder in vivo mutiert werden, um Variationen in den codierenden Regionen (z. B. Aminosäuresubstitutionen) zu erzeugen und/oder um Translations-, Initiations- und/oder Terminationssequenzen zu erzeugen und/oder zu zerstören und/oder um neue Restriktionsendonukleasestellen zu bilden oder bereits existierende zu zerstören, um eine weitere in vitro Modifikation zu erleichtern. Jede auf dem Fachgebiet bekannte Technik zur Mutagenese kann verwendet werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, chemische Mutagenese, in vitro ortsgerichtete Mutagenese (Hutchinson, C., et al., 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551), PCR-basierende Überlappungsexension (Ho et al., 1989, Gene 77: 51–59), PCR-basierende Megaprimer-Mutagenese (Sarkar et al., 1990, Biotechniques, 8: 404–407) etc. Die Mutationen können durch doppelsträngige Didesoxy-DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

**[0080]** Einer oder mehrere Aminosäurereste innerhalb einer Untereinheit können durch eine andere Aminosäure, vorzugsweise mit unterschiedlichen Eigenschaften, substituiert werden, um einen Bereich von funktionellen Differentialen zu erzeugen. Der Ersatz für eine Aminosäure innerhalb der Sequenz kann aus Elementen einer unterschiedlichen Klasse, der die Aminosäure angehört, ausgewählt werden. Die nicht-polaren (hydrophoben) Aminosäuren umfassen Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan und Methionin. Die polaren neutralen Aminosäuren umfassen Glycin, Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin und Glutamin. Die positiv geladenen (basischen) Aminosäuren umfassen Arginin, Lysin und Histidin. Die negativ geladenen (sauren) Aminosäuren umfassen Asparaginsäure und Glutaminsäure.

**[0081]** Manipulationen der mutanten Untereinheitssequenz können ebenfalls auf Proteinniveau vorgenommen werden. Offenbart sind mutante  $\alpha$ -Untereinheiten und ein mutantes TSH-Heterodimer, einkettige Analoge, die differenziell während oder nach der Translation modifiziert wurden, z. B. durch Glycosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Amidierung, Derivatisierung durch bekannte Schutz-/Blockierungsgruppen, proteolytische Spaltung, Verknüpfung mit einem Antikörpermolekül oder anderen Zellliganden etc. Jede von zahlreichen chemischen Modifikationen kann durch bekannte Techniken durchgeführt werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, spezifische chemische Spaltung durch Cyanogenbromid, Trypsin, Chymotrypsin, Papain, V8-Protease, NaBH<sub>4</sub>, Acetylierung, Formulierung, Oxidation, Reduktion; metabolische Synthese in Gegenwart von Tunicamycin etc.

**[0082]** Zusätzlich können die mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten und einkettigen TSH-Analoge chemisch synthetisiert werden. Beispielsweise kann ein Peptid, das einem Teil einer mutanten Untereinheit entspricht, die die gewünschte mutante Domäne umfasst, durch die Verwendung eines Peptidsynthesegeräts synthetisiert werden. Außerdem können, sofern gewünscht, nicht-klassische Aminosäuren oder chemische Aminosäureanaloge als Substitution oder Addition in die mutante Untereinheitssequenz eingebracht werden. Nicht-klassische

Aminosäuren umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, die D-Isomere der üblichen Aminosäuren,  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure, 4-Aminobuttersäure, Abu, 2-Aminobuttersäure,  $\gamma$ -Abu,  $\epsilon$ -Ahx, 6-Amino-hexansäure, Aib, 2-Aminoisobuttersäure, 3-Aminopropionsäure, Ornithin, Norleucin, Norvalin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Citrullin, Cysteinsäure, t-Butylglycin, t-Butylalanin, Phenylglycin, Cyclohexylalanin,  $\beta$ -Alanin, Fluraminosäuren, Designer-Aminosäuren, wie  $\beta$ -Methylaminosäuren,  $\alpha$ -Methylaminosäuren,  $N\alpha$ -Methylaminosäuren und Aminosäureanaloge im Allgemeinen. Außerdem kann die Aminosäure D (rechtsdrehend) oder L (linksdrehend) sein.

**[0083]** Bei speziellen Ausführungsformen ist die mutante  $\alpha$ -Untereinheit oder das TSH-Analog ein Fusionsprotein, das entweder z. B. eine mutante  $\beta$ -Untereinheit oder eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit einschließt, jedoch nicht darauf beschränkt ist. Eine spezielle Ausführungsform betrifft ein einkettiges Analog, umfassend eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit, die an einer mutante  $\beta$ -Untereinheit fusioniert ist, vorzugsweise über einen Peptidlinker zwischen der mutanten  $\alpha$ -Untereinheit und der mutanten  $\beta$ -Untereinheit.

## 5.6 EXPRESSION DER MUTANTEN UNTEREINHEITSGENE

**[0084]** Die Nukleotidsequenz, die eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit von TSH codiert, kann in einen entsprechenden Expressionsvektor, d. h. einen Vektor, der die notwendigen Elemente zur Transkription und Translation der inserierten Protein-codierenden Sequenz enthält, inseriert werden. Die notwendigen transkriptionalen und translationalen Signale können auch durch die native allgemeine  $\alpha$ -Untereinheit-cDNA oder das -Gen oder die humane TSH- $\beta$ -Untereinheit-cDNA oder das -Gen und/oder die genomischen Sequenzen, die jeweils die beiden Gene flankieren, geliefert werden. Eine Vielzahl von Wirts-Vektorsystemen kann zur Expression der Protein-codierenden Sequenz verwendet werden. Diese umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Säugerzellsysteme, die mit Viren infiziert sind (z. B. Vacciniavirus, Adenovirus etc.); Insektenzellsysteme, die mit Viren infiziert sind (z. B. Baculovirus); Mikroorganismen, wie Hefe, die Hefevektoren enthält. Die Expressionselemente der Vektoren variieren in ihrer Stärke und Spezifität. In Abhängigkeit von dem verwendeten Wirts-Vektorsystem kann jeder aus einer Anzahl von geeigneten Transkriptions- und Translationselementen verwendet werden. Beispielsweise werden eine mutante humane  $\alpha$ -Untereinheit-codierende Region und eine humane mutante TSH- $\beta$ -Untereinheit-codierende Region exprimiert.

**[0085]** Jedes der bisher beschriebenen Verfahren zur Insertion von DNA-Fragmenten in einen Vektor kann zur Konstruktion von Expressionsvektoren verwendet werden, die ein chimäres Gen enthalten, bestehend aus entsprechenden transkriptionalen/translationalen Kontrollsignalen und den Protein-codierenden Sequenzen. Diese Verfahren können in vitro DNA-Rekombinations- und -Synthesetechniken und in vivo DNA-Rekombinationstechniken (genetische Rekombination) einschließen. Die Expression der Nukleotidsequenz, die eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit und eine mutante TSH- $\beta$ -Untereinheit codiert, kann durch eine zweite Nukleotidsequenz reguliert werden, so dass die mutante(n) Untereinheit(en) in einem mit dem rekombinanten DNA-Molekül transformierten Wirt exprimiert wird. Beispielsweise kann die Expression einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit und einer mutanten TSH- $\beta$ -Untereinheit davon durch jedes Promotor/Enhancerelement, das auf dem Fachgebiet bekannt ist, kontrolliert werden. Promotoren, die verwendet werden können, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, die SV40-frühe Promotorregion (Bernoist und Chambon, 1981, Nature 290: 304–310), der Promotor, der in der 3'-langen terminalen Wiederholungssequenz des Rous-sarcoma-Virus enthalten ist (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22: 787–797), der Herpes-Thymidinkinase-Promotor (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1441–1445), die regulatorischen Sequenzen des Metallothioneingens (Brinster et al., 1982, Nature 296: 39–42).

**[0086]** Ein Vektor kann verwendet werden, der einen oder mehrere Promotoren einschließt, die mit der codierenden Region einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit und einer mutanten TSH- $\beta$ -Untereinheit, einer oder mehreren Replikationsursprüngen und gegebenenfalls mit einem oder mehreren selektierbaren Markern (z. B. ein Antibiotikumresistenzgen) operabel verknüpft sind. Die Expression der beiden Untereinheiten innerhalb derselben eukaryotischen Zelle ist bevorzugt, da eine solche Co-Expression die ordnungsgemäße Zusammenfügung und Glycosylierung eines funktionellen mutanten TSH-Heterodimers begünstigt. Somit werden solche Vektoren zur Expression sowohl der mutanten  $\alpha$ - als auch der mutanten  $\beta$ -Untereinheit in einer Wirtszelle verwendet. Die codierende Region von jeder der mutanten Untereinheiten kann in getrennte Vektoren kloniert werden; wobei die Vektoren sequentiell oder gleichzeitig in eine Wirtszelle eingebracht werden. Alternativ können die codierenden Regionen von beiden Untereinheiten in einen Vektor inseriert werden, der mit den entsprechenden Promotoren operabel verknüpft ist.

**[0087]** Ein Wirtszellenstamm kann gewählt werden, der die Expression der inserierten Sequenzen moduliert oder das Genprodukt auf die spezielle gewünschte Weise modifiziert und prozessiert. Die Expression aus bestimmten Promotoren kann in Gegenwart bestimmter Inducer erhöht werden; somit kann die Expression der

gentechnisch hergestellten mutanten Untereinheiten kontrolliert werden. Außerdem besitzen verschiedene Wirtszellen charakteristische und spezifische Mechanismen zur translationalen und posttranslationalen Prozessierung und Modifikation (z. B. Glycosylierung, Phosphorylierung von Proteinen). Geeignete Zelllinien oder Wirtssysteme können gewählt werden, um die gewünschte Modifikation und das gewünschte Prozessieren des exprimierten Fremdproteins zu gewährleisten. Die Expression in Säugerzellen kann eingesetzt werden, um eine "native" Glycosylierung eines heterologen Proteins zu gewährleisten. Außerdem können verschiedene Vektor/Wirt-Expressionssysteme Prozessierungsreaktionen in verschiedenen Ausmaßen bewirken.

**[0088]** Sobald eine rekombinante Wirtszelle, die die mutante TSH- $\alpha$ - und - $\beta$ -Untereinheit-Gensequenz exprimiert, identifiziert ist, kann das Genprodukt analysiert werden. Dies wird durch Tests auf der Grundlage der physikalischen oder funktionellen Eigenschaften des Produkts, einschließlich von radioaktivem Markieren des Produkts und anschließender Analyse durch Gelelektrophorese, Immuntest etc. erreicht.

## 5.7 ERZEUGUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN MUTANTE UNTEREINHEITEN UND ANALOGE DAVON

**[0089]** Mutante  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, mutante TSH-Heterodimere, einkettige TSH-Analoga können als Immunogen zur Erzeugung von Antikörpern verwendet werden, die ein solches Immunogen immunspezifisch binden. Solche Antikörper umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, polyklonale, monoklonale, chimäre, einkettige, Fab-Fragmente und eine Fab-Expressionsbibliothek. Ein Antikörper gegen ein mutantes TSH kann erzeugt werden. Ein Antikörper gegen eine Domäne oder eine mutante  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheit kann erzeugt werden.

**[0090]** Zur Produktion von polyklonalen Antikörpern gegen mutante  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten oder mutante TSH-Heterodimere können verschiedene auf dem Fachgebiet bekannte Verfahrensweisen verwendet werden. Zur Antikörperproduktion können verschiedene Wirtstiere durch Injektion mit den Untereinheiten, dem Heterodimer, dem einkettigen Analog und Derivaten davon immunisiert werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Kaninchen, Mäuse, Ratten etc. Verschiedene Adjuvantien können zur Verstärkung der immunologischen Antwort, in Abhängigkeit von der Wirtsspezies verwendet werden und schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Freund's Adjuvans (komplettes und inkomplettes), mineralische Gele, wie Aluminiumhydroxid, oberflächenaktive Substanzen, wie Lysolecithin, Pluronic-Polyole, Polyanionen, Peptide, Ölemulsionen, Keyhole-Limpet-Hämocyanine, Dinitrophenol und potentiell geeignete humane Adjuvantien, wie BCG (Bacille Calmette-Guerin) und *Corynebacterium parvum*.

