

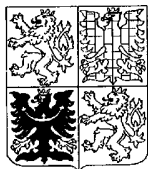
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 1388

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.10.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.10.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/175017**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.10.2001**
(Věstník č. 10/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/23555**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/23473**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/59

A 61 K 38/24

C 07 K 16/26

A 61 P 43/00

(71) Přihlašovatel:

WASHINGTON UNIVERSITY, St. Louis, MO, US;

(72) Původce:

Boime Irving, St. Louis, MO, US;

Ben-Menahem David, St. Louis, MO, US;

(74) Zástupce:

Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Glykoproteinové hormony obsahující více domén
a způsoby jejich použití**

(57) Anotace:

Vynález popisuje formy různě působících glykoproteinových hormonů. Tyto kompozice mají vzorce: (1) β^1 - (spojovací skupina¹)_m- α -(spojovací skupina²)_n- β^2 ; (2) β^1 - (spojovací skupina¹)_m- β^2 -(spojovací skupina²)_n- α ; (3) α -(spojovací skupina¹)_m- β^1 -(spojovací skupina²)_n- β^2 ; (4) $\beta^2 = \alpha$ - (spojovací skupina_m)- β^1 ; nebo (5) β^1 -(spojovací skupina)_m- α β^2 ; kde každý z β^1 a β^2 má aminokyselinovou sekvenci β podjednotky glykoproteinového hormonu obratlovců nebo varianty uvedené aminokyselinové sekvence, podle zde uvedené definice termínu "varianta"; " α " označuje α podjednotku glykoproteinového hormonu obratlovců nebo její variantu; "spojovací skupina" je kovalentně navázaná spojovací skupina, která odděluje β^1 a β^2 podjednotky ve vhodné vzdálenosti od α -podjednotky a od sebe navzájem; "=" je nekovalentní vazba. Každé m a n jsou nezávisle 0 nebo 1, kde každý z β^1 a β^2 způsobuje jinou aktivitu uvedeného prostředku.

Glykoproteinové hormony obsahující více domén a způsoby jejich použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká oblasti proteinového inženýrství, konkrétně modifikovaných forem některých glykoproteinových hormonů, jejichž přirozené formy se vyskytují jako heterodimery. Vynález se týká komplexů obsahujících více domén tvořených choriovým gonadotropinem (CG), thyreostimulačním hormonem (TSH), luteinizačním hormonem (LH) a hormonem stimulujícím folikuly (FSH), kde α podjednotka kovalentně navázaná na β podjednotku může být asociována s další β podjednotkou nebo může být kovalentně navázána na dvě β podjednotky. Tyto glykoproteinové hormony obsahující více domén mohou mít dva nebo více účinků nebo funkcí, nebo se mohou chovat jako agonisté a/nebo antagonisté přirozených hormonů.

Dosavadní stav techniky

U člověka jsou čtyři významné glykoproteinové hormony (LH, TSH, FSH a CG) heterodimery mající identické α podjednotky a různé β podjednotky. Tři z těchto hormonů jsou přítomné v podstatě u všech obratlovců; CG byl zjištěn pouze u primátů a v placentě a moči březích klisen.

PCT přihláška WO 90/09800, publikovaná 7.9.1990, která je zde uvedena jako odkaz, popisuje mnoho modifikovaných forem těchto hormonů. Jednou významnou modifikací je C-koncové prodloužení β -podjednotky karboxy-koncovým peptidem (CTP) lidského choriového gonadotropinu nebo jeho varianty. Také jsou popsány jiné mutované formy těchto hormonů. CTP je

sekvence aminokyselin v rozsahu od jakékoli z pozic 112-118 do pozice 145 β -podjednotky lidského choriového gonadotropinu. PCT přihláška popisuje varianty CTP prodloužení získané konzervativními aminokyselinovými substitucemi, které jsou takové, že kapacita CTP měnit charakteristiky klírens hormonu nejsou narušeny. Dále, PCT přihláška WO 94/24148, publikovaná 27.10.1994 a uvedená zde jako odkaz, popisuje modifikaci těchto hormonů prodloužením nebo insercí CTP do jiného místa než do C-konce a také fragmenty CTP kratší než sekvence od pozice 112-118 do pozice 145.

β -podjednotka FSH prodloužená o CTP byla také popsána ve dvou pracích přihlašovatelů: LaPolt, P.S. et al., *Endocrinology* (1992) 131: 2514-2520 a Fares, F.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89: 4304-4308. Obě tyto práce jsou zde uvedeny jako odkazy.

Krystalová struktura lidského choriového gonadotropinu byla publikována ve více či méně nedávných člancích; jeden od Laphorn A.J. et al., *Nature* (1994) 369: 455-461 a druhý od Wu, H. et al., *Structure* (1994) 2: 545-558. Výsledky těchto článků jsou shrnuty v Patel, D.J., *Nature* (1994), 369: 438-439.