**[0091]** Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die gegen  $\alpha$ -Untereinheiten oder mutante TSH-Heterodimere gerichtet sind, kann jede Technik eingesetzt werden, die die Produktion von Antikörpermolekülen durch kontinuierliche Zelllinien in Kultur bereitstellt. Beispielsweise die ursprünglich von Kohler und Milstein (1975, *Nature* 256: 495–497) entwickelte Hybridomtechnik, sowie die Triomtechnik, die humane B-Zell-Hybridomtechnik (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4: 72) und die EBV-Hybridomtechnik zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., Seiten 77–96). Bei einer zusätzlichen Ausführungsform der Erfindung können monoklonale Antikörper in keimfreien Tieren unter Verwendung einer neuen Technologie (PCT/US90/02545) produziert werden. Erfindungsgemäß können humane Antikörper verwendet werden und können unter Verwendung von humanen Hybridomen (Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026–2030) oder durch Transformieren von humanen B-Zellen mit dem EBV-Virus in vitro (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., Seiten 77–96) erhalten werden. In der Tat können Techniken, die zur Produktion von "chimären Antikörpern" entwickelt wurden (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851–6855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312: 604–608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314: 452–454), durch Spleißen der Gene aus einem Maus-Antikörpermolekül, das auf das Epitop spezifisch ist, zusammen mit Genen aus einem humanen Antikörpermolekül von entsprechender biologischer Aktivität verwendet werden.

**[0092]** Techniken, die zur Produktion von einkettigen Antikörpern beschrieben sind (US-Patentschrift 4,946,778), können zur Produktion spezieller einkettiger Antikörper gegen mutante TSH- $\alpha$ -Untereinheiten oder Heterodimere übernommen werden. Die Techniken, die zur Konstruktion von Fab-Expressionsbibliotheken beschrieben sind (Huse et al., 1989, *Science* 246: 1275–1281), um eine schnelle und leichte Identifizierung von monoklonalen Fab-Fragmenten mit der gewünschten Spezifität zu erlauben, können eingesetzt werden.

**[0093]** Antikörperfragmente, die den Idiotyp des Moleküls enthalten, können durch bekannte Techniken erzeugt werden. Beispielsweise umfassen solche Fragmente, sind jedoch nicht beschränkt auf, das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment, das durch Pepsin-Abbau des Antikörpermoleküls erzeugt werden kann, die Fab'-Fragmente, die durch Reduktion der Disulfidbrücken des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments erzeugt werden können, die Fab-Fragmente, die durch

Behandeln des Antikörpermoleküls mit Papain und einem Reduktionsmittel erzeugt werden können, und Fv-Fragmente.

**[0094]** Bei der Produktion von Antikörpern kann das Screening auf den gewünschten Antikörper durch auf dem Fachgebiet bekannte Techniken erreicht werden, z. B. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Beispielsweise können zur Selektion von Antikörpern, die eine spezifische Domäne einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit erkennen, generierte Hybridome für ein Produkt getestet werden, welches an ein Fragment einer mutanten Untereinheit, die eine solche Domäne enthält, bindet. Zur Selektion eines Antikörpers, der spezifisch eine mutante Untereinheit, ein mutantes TSH oder ein einkettiges Analog bindet, der jedoch nicht spezifisch Wildtyp-TSH bindet, kann die Selektion auf der Grundlage des positiven Bindens an die Mutante und auf der Grundlage eines mangelnden Bindens an das Wildtyp-Protein erfolgen.

**[0095]** Antikörper, die auf eine Domäne einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit oder mutantes TSH spezifisch sind, werden ebenfalls bereitgestellt.

**[0096]** Die vorgenannten Antikörper können bei auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren verwendet werden, die die Lokalisation und Aktivität der mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten, von mutantem TSH oder von einkettigen erfindungsgemäßen Analogon betreffen, z. B. zur Abbildung dieser Proteine, Messen von deren Konzentrationen in entsprechenden physiologischen Proben, bei diagnostischen Verfahren etc.

### 5.8 ANALYSE VON MUTANTEN TSH-UNTEREINHEITEN

**[0097]** Beschrieben werden hier Verfahren zur Bestimmung der Struktur von mutanten  $\alpha$ -TSH-Untereinheiten und mutanten Heterodimeren zur Analyse der *in vitro* Aktivitäten und *in vivo* biologischen Funktionen der Vorgenannten.

**[0098]** Nach Identifizierung einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit kann sie isoliert und durch Standardverfahren gereinigt werden, einschließlich Chromatographie (Ionenaustausch-, Affinitäts- und Größenausschluss-Säulenchromatographie), Zentrifugation, differentielle Löslichkeit oder durch jede andere Standardtechnik zur Aufreinigung von Proteinen gereinigt werden. Die funktionellen Eigenschaften können unter Verwendung jedes beliebigen geeigneten Tests (einschließlich Immuntests, wie nachstehend beschrieben) bewertet werden.

**[0099]** Nach Identifizierung einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit, die von einer rekombinanten Wirtszelle produziert wurde, kann die Aminosäuresequenz der Untereinheit(en) durch Standardtechniken des Proteinscreenings, z. B. mit einem automatischen Aminosäuresequenzierer, bestimmt werden.

**[0100]** Die mutante Untereinheitssequenz kann durch Hydrophilizitätsanalyse charakterisiert werden (Hopp, T. und Woods, K., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3824). Ein Hydrophilizitätsprofil kann zur Identifizierung der hydrophoben und hydrophilen Regionen der Untereinheit und der entsprechenden Regionen der Gensequenz, die solche Regionen codiert, verwendet werden.

**[0101]** Eine Sekundärstrukturanalyse (Chou, P. und Fasman, G., 1974, Biochemistry 13: 222) kann ebenfalls vorgenommen werden, um Regionen der Untereinheit zu identifizieren, die spezifische Sekundärstrukturen einnehmen.

**[0102]** Auch andere Strukturanalyseverfahren können eingesetzt werden. Diese umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Röntgenkristallographie (Engstrom, A., 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7–13) und Computer-Modellierung (Fletterick, R. und Zoller, M. (Hrsg.), 1986, Computer Graphics and Molecular Modeling, in: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Die Strukturvorhersage, Analyse von kristallographischen Messwerten, Sequenzalignment sowie Homologie-Modellierung können ebenfalls unter Verwendung von Computersoftwareprogrammen, die auf dem Fachgebiet erhältlich sind, wie BLAST, CHARMM Release 21.2 für Convex und QUANTA v. 3.3, (Molecular Simulations, Inc., York, United Kingdom), erreicht werden.

**[0103]** Die funktionelle Aktivität von mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten und mutanten TSH-Heterodimeren kann durch verschiedene auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren getestet werden.

**[0104]** Beispielsweise, um die Fähigkeit einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit oder mutanten TSH an Wildtyp-TSH oder seinen Untereinheiten durch Antikörperbindung zu binden oder zu konkurrieren, zu überprüfen, können verschiedene auf dem Fachgebiet bekannte Immuntests verwendet werden, einschließlich, jedoch nicht be-

schränkt auf, kompetitive und nicht-kompetitive Testsysteme unter Verwendung von Techniken, wie Radioimmuntests, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), "Sandwich"-Immuntests, immunradiometrische Tests, Geldiffusionspräzipitinreaktionen, Immundiffusionstests, in situ Immuntests (unter Verwendung von kolloidalem Gold), Enzym- oder Radioisotopmarkern beispielsweise, Western Blot, Präzipitationsreaktionen, Agglutinationstests (z. B. Gelagglutinationstests, Hämagglutinationstests), Komplementfixierungstests, Immunfluoreszenztests, Protein-A-Tests und Immunelektrophoresetests etc. Die Antikörperbindung kann durch Nachweis eines Markers auf den primären Antikörper nachgewiesen werden. Alternativ wird der primäre Antikörper durch Nachweis des Bindens eines sekundären Antikörpers oder eines Reagenz an den primären Antikörper nachgewiesen, insbesondere wo der sekundäre Antikörper markiert ist. Viele Mittel sind auf dem Fachgebiet zum Bindungsnachweis in einem Immuntest bekannt.

**[0105]** Das Binden von mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten oder mutanten TSH-Heterodimeren an den schilddrüsenstimulierenden Hormonrezeptor (TSHR) kann durch auf dem Fachgebiet gut bekannte Verfahren bestimmt werden, wie, jedoch nicht beschränkt auf, in vitro Tests auf der Grundlage von Verdrängung von TSHR durch ein radioaktiv markiertes TSH einer anderen Spezies, wie Rinder-TSH, beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, wie von Szkudlinski et al. (1993, *Endocrinol.* 133: 1490–1503) beschrieben. Die Bioaktivität von mutanten TSH-Heterodimeren kann ebenfalls gemessen werden, beispielsweise durch Tests auf der Grundlage der zyklischen AMP-Stimulation in Zellen, die den TSHR exprimieren, beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, Tests, die in Abschnitt 6.2.3 und bei Grossmann et al. (1995, *Mol. Endocrinol.* 9: 948–958) beschrieben sind; und Stimulation der Thymidin-Aufnahme in Schilddrüsenzellen, beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, wie von Szkudlinski et al. (1993, *Endocrinol.* 133: 1490–1503) beschrieben.

**[0106]** Die in vivo Bioaktivität kann durch physiologische Korrelate des TSHR-Bindens in Tiermodellen, die Messung der T<sub>4</sub>-Sekretion in Mäusen nach Injektion des mutanten TSH-Heterodimers, z. B. wie von East-Palmer et al. (1995, *Thyroid* 5: 55–59) und in Abschnitt 6.2 nachstehend beschrieben, bestimmt werden. Beispielsweise werden Wildtyp-TSH und mutantes TSH intraperitoneal in männliche Albino-Swiss-Crl:CF-1-Mäuse, mit zuvor unterdrücktem endogenen TSH durch Verabreichung von 3  $\mu\text{g/ml}$  T<sub>3</sub> im Trinkwasser für 6 Tage, injiziert. Blutproben werden 6 h später aus dem Orbitalsinus gesammelt, und die Serum-T<sub>4</sub>- und TSH-Spiegel werden durch die jeweiligen Chemilumineszenztests (Nichols Institute) gemessen.

**[0107]** Die Halbwertsdauer eines Proteins ist eine Messung der Proteinstabilität und gibt die Zeit an, die für eine Halbreduktion der Konzentration des Proteins notwendig ist. Die Halbwertsdauer eines mutanten TSH kann durch jedes Verfahren zum Messen der TSH-Spiegel in Proben aus einem Individuum über einen Zeitraum, beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, Immuntests unter Verwendung von Anti-TSH-Antikörpern zum Messen der mutanten TSH-Spiegel in Proben, die über einen Zeitraum nach Verabreichung des mutanten TSH genommen wurden, oder durch Nachweis von radioaktiv markiertem mutantem TSH in Proben, die aus einem Individuum nach Verabreichung des radioaktiv markierten mutanten TSH genommen wurden, bestimmt werden.

## 5.9 DIAGNOSTISCHE UND THERAPEUTISCHE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN

**[0108]** Offenbart wird die Behandlung oder Prävention verschiedener Krankheiten und Störungen durch Verabreichung einer therapeutischen Verbindung (hier als "Therapeutikum" bezeichnet). Solche Therapeutika umfassen TSH-Heterodimere mit einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit mit mindestens einer Aminosäuresubstitution nach Lysin, Arginin oder Histidin in Position 22 der  $\alpha$ -Untereinheit, wie in [Fig. 1](#) (SEQ ID NO:1) beschrieben, und mit entweder einer mutanten oder Wildtyp- $\beta$ -Untereinheit; TSH-Heterodimere mit einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit, die eine Substitution in Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin umfasst, und einer mutanten  $\beta$ -Untereinheit, vorzugsweise mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen in oder nahe der L3-Schleife (Aminosäuren 52–87, wie in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO:3) beschrieben, und kovalent an das CTEP der  $\beta$ -Untereinheit von hCG gebunden; TSH-Heterodimere mit einer mutanten  $\alpha$ -Untereinheit, die eine Substitution in Position 22 nach Lysin, Arginin oder Histidin umfasst, und einer mutanten  $\beta$ -Untereinheit, vorzugsweise mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen in oder nahe der L3-Schleife, wo die mutante  $\alpha$ -Untereinheit und die mutante  $\beta$ -Untereinheit unter Bildung eines einkettigen Analogens kovalent gebunden sind, einschließlich eines TSH-Heterodimers, wo die mutante  $\alpha$ -Untereinheit und die mutante  $\beta$ -Untereinheit und das CTEP der  $\beta$ -Untereinheit von hCG kovalent in einem einkettigen Analogens gebunden sind.