PCT přihláška WO 91/16922, publikovaná 14.11. 1991, popisuje mnoho chimerických nebo jinak modifikovaných forem glykoproteinových hormonů. Obecně je přihláška zaměřena na chimérické formy α -podjednotek nebo β -podjednotek obsahující části různých α nebo β řetězců, v příslušném pořadí. Jeden konstrukt, který je v této přihlášce pouze uveden a nikoliv jinak popsán, je tvořen fúzí celého β řetězce lidského choriového gonadotropinu s α -podjednotkovým preproteinem, t.j. řetězcem obsahujícím sekreční signální sekvenci pro tuto

podjednotku.

Dvě další publikované PCT přihlášky popisují jednořetězcové formy těchto glykoproteinových hormonů, ve kterých jsou α a β podjednotky kovalentně navázány, což vede ke vzniku sloučeniny obecného vzorce:

$\beta(\text{spojovací skupina})_n\alpha$; nebo

$\alpha(\text{spojovací skupina})_n\beta$;

kde n je 0 nebo 1 a α a β jsou příslušné podjednotky těchto hormonů; Moyle, W.R., PCT přihláška WO 95/22340, publikovaná 24.8.1995 a přihláška vynálezce, WO 96/05224, publikovaná 22.2.1996. Objevy těchto dokumentů jsou zde uvedeny jako odkazy.

Formy výše uvedených jednořetězcových forem těchto hormonů, ve kterých bylo odstraněno mnoho cysteinových můstků, jsou popsány v US pořadové č. 08/933693, podané 19.9.1997, která je zde uvedena jako odkaz.

Bylo zjištěno, že α -podjednotka jednořetězcové formy glykoproteinového hormonu $\text{CG}\beta\text{-}\alpha$, se nekovalentně váže na $\text{FSH}\beta$ podjednotku, jak je popsáno v Society for the Study of Reproduction, Abstract 193, 1996.

Nedávno bylo zjištěno, že α -podjednotka jednořetězcového glykoproteinového hormonu, $\text{FSH}\beta\text{-}\alpha$, tvoří nekovalentní vazbu s $\text{GC}\beta$ podjednotkou, jak je popsáno v Endocrine Society, Abstract OR28-3, 1998.

Nyní bylo zjištěno, že je možné použít tyto glykoproteinové

hormony, které mají posílenou agonistickou a/nebo antagonistickou aktivitu a/nebo které jsou multifunkční prostřednictvím buď kovalentní vazby další β -podjednotky na jednořetězcový hormon nebo nekovalentní vazby další β -podjednotky na uvedenou α -podjednotku jednořetězcového hormonu, pro napodobení profilu přirozeného hormonu a/nebo kontrolu poměrů hormonů. Tyto odlišně působící glykoproteinové hormony a jejich terapeutické použití pro léčbu onemocnění jako jsou polycystická ovaria, a pro ovariální hyperstimulaci, jsou popsány dále.

Podstata vynálezu

Vynález poskytuje různě působící glykoproteinové hormony obsahující α podjednotku kovalentně navázanou na β podjednotku za vzniku jednořetězcového hormonu a další β podjednotku, která může být kovalentně navázána na jednořetězcový hormon nebo může být nekovalentně navázaná na α podjednotku jednořetězcového hormonu. Prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být glykosylované, částečně glykosylované nebo neglykosylované a fúzané α a β řetězce z přirozených glykoproteinových hormonů nebo variant mohou být volitelně navázány prostřednictvím spojovací skupiny. Zejména výhodnou spojovací skupinou je karboxy-koncový peptid (CTP), buď jako kompletní jednotka nebo jako varianta, kde mezi varianty patří také její části.

Pokud jsou β -podjednotky stejné, může prostředek obsahující nekovalentně navázanou β -podjednotku působit jako agonista nebo antagonist, ale stupeň aktivity se může značně lišit. Tato variabilita aktivity je způsobena rozdíly v cirkulačních poločasech kovalentně navázaných a nekovalentně navázaných β

podjednotek. Cirkulační poločasy nekovalentně navázaných β -podjednotek jsou kratší než poločasy β -podjednotek kovalentně navázaných na α -podjednotku. Toto je způsobeno disociací komplexu ve fyziologickém prostředí v čase; nicméně, kovalentně navázaná část molekuly zůstává účinným farmaceutickým činidlem.

Například, prostředek obsahující FSH β podjednotku kovalentně navázanou na α -podjednotku, na kterou je nekovalentně navázaná další FSH β podjednotka, bude mít vyšší aktivitu z důvodu delšího cirkulačního poločasu komplexu. Nicméně, aktivita se sníží po ukončení účinku FSH- β podjednotky s kratším poločasem.

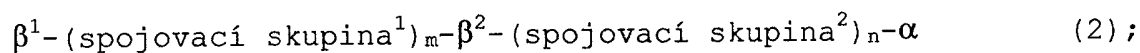
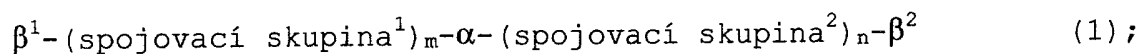
Prostředek obsahující FSH β podjednotku kovalentně navázanou na α -podjednotku, na kterou je nekovalentně navázaná CG β podjednotka, bude mít delší cirkulační poločas pro CG aktivitu. Po dobu trvání kratšího cirkulačního poločasu budou obě FSH β a CG β podjednotky působit na své příslušné receptory. Během delšího poločasu bude aktivní pouze FSH β podjednotka kovalentně navázaná na α -podjednotku.