**[0109]** Das Individuum, dem das Therapeutikum verabreicht wird, ist vorzugsweise ein Tier, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Tiere wie Kühe, Schweine, Pferde, Hühner, Katzen, Hunden etc. und ist vorzugsweise ein Säuger. Das Individuum kann ein Mensch sein. Im Allgemeinen ist die Verabreichung von Produkten aus einem Speziesursprung, welcher die gleiche Spezies wie diejenige des Individuums ist, bevorzugt. Somit

wird ein humanes mutantes und/oder modifiziertes TSH-Heterodimer therapeutisch oder prophylaktisch oder diagnostisch an einen humanen Patienten verabreicht.

**[0110]** Das Therapeutikum kann im Wesentlichen gereinigt sein.

**[0111]** Eine Anzahl von Störungen, die als Hypothyroidismus belegt sind, können durch die beschriebenen Verfahren behandelt werden. Störungen, wobei TSH fehlt oder relativ zu den normalen oder gewünschten Spiegeln herabgesetzt ist, werden durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimers behandelt oder verhindert. Störungen, wobei der TSH-Rezeptor fehlt oder relativ zu den normalen Spiegeln herabgesetzt ist oder nicht reaktiv ist oder weniger reaktiv ist als der normale TSHR gegenüber Wildtyp-TSH, können ebenfalls durch Verabreichung eines mutanten TSH-Heterodimers behandelt werden. Konstitutiv aktiver TSHR kann zu Hyperthyroidismus führen, und es wird davon ausgegangen, dass mutante TSH-Heterodimere als Antagonisten eingesetzt werden können.

**[0112]** Mutante TSH-Heterodimere, die in der Lage sind, differenzierte Thyroidfunktionen zu stimulieren, können therapeutisch, einschließlich prophylaktisch, verabreicht werden. Krankheiten und Störungen, die behandelt oder verhindert werden können, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Hypothyroidismus, Hyperthyroidismus, Schilddrüsenentwicklung, Schilddrüsenkrebs, gutartige Strumae, vergrößerte Schilddrüse, Schutz von Schilddrüsenzellen vor Apoptose etc.

**[0113]** Das Fehlen eines herabgesetzten Spiegels an TSH-Protein oder -Funktion oder TSHR-Protein und -Funktion kann leicht nachgewiesen werden, z. B. durch Erhalt einer Patienten-Gewebeprobe (z. B. aus einem Biopsiegewebe) und durch ihr Testen in vitro auf RNA- oder Proteinspiegel, Struktur und/oder Aktivität der exprimierten RNA oder des Proteins von TSH oder TSHR. Viele Verfahren, die auf dem Fachgebiet als Standard gelten, können somit eingesetzt werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Immuntests zum Nachweis und/oder zur Visualisierung von TSH- oder TSHR-Protein (z. B. Western Blot, Immunpräzipitation und anschließende Natriumdodecylsulfatpolyacrylamid-Gelelektrophorese, Immunzytochemie etc.) und/oder Hybridisierungstests zum Nachweis der TSH- oder TSHR-Expression durch Nachweis und/oder Visualisierung von TSH- oder TSHR-mRNA (z. B. Northern Assays, Dot Blots, in situ Hybridisierung etc.) etc.

**[0114]** Zur Behandlung von Schilddrüsenkrebs können Therapeutika verwendet werden. Die mutanten TSH-Heterodimere sind bei der Stimulation von Schilddrüsengewebe und metastatischem Gewebe vor der therapeutischen Ablation mit radioaktivem Iod geeignet. Beispielsweise können die erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimere einem Patienten, der an Schilddrüsenkrebs leidet, vor Verabreichung von radioaktiv markiertem Iod zur Radioablation verabreicht werden. Die Therapeutika können auch zur Stimulierung der Iodaufnahme durch gutartige Mehrknotenstrumae vor der Radioablation zur Behandlung der Mehrknotenstrumae oder zur Stimulierung der Iodaufnahme durch Schilddrüsengewebe vor der Radioablation zur Behandlung einer vergrößerten Schilddrüse verwendet werden.

**[0115]** Speziell wird die Radioablationstherapie durch Verabreichung des Therapeutikums, vorzugsweise Verabreichung des Therapeutikums intramuskulär, in einem Regime von 1 bis 3 Dosen, beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, eine Dosis pro Tag 1 bis 2 Tage lang oder eine Dosis am ersten, vierten und siebten Tag eines Siebentageregimes durchgeführt. Die Dosierung ist jede geeignete Dosis, wie in Abschnitt 5.10, infra, beschrieben, beispielsweise, jedoch nicht beschränkt, auf eine Dosis von ungefähr 10 µg bis 1 mg, vorzugsweise eine Dosis von ungefähr 10 µg bis 100 µg. Ein Tag nach der letzten Dosis des Regimes wird radioaktiv markiertes Iod, vorzugsweise <sup>131</sup>I, dem Individuum in einer Menge verabreicht, die zur Behandlung des Krebses, der nicht kanzerösen Strumae oder der vergrößerten Schilddrüse ausreicht. Die zu verabreichende Menge an radioaktiv markiertem Iod hängt von Typ und Schwere der Krankheit ab. Im Allgemeinen werden 30 bis 300 mCi <sup>131</sup>I zur Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen verabreicht.

**[0116]** Die erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimere können zur gezielten Abgabe von Therapeutika an die Schilddrüse oder die Schilddrüsenkrebszellen, z. B. zur gezielten Verabreichung von Nukleinsäuren zur Gentherapie (beispielsweise gezielte Abgabe von Tumorsuppressorgenen an Schilddrüsenkrebszellen) oder zur gezielten Abgabe von Toxinen, wie, jedoch nicht beschränkt auf, Ricin, Diptherietoxin etc., verwendet werden.

**[0117]** Die Therapeutika werden einem Individuum zur Stimulierung der Iodaufnahme (vorzugsweise radioaktiv markiertes Iod, wie, jedoch nicht beschränkt auf, <sup>131</sup>I oder <sup>125</sup>I) durch Schilddrüsenzellen, (einschließlich von Schilddrüsenkrebszellen) und/oder zur Stimulierung der Sekretion von Thyroglobulin aus Schilddrüsenzellen (einschließlich von Schilddrüsenkrebszellen) verabreicht. Im Anschluss an die Verabreichung des Thera-

peutikums kann dem Patienten radioaktiv markiertes Iod verabreicht werden, und anschließend kann die Gegenwart und Lokalisation des radioaktiv markierten Iods (z. B. der Schilddrüsenzellen) in dem Individuum nachgewiesen werden (beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, Ganzkörperscanning), und/oder die Niveaus an Thyroglobulin können in dem Individuum gemessen oder nachgewiesen werden, wobei erhöhte Spiegel der radioaktiven Iodaufnahme oder erhöhte Spiegel der Thyroglobulinsekretion im Vergleich zu Spiegeln in einem Individuum, das nicht an Schilddrüsenkrebs oder an einer Krankheit leidet, oder im Vergleich zu Standardspiegeln, angibt, dass das Individuum an Schilddrüsenkrebs leidet. Bestimmte Individuen können sich der Thyroidektomie oder der Schilddrüsengewebeablationstherapie unterziehen und weisen wenig oder kein residuales Schilddrüsengewebe auf. Bei diesen Individuen oder jedem anderen Individuum, dem nichtkarzinogene Schilddrüsenzellen fehlen, gibt der Nachweis einer Iodaufnahme oder die Thyroglobulinsekretion (über Restniveaus, die nach der Thyroidektomie oder nach der Ablationstherapie oder nach dem Verlust von Schilddrüsengewebe aus einem anderen Grund zurückbleiben) die Gegenwart von Schilddrüsenkrebszellen an. Die Lokalisation des in das Individuum eingebauten radioaktiv markierten Iods kann zum Nachweis des Ausbreitens oder von Metastasen der Krankheit oder der Malignität verwendet werden. Zusätzlich können die diagnostischen Verfahren zur Überwachung der Behandlung von Schilddrüsenkrebs durch Messen der Änderung in den radioaktiv markierten Iod- oder Thyroglobulinspiegeln als Reaktion auf einen Behandlungsverlauf oder durch Nachweis der Regression oder des Wachstums von Schilddrüsentumor oder -metastasis verwendet werden.

**[0118]** Speziell werden die diagnostischen Verfahren durch Verabreichung des Therapeutikums vorzugsweise intramuskulär in einem Regime von 1 bis 3 Dosen, beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, eine Dosis pro Tag zwei Tage lang oder eine Dosis am ersten, vierten und siebten Tag eines Sieben-Tage-Regimes durchgeführt. Die Dosierung ist jede geeignete Dosis, wie in Abschnitt 5.10 nachstehend beschrieben, beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, eine Dosis von ungefähr 10 µg bis 1 mg, vorzugsweise eine Dosis von ungefähr 10 µg bis 100 µg. Einen Tag nach der letzten Dosis des Regimes wird radioaktiv markiertes Iod, vorzugsweise <sup>131</sup>I, dem Individuum in einer Menge verabreicht, die zum Nachweis von Thyroidzellen (einschließlich Krebszellen) ausreicht, im Allgemeinen werden 1–5 mCi <sup>131</sup>I zur Diagnose von Schilddrüsenkarzinom verabreicht. Zwei Tage nach Verabreichung des radioaktiv markierten Iods wird die Aufnahme des radioaktiv markierten Iods in den Patienten nachgewiesen und/oder in dem Patienten lokalisiert, beispielsweise, durch, jedoch nicht beschränkt auf, Ganzkörperradioiodid-Scanning. Alternativ können in den Fällen, wobei alles oder das meiste des Thyroidgewebes entfernt wurde (z. B. in Patienten mit vorheriger Thyroidektomie oder Schilddrüsengewebeablationstherapie), die Thyroglobulinspiegel 2 bis 17 Tage nach Verabreichung der letzten Dosis des Therapeutikums gemessen werden. Thyroglobulin kann durch jedes auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren gemessen werden, einschließlich Verwendung eines immunradiometrischen Tests, der spezifisch auf Thyroglobulin ist, wobei der Test auf dem Fachgebiet gut bekannt ist.

**[0119]** Die erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimere können auch bei TSH-Bindungs-Hemmtests auf TSH-Rezeptor-Autoantikörper verwendet werden, z. B. wie bei Kakinuma et al. (1997, J. Clin. Endo. Met. 82: 2129–2134) beschrieben. Antikörper gegen den TSH-Rezeptor sind an bestimmten Schilddrüsenerkrankungen beteiligt, wie, jedoch nicht beschränkt auf, Graves-Krankheit und Hashimoto-Thyroiditis; somit können diese Bindungs-Hemmtests als Diagnostikum für Krankheiten der Schilddrüse, wie Graves-Krankheit und Hashimoto-Thyroiditis, verwendet werden. Kurz gesagt, werden Zellen oder Membrane, die den TSH-Rezeptor enthalten, mit der auf TSHR-Antikörper zu testenden Probe und mit radioaktiv markiertem mutantern TSH zusammengebracht, die Hemmung des Bindens des radioaktiv markierten mutanten TSH relativ zum Binden an Zellen oder Membranen, die mit dem radioaktiv markierten mutanten TSH zusammengebracht wurden, allerdings nicht mit der zu testenden Probe, gibt an, dass die zu testende Probe Antikörper aufweist, die an den TSH-Rezeptor binden. Der Bindungs-Hemmtest unter Verwendung der erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimere, die eine größere Bioaktivität als das Wildtyp-TSH aufweisen, besitzt eine größere Empfindlichkeit auf die Anti-TSH-Rezeptor-Antikörper, als es für einen Bindungs-Hemmtest unter Verwendung von Wildtyp-TSH der Fall ist.

**[0120]** Demnach werden Verfahren zur Diagnose und zum Screening auf eine Krankheit oder eine Störung offenbart, die durch das Vorliegen von Antikörpern auf dem TSHR, vorzugsweise Graves-Krankheit, gekennzeichnet ist, offenbart, umfassend das Zusammenbringen von kultivierten Zellen oder isolierter Membran, die TSH-Rezeptoren enthält, mit einer Probe, von der angenommen wird, dass sie die Antikörper aus einem Individuum enthält, und mit einer diagnostisch wirksamen Menge eines radioaktiv markierten mutanten TSH-Heterodimers, Messen des Bindens des radioaktiv markierten mutanten TSH an die kultivierten Zellen oder die isolierte Membran, wobei eine Abnahme des Bindens des radioaktiv markierten TSH relativ zu dem Binden in Abwesenheit der Probe oder in Gegenwart einer gleichwertigen Probe ohne die Krankheit oder Störung das Vorliegen der Krankheit oder Störung angibt.

**[0121]** Die mutanten Heterodimere können auch bei Diagnoseverfahren zum Nachweis von unterdrücktem, jedoch funktionellem Schilddrüsengewebe in Patienten mit autonomen hyperfunktionierenden Schilddrüsenknoten oder exogener Schilddrüsenhormontherapie verwendet werden. Die mutanten TSH-Heterodimere können andere Anwendungsmöglichkeiten besitzen, wie, jedoch nicht beschränkt auf, diejenigen, die mit der Diagnose des zentralen und kombinierten primären und zentralen Hypothyroidismus, Hemiatrophie der Schilddrüse und Resistenz gegenüber TSH-Wirkung zusammenhängen.

#### 5.10 PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN

**[0122]** Offenbart werden Verfahren zur Diagnose und Verfahren zur Behandlung durch Verabreichung an ein Individuum einer wirksamen Menge eines Therapeutikums. Das Therapeutikum kann im Wesentlichen gereinigt sein. Das Individuum ist vorzugsweise ein Tier, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Tiere, wie Kühe, Schweine, Pferde, Hühner, Katzen, Hunde etc., und ist vorzugsweise ein Säuger und besonders bevorzugt ein Mensch. Das Individuum kann ein nicht-humaner Säuger sein.

**[0123]** Die erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimere werden vor der Anwendung in Menschen vorzugsweise *in vitro* und anschließend *in vivo* auf die gewünschte Aktivität, getestet. Bei verschiedenen speziellen Ausführungsformen können *in vitro* Tests mit repräsentativen Zellen von Zelltypen (z. B. Schilddrüsenzellen), die an einer Störung des Patienten beteiligt sind, durchgeführt werden, um zu bestimmen, ob ein mutantes TSH-Heterodimer oder ein TSH-Analog eine bestimmte Wirkung auf solche Zelltypen besitzt, z. B. wie in Abschnitt 5.8, *supra*, beschrieben.

**[0124]** Verbindungen zur Verwendung bei der Therapie können an geeigneten Tiermodellsystemen vor der Testung an Menschen getestet werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Ratten, Mäuse, Hühner, Kühe, Affen, Kaninchen etc. Zur *in vivo* Testung kann vor der Verabreichung an Menschen jedes Tiermodellsystem, das auf dem Fachgebiet bekannt ist, verwendet werden.

**[0125]** Verschiedene Abgabesysteme sind bekannt und können zur Verabreichung eines erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimers verwendet werden, z. B. Verkapselung in Liposomen, Mikropartikeln, Mikrokapselformen, rekombinanten Zellen, die in der Lage sind, das mutante TSH-Heterodimer zu exprimieren, Rezeptor-vermittelte Endozytose (siehe z. B. Wu und Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429–4432) etc. Verfahren zum Einbringen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, intradermale, intramuskuläre, intraperitoneale, intravenöse, subkutane, intranasale, epidurale und orale Wege. Die Verbindungen können durch auf jedem zweckmäßigen Weg verabreicht werden, beispielsweise durch Infusion oder Bolus-Injektion, durch Absorption über Epithel- oder mukokutanöse Auskleidungen (z. B. Mundschleimhaut, Rektal- und Intestinalschleimhaut etc.) und können zusammen mit anderen biologisch aktiven Mitteln verabreicht werden. Die Verabreichung kann systemisch oder lokal erfolgen. Zusätzlich kann es erwünscht sein, die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen durch jeden geeigneten Weg, einschließlich intraventrikulärer und intrathekaler Injektion, in das Zentralnervensystem einzubringen; die intraventrikuläre Injektion kann durch einen intraventrikulären Katheter, der beispielsweise an ein Reservoir angeschlossen ist, wie ein Ommaya-Reservoir, erleichtert werden. Die pulmonale Verabreichung kann ebenfalls eingesetzt werden, z. B. durch Verwendung eines Inhalators oder Verneblers, und einer Formulierung mit einem Aerosolisierungsmittel.

**[0126]** Es kann erwünscht sein, die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen lokal an den Bereich, der der Behandlung bedarf, zu verabreichen; dies kann beispielsweise, jedoch nicht einschränkend, durch lokale Infusion während einer Operation mittels Katheter, mittels eines Suppositoriums oder mittels eines Implantats erreicht werden, wobei das Implantat ein poröses, nicht-poröses oder gelatineartiges Material ist, einschließlich von Membranen, wie sialastische Membranen oder Fasern.

**[0127]** Das mutante TSH-Heterodimer kann in einem Vesikel verabreicht werden, insbesondere in einem Liposom (siehe Langer, *Science* 249: 1527–1533 (1990); Treat et al., in *Liposomas in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein und Fidler (Hrsg.), Liss, New York, Seiten 353–365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, Seiten 317–327; siehe allg, *ibid.*).

**[0128]** Die mutanten TSH-Heterodimere können in einem kontrolliert freisetzenden System verabreicht werden. Es kann eine Pumpe verwendet werden (siehe Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88: 507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321: 574 (1989)). Es können polymere Materialien verwendet werden (siehe *Medical Applications of Controlled Release*, Langer und Wise (Hrsg.), CRC Press., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen und Ball (Hrsg.), Wiley, New York (1984); Ranger und Peppas, *J. Macromol. Sci.*

Rev. Macromol. Chem. 23: 61 (1983); siehe auch Levy et al., Science 228: 190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25: 351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71: 105 (1989)). Ein kontrolliert freisetzendes System kann in der Nähe des therapeutischen Ziels angeordnet werden, was somit nur einen Bruchteil der systemischen Dosis erforderlich macht (siehe z. B. Goodsen in Medical Applications of Controlled Release, supra, Bd. 2, Seiten 115–138 (1984)).

**[0129]** Weitere kontrollierte Freisetzungssysteme sind in dem Artikel von Langer (Science 249:1527–1533 (1990)) diskutiert.

**[0130]** Die vorliegende Erfindung stellt auch pharmazeutische Zusammensetzungen bereit. Solche Zusammensetzungen umfassen eine therapeutisch wirksame Menge eines mutanten TSH-Heterodimers und einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Bei einer speziellen Ausführungsform bedeutet der Begriff "pharmazeutisch verträglich" von einer Aufsichtsbehörde der Bundes- oder Staatsregierung genehmigt oder in der US-Pharmacopeia oder in einer anderen allgemein anerkannten Pharmacopeia zur Verwendung bei Tieren und insbesondere bei Menschen aufgeführt. Der Begriff "Träger" bezieht sich auf ein Verdünnungsmittel, Adjuvans, Exzipient oder Vehikel, mit dem das Therapeutikum verabreicht wird. Solche pharmazeutischen Träger können sterile Flüssigkeiten sein, wie Wasser und Öle, einschließlich von denjenigen, die aus Erdöl stammen, tierischen, pflanzlichen oder synthetischen Ursprungs sind, wie Erdnussöl, Sojaöl, Mineralöl, Sesamöl und dergleichen. Wasser ist ein bevorzugter Träger, wenn die pharmazeutische Zusammensetzung intravenös verabreicht wird. Kochsalzlösungen und wässrige Dextrose- und Glycerinlösungen können ebenfalls als flüssige Träger eingesetzt werden; insbesondere für injizierbare Lösungen. Geeignete pharmazeutische Exzipienten umfassen Stärke, Glucose, Lactose, Saccharose, Gelatine, Malz, Reis, Mehl, Kalk, Silicagel, Natriumstearat, Glycerinmonostearat, Talk, Natriumchlorid, Magermilchpulver, Glycerin, Propylen, Glycol, Wasser, Ethanol und dergleichen. Die Zusammensetzung kann, sofern gewünscht, auch kleine Mengen an Netz- oder Emulgiermitteln oder pH-Puffermitteln enthalten. Diese Zusammensetzungen können die Form von Lösungen, Suspensionen, Emulsionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, Pulvern, verzögert freisetzenden Formulierungen und dergleichen einnehmen. Die Zusammensetzung kann als Suppositorium mit traditionellen Bindemitteln und Trägern, wie Triglyceride, formuliert sein. Die orale Formulierung kann Standardträger einschließen, wie Mannit, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Cellulose, Magnesiumcarbonat etc. von pharmazeutischer Reinheit. Beispiele für geeignete pharmazeutische Träger sind in "Remington's Pharmaceutical Sciences" von E.W. Martin beschrieben. Solche Zusammensetzungen enthalten eine therapeutisch wirksame Menge des mutanten TSH-Heterodimers, vorzugsweise in gereinigter Form, zusammen mit einer geeigneten Menge an Träger, so dass die Form für die entsprechende Verabreichung an den Patienten bereitgestellt wird. Die Formulierung sollte der Verabreichungsweise angepasst sein.

**[0131]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die Zusammensetzung gemäß Routineverfahren als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert, die der intravenösen Verabreichung an Menschen angepasst ist. Typischerweise sind Zusammensetzungen zur intravenösen Verabreichung Lösungen in sterilem isotonischem wässrigem Puffer. Wenn notwendig, kann die Zusammensetzung auch ein Solubilisierungsmittel und ein Lokalanästhetikum, wie Lignocain, zur Linderung von Schmerzen an der Einstichstelle einschließen. Im Allgemeinen werden die Bestandteile entweder getrennt oder miteinander gemischt in einer Darreichungsform, beispielsweise als trockenes lyophilisiertes Pulver oder als wasserfreies Konzentrat in einem luftdicht verschlossenen Behälter, wie eine Ampulle, oder in einem Beutel, der die Menge an Wirkstoff angibt, bereitgestellt. Wenn die Zusammensetzung durch Infusion verabreicht werden soll, kann sie mit einer Infusionsflasche abgegeben werden, die steriles Wasser oder Kochsalzlösung von pharmazeutischer Reinheit enthält. Wenn die Zusammensetzung durch Injektion verabreicht wird, kann eine Ampulle von sterilem Wasser zur Injektion oder von Kochsalzlösung vorgesehen sein, so dass die Bestandteile vor der Verabreichung gemischt werden können.

**[0132]** Die erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimere können als neutrale oder als Salzformen formuliert sein. Pharmazeutisch verträgliche Salze umfassen diejenigen, die mit freien Aminogruppen gebildet sind, wie diejenigen, die sich von Chlorwasserstoffsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure etc. ableiten, und diejenigen, die mit freien Carboxylgruppen gebildet sind, wie diejenigen, die sich von Natrium, Kalium, Ammonium, Calcium, Eisen(III)-hydroxiden, Isopropylamin, Triethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain etc. ableiten.

**[0133]** Die Menge des erfindungsgemäßen mutanten TSH-Heterodimers, die bei der Behandlung einer bestimmten Störung oder eines bestimmten Zustandes wirksam ist, hängt von der Natur der Störung oder des Zustandes ab und kann durch klinische Standardtechniken bestimmt werden. Zusätzlich können gegebenenfalls in vitro Tests und Tiermodelle eingesetzt werden, um die Identifizierung der optimalen Dosierungsbereiche

zu unterstützen. Die exakte in der Formulierung einzusetzende Dosis hängt auch von dem Verabreichungsweg und der Schwere der Krankheit oder Störung ab und sollte nach dem Urteil des praktischen Arztes und der jeweiligen Patienten-Umstände beschlossen werden.

**[0134]** Die Therapeutika können intramuskulär verabreicht werden. Geeignete Dosierungsbereiche für die intramuskuläre Verabreichung betragen im Allgemeinen etwa 10 µg bis 1 mg pro Dosis, vorzugsweise etwa 10 µg bis 100 µg pro Dosis. Im Allgemeinen können für diagnostische und therapeutische Verfahren, wobei die mutanten TSH-Heterodimere zur Stimulierung der Iodaufnahme verabreicht werden, die mutanten TSH-Heterodimere in einem Regime von 1 bis 3 Injektionen verabreicht werden. Das Therapeutikum kann in zwei Dosen verabreicht werden, wobei die zweite Dosis 24 Stunden nach der ersten Dosis verabreicht wird; alternativ wird das Therapeutikum in drei Dosen verabreicht, wobei eine Dosis an den Tagen 1, 4 und 7 eines Sieben-Tage-Regimes verabreicht wird.

**[0135]** Wirksame Dosen können aus den Dosis-Antwortkurven, die von in vitro oder tierischen Modelltestsystemen stammen, extrapoliert werden.

**[0136]** Suppositorien enthalten im Allgemeinen den Wirkstoff im Bereich von 0,5 bis 10 Gew.-%, orale Formulierungen enthalten vorzugsweise 10 bis 95 % Wirkstoff.

## 6. BEISPIELE

**[0137]** Zwei Beispiele für die neuen mutanten TSH-Heterodimere werden im Folgenden bereitgestellt. Die Messwerte zeigen, dass die mutanten TSH-Heterodimere eine höhere Bioaktivität als Wildtyp-TSH besitzen.

### 6.1 MATERIALIEN

**[0138]** Restriktionsenzyme, DNA-Marker und andere molekulare biologische Reagenzien wurden entweder von Gibco BRL (Gaithersburg, MD) oder von Boehringer-Mannheim (Indianapolis, IN) bezogen. Zellkulturmedien, fötales Rinderserum und LIPOFECTAMINE wurden von New England Biolabs (Beverly, MA) bezogen. Die Vollängen-humane- $\alpha$ -cDNA (840 Bp), subkloniert in BamHI/XhoI-Schnittstellen des pcDNA1/Neo-Vektors (Invitrogen, San Diego, CA) und das hCG- $\beta$ -Gen wurden von T.H. Ji (University of Wyoming, Laramie, WY) erhalten. Das hTSH- $\beta$ -Minigen ohne das erste Intron mit dem nicht-translatierten ersten Exon und der authentischen Translationsinitiationsstelle wurde von den Erfindern konstruiert. Rekombinanter humaner TSH-Standard stammte von Genzyme (Framingham, MA). Die Chinesischen-Hamster-Eierstock-(CHO)-Zellen mit stabil exprimierten hTSH-Rezeptor (CHO-hTSHR Klon JP09 und Klon JP26) wurden von G. Vassart (University of Brüssel, Belgien), bereitgestellt.  $^{125}$ I-cAMP,  $^{125}$ I-Human-TSH und  $^{125}$ I-Rinder-TSH, radioaktiv markiert bis auf eine spezifische Aktivität von 40–60 µCi/µg, wurden von Hazleton Biologicals (Vienna, VA) erhalten.

### 6.2 VERFAHREN

#### 6.2.1 ORTSGERICHTETE MUTAGENESE

**[0139]** Die ortsggerichtete Mutagenese der humanen  $\alpha$ -cDNA wurde durch das auf PCR basierende Megaprimer-Verfahren (Sarkar et al., 1990, Biotechniques 8: 404–407) durchgeführt. Die Amplifikation wurde unter Verwendung von Vent<sup>®</sup>-DNA-Polymerase (New England Biolabs) optimiert. Nach Verdau mit BamHI und XhoI wurde das PCR-Produkt in pcDNA 1/Neo (Invitrogen) ligiert, wobei das BamHI/XhoI-Fragment herausgeschnitten wurde. MC1061/p3-Escherichia-coli-Zellen wurden unter Verwendung des Ultracomp-E-coli-Transformationskit (Invitrogen) transformiert. Das QIAprep 8 Plasmid Kit (Qiagen) wurde für mehrere Plasmid-DNA-Präparationen verwendet. Qiagen-Mega- und Maxi-Purification-Protokolle wurden zur Reinigung größerer Mengen von Plasmiden verwendet, die als Templat zur weiteren Mutagenese  $\alpha$ -cDNA mit einzelnen oder mehreren Mutationen enthielten. Die Mutationen wurden durch Doppelstrang-Sequenzieren unter Verwendung des Didesoxynucleotidkettenterminationsverfahrens von Sanger bestätigt. Die Konstruktion der mutanten TSH- $\beta$ -Untereinheit-Fusion mit CTEP ist bei Joshi et al. (1995, Endocrinology, 136: 3839–3848) beschrieben.

#### 6.2.2 EXPRESSION VON REKOMBINANTEN HORMONEN

**[0140]** CHO-K1-Zellen (ATCC, Rockville, MD) wurden in HAM's F-12-Medium mit Glutamin und 10 % FBS, Penicillin (50 Einheiten/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) gehalten. Platten der Zellen (100-mm-Kulturschalen) wurden mit Wildtyp- oder mutanter  $\alpha$ -cDNA in dem pcDNA 1/NEO co-transfiziert, und mutantes hTSH $\beta$ -Minigen wurde unter Verwendung eines LIPOFECTAMINE-Reagenz (Gibco BRL) in den p(LB)CMV-Vektor inse-

riert. Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen in CHO-serumfreies Natrium (CHO-SFM-II Gibco BRL) transferiert. Das Kulturmedium, das das Kontrollmedium aus Mock-Transfektionen unter Verwendung der Expressionsplasmide ohne Gen-Inserts einschloss, wurde 72 h nach Transfektion geerntet, konzentriert und zentrifugiert; die Aliquote wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und nur einmal vor jedem Test aufgetaut. Wildtyp- und mutantes hTSH wurden gemessen und unter Verwendung verschiedener Aktivitäts- und Immuntests verifiziert.

### 6.2.3 ZYKLISCHE AMP-STIMULIERUNG IN SÄUGER ZELLEN, DIE DEN HUMANEN TSH-REZEPTOR EXPRIMIEREN

**[0141]** CHO-K1-Zellen, die stabil mit hTSH-Rezeptor-cDNA (JP09 oder JP26) transfiziert waren, wurden gezüchtet und mit seriellen Verdünnungen vom Wildtyp- und mutanten TSH, wie beschrieben, inkubiert. cAMP, das in das Medium freigesetzt wurde, wurde durch Radioimmuntest bestimmt. Die entsprechenden Mengen von Gesamtprotein in den Medien wurden als Mock-Kontrolle für die hTSH-enthaltenden Proben aus den transfizierten Zellen verwendet.

### 6.2.4 IN VIVO TSH-BIOAKTIVITÄTSTESTS

**[0142]** Die thyrotropische Aktivität des hTSH wurde durch seine Fähigkeit zur Induktion der cAMP-Produktion in CHO-Zellen, die hTSH-Rezeptoren exprimieren (Klone JP09 und JP26) und in FRTL-5-Zellen, die den endogenen Ratten-TSH-Rezeptor exprimieren, bewertet. FRTL-5-Zellen wurden auch zum Testen des hTSH-induzierten Zellwachstums verwendet. Zu diesem Zweck wurden CHO-Zellen, die den hTSH-Rezeptor stabil exprimieren (JP09 oder JP26), bis zur Konfluenz in angereichertem HAM's-F12-Medium in 96-Well-Gewebekulturplatten gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen entweder unter salzfreien Bedingungen oder mit physiologischer (0,9 %) NaCl-Konzentration 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  mit seriellen Verdünnungen vom Wildtyp- und mutanten hTSH sowie als Kontrollmedium aus Mock-Transfektionen inkubiert. Die Menge an in das Medium freigesetzten cAMP wurde durch Radioimmuntest bestimmt. Die in vivo Aktivität der hTSH-Analoge wurde durch Bestimmung der Gesamt-Thyroxin-(Gesamt- $\text{T}_4$ )-Spiegel nach intraperitonealen Injektionen in  $\text{T}_3$ -supprimierte Mäuse, wie von Szkudlinski et al., in Nat. Biotechnol. 14: 1257 (1996) beschrieben, getestet.

## 6.3 ERGEBNISSE

**[0143]** Die in [Fig. 4–8](#) dargestellten Ergebnisse stützen die Schlussfolgerung, dass mutante hTSH-Heterodimere im Vergleich mit dem entsprechenden Wildtyp-TSH eine verstärkte biologische Aktivität zeigten. Insbesondere geben die Ergebnisse an, dass einzelne oder mehrere Mutationen innerhalb der TSH-Untereinheiten in die Heterodimere eingearbeitet werden konnten, die eine verstärkte Aktivität in vitro und in vivo aufweisen. Dies traf für mehrere verschiedene Mutationen und Kombinationen davon zu.

**[0144]** Bei einem Beispiel, das die Mutation in der  $\alpha\text{L1}$ -Schleife der allgemeinen humanen  $\alpha$ -Untereinheit mit verstärkter Hormonaktivität erläutert, wurde eine Mutante erzeugt, wobei ein Glycinrest, der üblicherweise an Position 22 der  $\alpha$ -Untereinheit vorhanden ist, durch einen Argininrest ( $\alpha\text{G22R}$ ) ersetzt ist. Ein mutantes TSH-Heterodimer, das diese Mutation in Kombination mit einer Wildtyp- $\beta$ -Untereinheit einschließt, wurde durch vorübergehendes Co-Expriemieren der einzelnen Untereinheiten in CHO-K1-Zellen erzeugt. Das resultierende mutante Heterodimer wurde anschließend unter Verwendung von CHO-JP26-Zellen, die den TSH-Rezeptor exprimieren, in einem Bioaktivitätstest getestet. Wie durch die in [Fig. 4](#) dargestellten Ergebnisse angegeben, band das mutante Hormon TSHR und induzierte einen höheren Spiegel der zyklischen AMP-Produktion als das Wildtyp-TSH.

**[0145]** Die Plasma-Halbwertsdauer und Stabilität der mutanten superaktiven TSH-Heterodimere, der Wildtyp- oder der allgemeinen mutanten  $\alpha$ -Untereinheiten, die vier Mutationen Q13K+E14K+P16K+O20K, einschließen, wurden durch Co-Expression der  $\alpha\text{4K}$ -Untereinheit und der humanen Wildtyp-TSH- $\beta$ -Untereinheit oder der humanen TSH- $\beta$ -Untereinheitsfusion mit CTEP von hCG ( $\beta$ -CTEP) in CHO-K1-Zellen erhöht. Wildtyp- und mutante TSH-Heterodimere wurden unter Verwendung eines Chemilumineszenzimmuntests quantifiziert (Nichols Institute). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt (100 % Expression bedeutet 47 ng Wildtyp-TSH pro ml).

Tabelle 1

	Expression (Gew.-%)	SEM
hTSH-Wildtyp	100	6
hTSH- $\alpha$ 4K	26	5
hTSH- $\alpha$ 4K-CTEP	20	3

**[0146]** Die Gegenwart von CTEP setzte die Expression des Heterodimers, das  $\alpha$ 4K und das  $\beta$ -CTEP-Fusionsprotein umfasste, im Vergleich mit dem Heterodimer, das  $\alpha$ 4K und Wildtyp-TSH- $\beta$  umfasste, nicht herab.

**[0147]** Die Fähigkeit von Wildtyp- und mutanten TSH-Heterodimeren zur Bindung des TSHR wurde durch die Stimulierung der zyklischen AMP-Produktion in CHO-JP09, die stabil einen transfizierten TSHR exprimieren, bewertet. Wie durch die in [Fig. 5](#) dargestellten Ergebnisse angegeben, zeigte das  $\alpha$ 4K/ $\beta$ -CTEP-Heterodimer eine 200-fache Zunahme der Wirksamkeit und eine 1,5-fache Zunahme in  $V_{max}$  im Vergleich zu Wildtyp-TSH. Es war überraschend, dass der Einschluss von CTEP, von dem eine Verlängerung der in vivo Halbwertszeit des  $\alpha$ 4K/ $\beta$ -CTEP-Heterodimers erwartet wird, eine in vitro Aktivität ebenfalls um ein weiteres 3-4-Faches gegenüber derjenigen eines  $\alpha$ 4K/Wildtyp- $\beta$ -Heterodimers erhöhte.

**[0148]** Die Ergebnisse zeigen, dass Mutationen, die die Bioaktivität eines mutanten TSH erhöhten, zweckmäßigerweise mit einer Mutation oder Modifikation kombiniert werden können, die die Halbwertsdauer im Kreislauf verlängern, um mutante Hormone zu erzeugen, die überragende in vitro und in vivo Merkmale aufweisen.

**[0149]** In anderen Beispielen erhöhten Mutationen in der  $\beta$ -Haarnadel-L3-Schleife der allgemeinen humanen  $\alpha$ -Untereinheit ebenfalls die Hormonaktivität. Eine der Mutationen bestand in einer Substitution des Alaninrestes an Position 81 durch einen Lysinrest ( $\alpha$ A81K). Die andere Mutation bestand in einer Substitution des Asparaginrestes an Position 66 durch einen Lysinrest ( $\alpha$ N66K). Jede der mutanten humanen  $\alpha$ -Untereinheiten wurde vorübergehend in CHO-K1-Zellen in Kombination mit humanen Wildtyp-TSH- $\beta$ -Untereinheiten exprimiert, um mutante TSH-Heterodimere zu produzieren. Jedes dieser mutanten TSH-Heterodimere wurde in einem Bioaktivitätstest unter Verwendung von CHO-JP09-Zellen, die den humanen TSH-Rezeptor exprimieren, getestet. Die Ergebnisse aus diesen Verfahren gaben an, dass beide mutanten Hormone höhere Niveaus der cAMP-Produktion stimulierten, als es mit dem Wildtyp-Hormon der Fall war. Die Substitution von Alanin 81 nach Lysin ( $\alpha$ A81K) in der  $\alpha$ -Untereinheit stellt den ersten Beweis des Einbaus eines Lysinrestes, der in anderen homologen Sequenzen nicht vorhanden ist, in eine  $\beta$ -Haarnadelschleife dar.

**[0150]** Bei wieder einem anderen Beispiel erhöhte eine Mutation in der Nähe der  $\beta$ -Haarnadel-L1-Schleife der humanen TSH- $\beta$ -Untereinheit die Hormonaktivität eines Heterodimers, das diese mutante Untereinheit einschloss. Die Mutation war eine Substitution des Glutamatrestes an Position 6 durch einen Asparaginrest ( $\beta$ E6N), der einen negativ geladenen Rest in der Peripherie der  $\beta$ -Haarnadel-L1-Schleife beseitigt. Die mutante humane TSH- $\beta$ -Untereinheit wurde in CHO-K1-Zellen in Kombination mit einer humanen allgemeinen Wildtyp- $\alpha$ -Untereinheit vorübergehend exprimiert, um ein mutantes TSH-Heterodimer zu produzieren. Das mutante TSH-Heterodimer wurde anschließend in einem Bioaktivitätstest unter Verwendung von CHO-JP09-Zellen, die den TSH-Rezeptor exprimierten, getestet. Wiederum gaben die Ergebnisse an, dass dieses mutante TSH-Hormon den Rezeptor band und höhere Niveaus der cAMP-Produktion induzierte als das Wildtyp-TSH.

**[0151]** Die in den [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) dargestellten Ergebnisse bestätigen weiterhin, dass Mutationen in der  $\beta$ L1-Schleife verwendet werden können, um mutante Heterodimere zu produzieren, die zweckmäßigerweise eine verstärkte biologische Aktivität besitzen, wenn sie unter Verwendung von in vitro Tests getestet werden. Insbesondere geben die in [Fig. 6](#) dargestellten Ergebnisse an, dass die einzelnen mutanten  $\beta$ F1R,  $\beta$ E6N und  $\beta$ A17R mit der Wildtyp- $\alpha$ -Untereinheit unter Bildung von mutanten Heterodimeren kombiniert werden konnten, die verstärkte Hormonaktivität besaßen. [Fig. 7](#) zeigt, dass die  $\beta$ -Untereinheiten, die Kombination von entweder  $\beta$ F1R und  $\beta$ E6N oder  $\beta$ F1R,  $\beta$ E6N und  $\beta$ A17R einschlossen, ebenfalls verstärkte Hormonaktivität besaßen.

**[0152]** Gemäß den vorstehend beschriebenen in vitro Befunden zeigten die mutanten hTSH-Analoga parallele Zunahmen in ihren in vivo Aktivitäten. In der Tat wurde bei einem Beweis der in vivo Aktivität der TSH-Mutanten, die durch das vorstehend beschriebene Verfahren hergestellt wurden, eine TSH- $\beta$ -Untereinheit ( $\beta$ R3) mit den drei Punktmutationen  $\beta$ 158R,  $\beta$ E63R und  $\beta$ L69R erzeugt. Die oben beschriebene  $\alpha$ 4K-mutante  $\alpha$ -Untereinheit und die  $\beta$ 3R-mutante  $\beta$ -Untereinheit wurden intrazellulär co-exprimiert, aus konditioniertem Medium

gesammelt und das resultierende Heterodimer auf die biologische Aktivität, die als Gesamt-T<sub>4</sub> messbar war, getestet. Die Mutagenese beeinflusste die Clearance der Analoge aus dem Kreislauf nicht signifikant. Die in [Fig. 8A](#) gezeigten Ergebnisse gaben an, dass zwei verschiedene mutante Heterodimere in vivo eine drastisch verstärkte Bioaktivität aufwiesen. Die in [Fig. 8B](#) gezeigten Ergebnisse gaben an, dass die Größe der erhöhten Bioaktivität des  $\alpha$ 4K/ $\beta$ 3R-Heterodimers relativ zu der Wildtyp-Kontrolle mindestens das Hundertfache betrug. Ferner bestätigten diese Ergebnisse, dass die Kombinationen von mutanten TSH-Untereinheiten die Hormonaktivität in vivo drastisch verstärken konnten. Im Lichte dieser Ergebnisse ist die Erwartung, dass TSH-Mutanten und Analoge, wie hier beschrieben, dem herkömmlichen rekombinanten hTSH bei der diagnostischen Handhabung von Schilddrüsenkrebs überlegen sind, reell.

**[0153]** Die vorstehend dargelegten Ergebnisse bestätigen, dass die Mutation der TSH-Untereinheiten zweckmäßigerweise zur Herstellung und Verwendung von TSH-Mutanten mit verstärkter biologischer Aktivität verwendet werden könnte.

**[0154]** Die hier dargestellten Ergebnisse geben weiterhin an, dass die peripheren Regionen der  $\alpha$ L1- und  $\beta$ L3-Schleifen von hTSH "Modifikations-permissive" Domänen darstellten, die für eine höhere Rezeptorbindung und Aktivität konstruiert werden können. Die Lokation dieser Modifikations-permissiven Domänen erzeugt einen zweiwertigen Liganden, in dem eine solche Symmetrie von Bindungsgrenzflächen ein Ergebnis einer Kopf-Schwanz-Dimerisierung von Homodimeren oder Heterodimeren ist, und es wird angenommen, dass es die Liganden-induzierte Rezeptordimerisation vermittelt. Obwohl für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor bisher keine funktionell relevante Rezeptordimerisation beschrieben wurde, wurde eine putative Wechselwirkungsstelle an der sechsten Transmembrandomäne und an adrenergen Rezeptoren lokalisiert, und die entsprechende Region ist ein "Hot Spot" zur konstitutiven Aktivierung von Mutationen des TSH-Rezeptors.

**[0155]** Somit haben wir unter Verwendung einer rationalen Strategie auf der Grundlage von evolutionären Überlegungen und Homologievergleichen durch Testung von weniger als 20 Mutanten das  $\alpha$ 4K/ $\beta$ 3R-hTSH-Analog mit nur sieben Mutationen von insgesamt 204 Aminosäuren des TSH-Moleküls und mit einer 50000-fachen Zunahme in der Bindungsaffinität und mit einer bis zu 1300-fachen Zunahme in der Hormonwirksamkeit identifiziert. Obgleich nicht gewünscht ist, an eine bestimmte Arbeitshypothese gebunden zu sein, ist es möglich, dass die Modulation peripherer Schleifen während der Glycoproteinhor-monevolution die Hormonfunktion in verschiedenen phylogenetischen Stadien modifiziert haben könnte. Die Synergie der bei den konstruierten Schleifenregionen bei der Rezeptorbindung legt nahe, dass das Kombinieren von Modifikationen in solchen räumlich distanten Domänen, die zu verschiedenen Stadien der Hormonevolution optimiert wurden, eine universelle Strategie zur Konstruktion von humanen Proteinanalogen bereitstellen kann. Die rekombinanten Analoge des hier beschriebenen Typs besitzen eine Kombination von basischen Resten, die in keinem natürlichen bekannten Hormon zu keinem evolutionären Stadium vorhanden sind, und sie übersteigen die Rezeptorbindungsaffinität oder -aktivität von TSH aus jeder Spezies.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> University of Maryland, Baltimore  
 <120> MUTANTEN DES THYROID-STIMULIERENDEN HORMONS  
 UND DARAUf BERUHENDE VERFAHREN  
 <130> UOFMD.002QPC  
 <140> PCT US98/19772  
 <141> 1998-09-22  
 <150> 08/939,472  
 <151> 1997-09-22  
 <160> 4  
 <170> FastSEQ for Windows Version 3.0  
 <210> 1  
 <211> 91  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Pro
1			K	5	R				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	Ser	Glu	Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Ala	Lys	Ser	Tyr
	50					55					60				
Asn	Arg	Val	Thr	Val	Met	Gly	Gly	Phe	Lys	Val	Glu	Asn	His	Thr	Ala
65					70					75					80
Cys	His	Cys	Ser	Thr	Cys	Tyr	Tyr	His	Lys	Ser					
				85					90						

<210> 2  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 2

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

```

                85                90                95
His Glu Ala Ile Lys Thr Asn Tyr Cys Thr Lys Pro Gln Lys Ser Tyr
                100                105                110
Leu Val Gly Phe Ser Val
                115

<210> 3
<211> 530
<212> DNA
<213> Homo sapien

<220>
<221> CDS
<222> (86)...(520)

<400> 3
agacaaggca ggggacgcac caaggatgga gatgttccag gggctgctgc tgttgcctgt 60
gctgagcatg ggcgggacat gggca tcc aag gag ccg ctt cgg cca cgg tgc 112
                Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys
                1 5

cgc ccc atc aat gcc acc ctg gct gtg gag aag gag gcc tgc ccc gtg 160
Arg Pro Ile Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val
10 15 20 25

tgc atc acc gtc aac acc acc atc tgt gcc gcc tac tgc ccc acc atg 208
Cys Ile Thr Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met
30 35 40

acc cgc gtg ctg cag ggg gtc ctg ccg gcc ctg cct cag gtg gtg tgc 256
Thr Arg Val Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys
45 50 55

aac tac cgc gat gtg cgc ttc gag tcc atc cgg ctc cct ggc tgc ccg 304
Asn Tyr Arg Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro
60 65 70

cgc gcc gtg aac ccc gtg gtc tcc tac gcc gtg gct ctc agc tgt caa 352
Arg Gly Val Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln
75 80 85

tgt gca ctc tgc cgc cgc agc acc act gac tgc ggg ggt ccc aag gac 400
Cys Ala Leu Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp
90 95 100 105

cac ccc ttg acc tgt gat gac ccc cgc ttc cag gac tcc tct tcc tca 448
His Pro Leu Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser
110 115 120

aag gcc cct ccc ccc agc ctt cca agc cca tcc cga ctc ccg ggg ccc 496
Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro
125 130 135

tcg gac acc ccg atc ctc cca caa taaaggcttc 530
Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
140 145

<210> 4
<211> 9
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 4
tcaatccgc

```

9

Patentansprüche

1. Mutante  $\alpha$ -Untereinheit von schilddrüsenstimulierendem Hormon (TSH), die eine Substitutionsmutante

ist und eine Aminosäuresubstitution zu einem positiv geladenen oder basischen Rest von Lysin, Arginin und Histidin an Position 22 der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Untereinheit umfaßt, wie es in [Fig. 1](#) gezeigt ist, so daß ein TSH-Heterodimer, welches die mutante  $\alpha$ -Untereinheit umfaßt, bei der Stimulation von zyklischem AMP eine höhere Aktivität aufweist als ein Wildtyp-TSH-Heterodimer.

2. Mutante  $\alpha$ -Untereinheit von TSH nach Anspruch 1, die gereinigt ist.
3. Mutante  $\alpha$ -Untereinheit von TSH nach Anspruch 1 oder 2, welche weiterhin eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 11, 13, 14, 16, 17 oder 20 der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Untereinheit, wie in [Fig. 1](#) dargestellt, umfaßt.
4. Mutante  $\alpha$ -Untereinheit von TSH nach Anspruch 1, 2 oder 3, welche weiterhin eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen in der  $\beta$ -Haarnadel-L1-Schleife der  $\alpha$ -Untereinheit (Reste 8 bis 30, wie in [Fig. 1](#) gezeigt) umfaßt.
5. Mutante  $\alpha$ -Untereinheit von TSH nach Anspruch 3 oder 4, wobei die eine oder die mehreren Substitutionen Aminosäuren sind, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Arginin und Lysin.
6. Mutante  $\alpha$ -Untereinheit von TSH nach Anspruch 3, 4 oder 5, wobei die eine oder die mehreren Substitutionen aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus  $\alpha$ T11K,  $\alpha$ Q13K,  $\alpha$ E14K,  $\alpha$ P16K,  $\alpha$ F17R und  $\alpha$ Q20K.
7. Mutante  $\alpha$ -Untereinheit von TSH nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die einzige Mutation eine Aminosäuresubstitution nach Arginin an Position 22 der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Untereinheit ist, wie es in [Fig. 1](#) gezeigt ist.
8. Mutantes TSH-Heterodimer, welches eine mutante  $\alpha$ -Untereinheit von TSH nach einem der vorangegangenen Ansprüche zusammen mit einer  $\beta$ -Untereinheit umfaßt.
9. Mutantes TSH-Heterodimer nach Anspruch 8, welches gereinigt ist.
10. Mutantes TSH-Heterodimer nach Anspruch 8 oder 9, wobei die  $\beta$ -Untereinheit eine humane  $\beta$ -Untereinheit ist.
11. Mutantes TSH-Heterodimer nach Anspruch 8, 9 oder 10, welches eine  $\beta$ -Untereinheit von TSH umfaßt, die über eine Peptidbindung an ihrem Carboxylterminus an den Aminoterminus des carboxylterminalen Verlängerungspeptids von humanem Choriongonadotropin gebunden ist.
12. Mutantes TSH-Heterodimer nach einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei die  $\alpha$ -Untereinheit kovalent an die  $\beta$ -Untereinheit von TSH gebunden ist.
13. Mutantes TSH-Heterodimer nach Anspruch 12, wobei die  $\beta$ -Untereinheit von TSH über eine Peptidbindung am Carboxylterminus an den Aminoterminus des carboxylterminalen Verlängerungspeptids von humanem Choriongonadotropin gebunden ist und wobei der Carboxylterminus des carboxylterminalen Verlängerungspeptids über eine Peptidbindung an den Aminoterminus der  $\alpha$ -Untereinheit gebunden ist.
14. Mutantes TSH-Heterodimer nach Anspruch 12, wobei die  $\beta$ -Untereinheit von TSH über eine Peptidbindung am Carboxylterminus an den Aminoterminus der  $\alpha$ -Untereinheit gebunden ist.
15. Mutantes TSH-Heterodimer nach einem der Ansprüche 8 bis 14, wobei die hormonale Halbwertszeit des mutanten TSH-Heterodimers im Blutkreislauf in vivo länger ist als die von Wildtyp-TSH.
16. Mutantes TSH-Heterodimer nach einem der Ansprüche 8 bis 15, wobei die einzige Mutation eine Aminosäuresubstitution an Position 22 der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Untereinheit ist, wie es in [Fig. 1](#) gezeigt ist.
17. Nukleinsäure, welche eine Nukleotidsequenz umfaßt, die die mutante  $\alpha$ -Untereinheit von TSH nach einem der Ansprüche 1 bis 7 codiert.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche eine therapeutisch wirksame Menge eines mutanten TSH-Heterodimers nach einem der Ansprüche 8 bis 16 zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt.

19. Diagnostische Zusammensetzung, welche eine Menge eines mutanten TSH-Heterodimers nach einem der Ansprüche 8 bis 16, die ausreichend ist, um die Iodaufnahme durch Schilddrüsenkrebszellen zu stimulieren, zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt.

20. Kit, welcher in einem oder mehreren Behältern eine therapeutisch wirksame Menge eines mutanten TSH-Heterodimers nach einem der Ansprüche 8 bis 16 umfaßt.

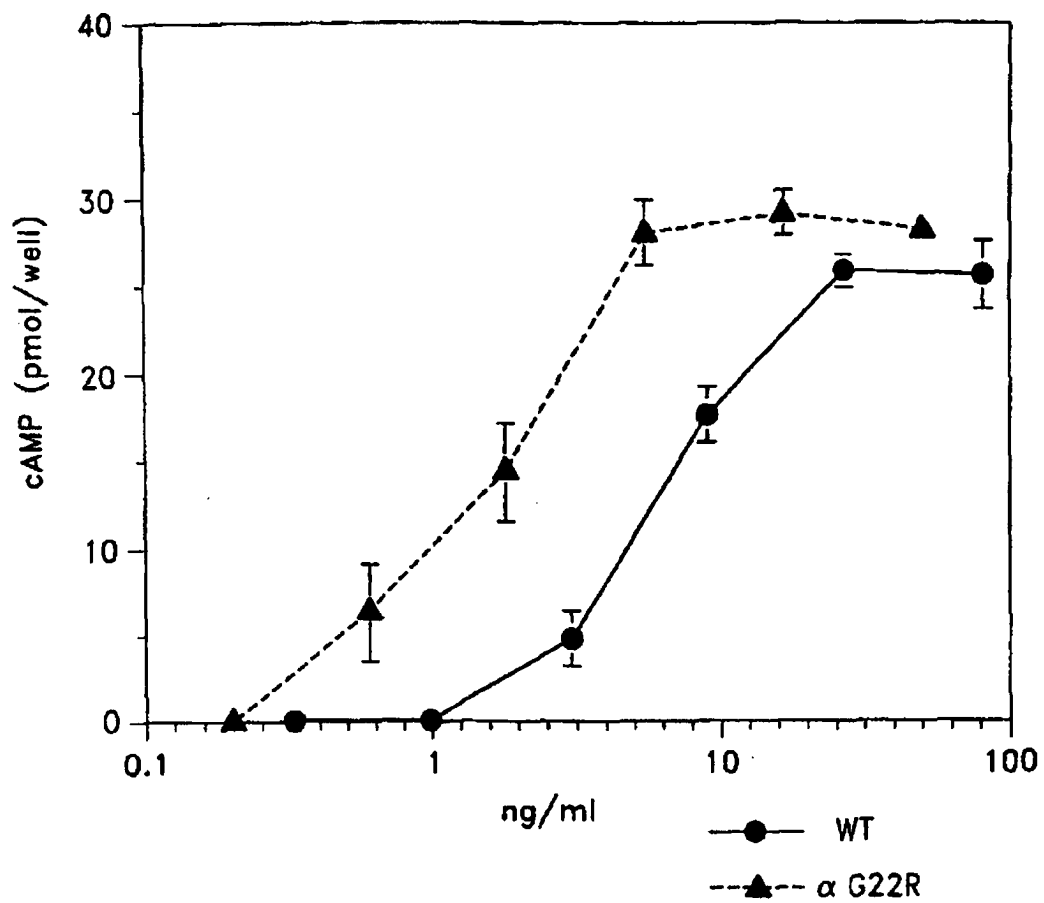
21. Kit, welcher in einem oder mehreren Behältern eine diagnostisch wirksame Menge eines mutanten TSH-Heterodimers nach einem der Ansprüche 8 bis 16 umfaßt.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

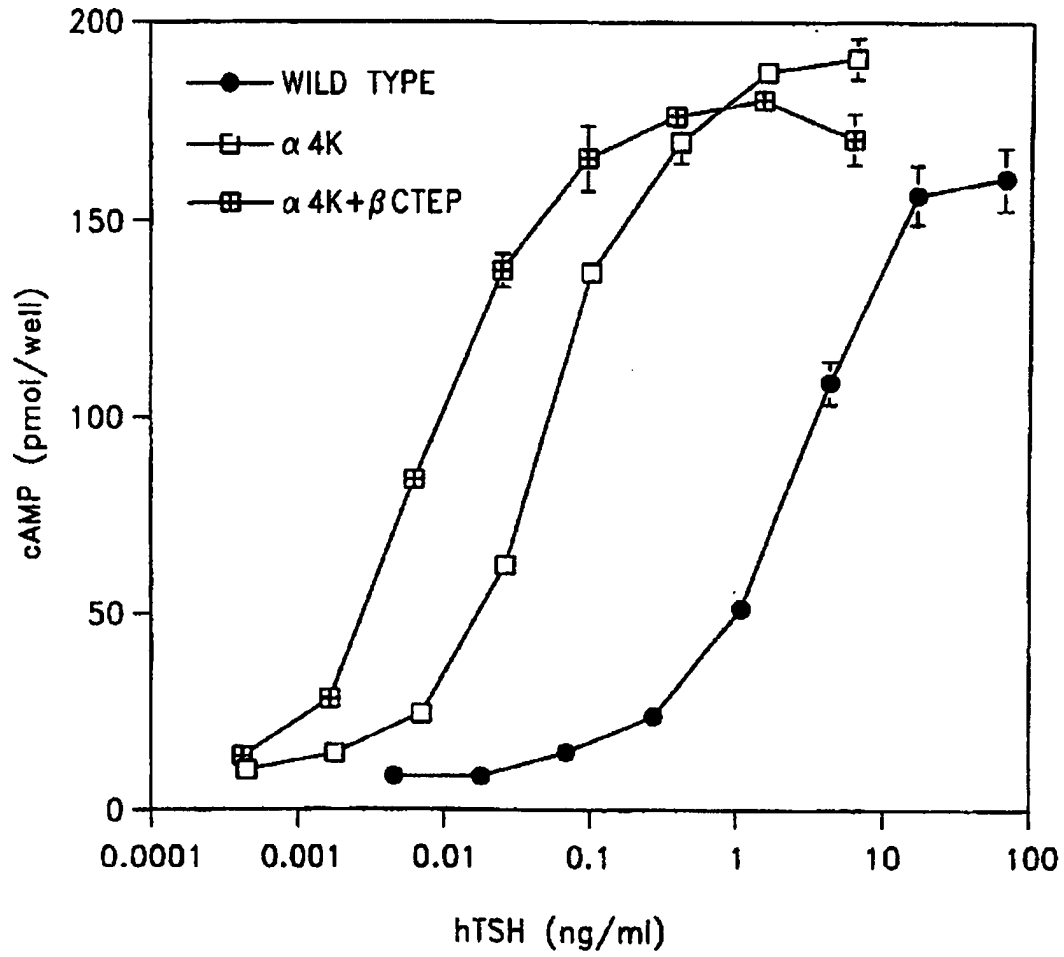


AGACAAGGCA GGGGACGCAC CAAGG	ATG GAG ATG TTC CAG GGG CTG CTG CTG	52
	Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu	
	-20 -15	
TTG CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA TCC AAG GAG CCG CTT	100	
Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu		
-10 -5 1 5		
CGG CCA CGG TGC CGC CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG GAG	148	
Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu		
10 15 20		
GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC	196	
Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr		
25 30 35		
TGC CCC ACC ATG ACC CGC GTG CTG CAG GGG GTC CTG CCG GCC CTG CCT	244	
Cys Pro Thr Met Thr Arg Val Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro		
40 45 50		
CAG GTG GTG TGC AAC TAC CGC GAT GTG CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC	292	
Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu		
55 60 65		
CCT GGC TGC CCG CGC GGC GTG AAC CCC GTG GTC TCC TAC GCC GTG GCT	340	
Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala		
70 75 80 85		
CTC AGC TGT CAA TGT GCA CTC TGC CGC CGC AGC ACC ACT GAC TGC GGG	388	
Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly		
90 95 100		
GGT CCC AAG GAC CAC CCC TTG ACC TGT GAT GAC CCC CGC TTC CAG GAC	436	
Gly Pro Lys Asp His Pro Leu Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp		
105 110 115		
TCC TCT TCC TCA AAG GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGC CCA TCC CGA	484	
Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg		
120 125 130		
CTC CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC CTC CCA CAA TAAAGGCTTC	530	
Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln (SEQ ID NO: 3)		
135 140 145		
TCAATCCGC (SEQ ID NO: 4)	539	

FIG. 3



**FIG. 4**



**FIG. 5**

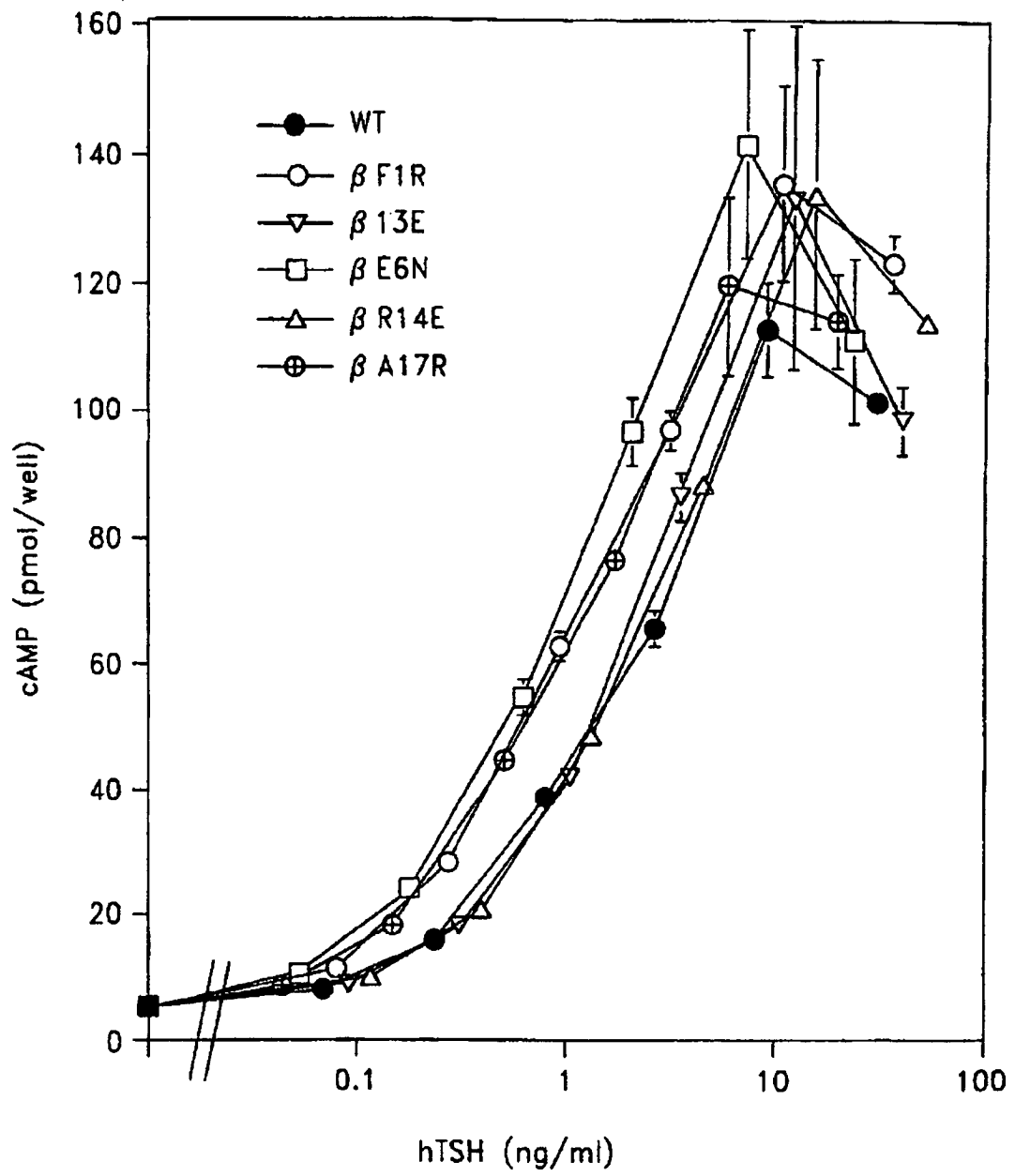


FIG. 6

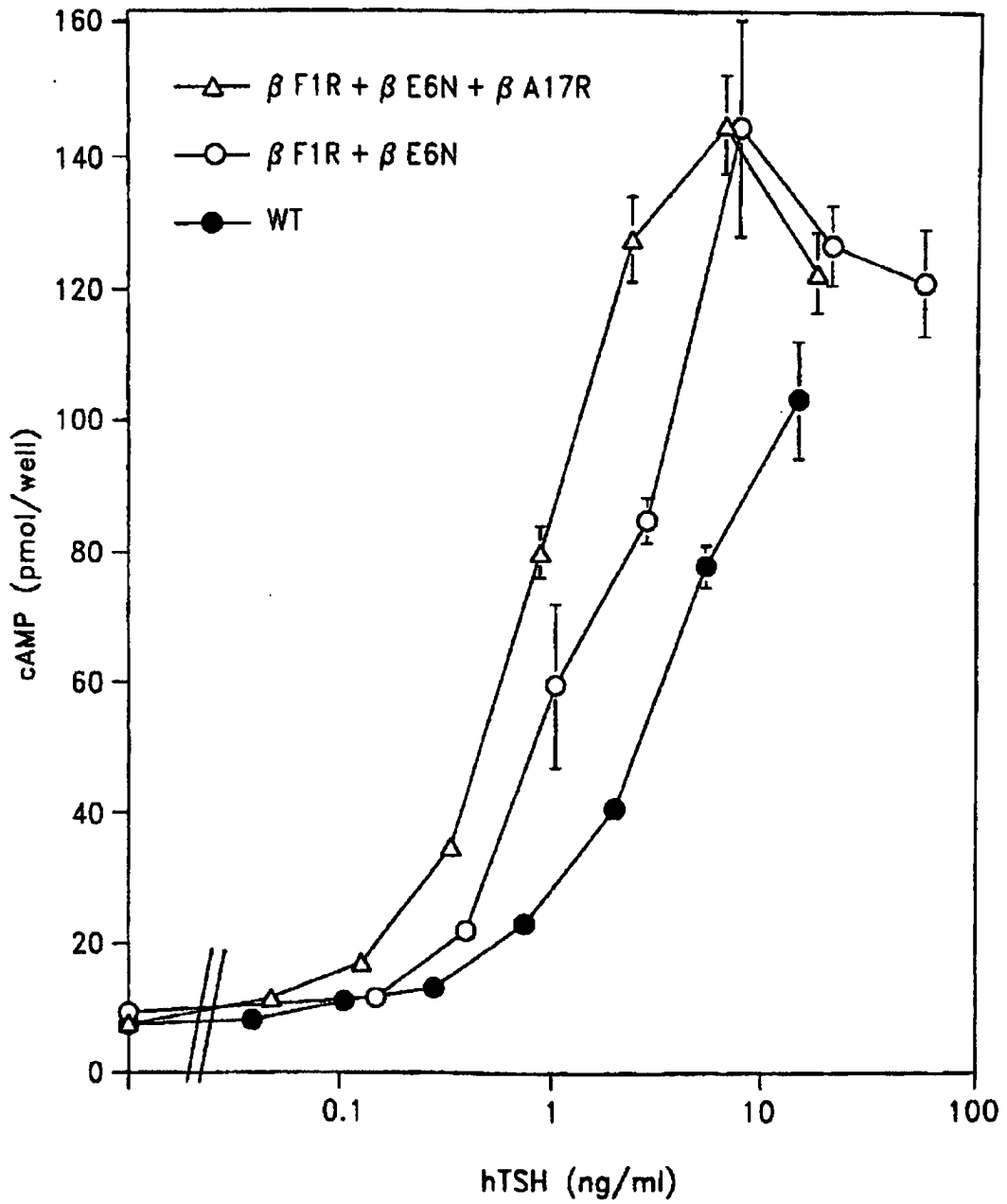
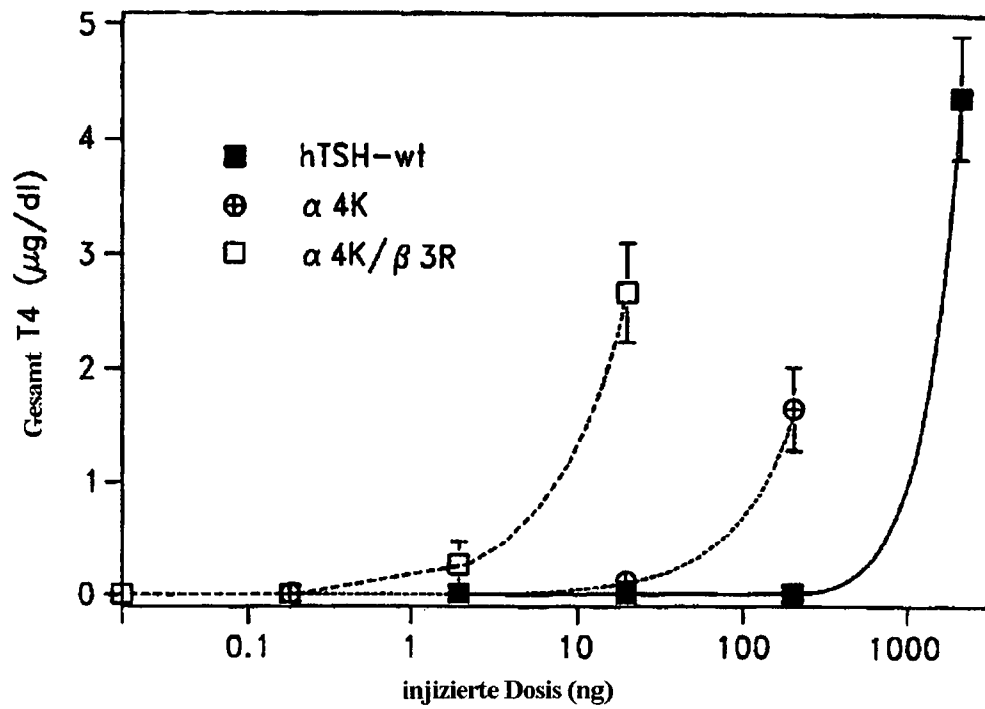


FIG. 7

**FIG. 8a**



**FIG. 8b**