Ve všech případech, pokud jsou β -podjednotky odlišné, jsou prostředky bifunkční jako agonisté a/nebo antagonisté. Je třeba uvést, že zvyšováním nebo snižováním agonistické aktivity jedné složky vůči druhé je možno dosáhnout různých poměrů aktivity. Například je možno zvýšit poměr FSH/LH použitím FSH podjednotky s vyšší agonistickou aktivitou a/nebo LH podjednotky s nižší agonistickou aktivitou.

V jednom aspektu je vynález zaměřen na způsob dodání různých aktivit glykoproteinových hormonů jedinci, který potřebuje hormonální regulaci.

Termín "aktivita" glykoproteinového hormonu označuje schopnost chovat se jako agonista nebo antagonistu příslušného přirozeného se stejným nebo odlišným biologickým poločasem. Termín "dvě různé aktivity glykoproteinového hormonu" označuje to, že aktivity způsobované každou β podjednotkou prostředku se liší v jednom nebo více směrech. Jedna podjednotka může být agonista a druhá antagonistu; jedna může být modifikována tak, aby měla vyšší aktivitu; jedna může být modifikována tak, aby měla nižší aktivitu; jedna může odpovídat aktivitě LH a druhá aktivitě FSH, nebo může mít jedna dlouhý cirkulační poločas a druhá kratší cirkulační poločas. Použitím různých přirozených β -podjednotek v prostředcích vzorců (1)-(5) nebo použitím variant těchto β -podjednotek mohou být připraveny různé glykoproteinové hormony s různými aktivitami.

V jiném aspektu je vynález zaměřen na glykosylované neb neglykosylované proteiny vzorce:



kde každý z β^1 a β^2 má aminokyselinovou sekvenci β podjednotky glykoproteinového hormonu obratlovců nebo varianty uvedené sekvence, kde uvedené varianty jsou definovány dále. " α " označuje α podjednotku glykoproteinového hormonu obratlovců nebo její variantu; "spojovací skupina" označuje kovalentně navázanou skupinu, která odděluje β^1 a β^2 podjednotky ve vhodných vzdálenostech od α podjednotky a od sebe navzájem. " \approx "

je nekovalentní vazba. Každé m a n jsou nezávisle 0 nebo 1.

Ve všech uvedených případech si prostředky podle předkládaného vynálezu zachovávají konformaci takovou, že použití celých podjednotek v prostředcích není nutné. Vynález tedy zahrnuje prostředky vzorců (1)-(5), které obsahují fragmenty α a/nebo β podjednotek, ve kterých si tyto formy zachovávají biologickou aktivitu vykazovanou příslušnými formami, které obsahují kompletní podjednotky.

Je třeba uvést, že sloučeniny vzorců (1)-(5) mohou být dále modifikovány tak, aby obsahovaly další kovalentně navázané β -podjednotky. Sloučeniny vzorce (2) nebo (3) mohou být nekovalentně asociovány s další β -podjednotkou; prostředky vzorců (4) nebo (5) mohou obsahovat další β -podjednotky v kovalentním řetězci. Dále mohou být také připraveny jiné nekovalentní komplexy, jako jsou β - β dimer s α nebo α - α dimer s β .

V jiném aspektu je vynález zaměřen na způsoby pro přípravu prostředků podle předkládaného vynálezu, na farmaceutické prostředky obsahující prostředky vzorců (1)-(5) a na způsoby jejich použití. Vynález také zahrnuje protilátky specifické pro tyto sloučeniny.

Způsoby provedení vynálezu

Čtyři glykoproteinové hormony u člověka tvoří rodinu, která zahrnuje choriový gonadotropin (CG), thyreostimulační hormon (TSH), luteinizační hormon (LH) a hormon stimulující folikuly (FSH). Termín "glykoproteinové hormony", jak je zde použit, označuje všechny členy této rodiny, jak se vyskytují u člověka a u jiných obratlovců. Všechny tyto přirozené hormony jsou

heterodimery složené z α -podjednotek, které mají - pro daný druh - identickou sekvenci, a β -podjednotek, které jsou různé pro různé členy rodiny. Obvykle se tyto přirozené glykoproteinové hormony vyskytují jako heterodimery složené z α a β -podjednotek, které jsou asociované, ale nesou v kovalentní vazbě. Většina obratlovců vytváří FSH, TSH a LH; choriový gonadotropin byl zjištěn pouze u primátů, včetně lidí, a u březích klisen.

U zvířat jsou α a β -podjednotky každého hormonu kódované různými geny a jsou syntetizovány samostatně a potom jsou sestaveny do nekovalentního heterodimerického komplexu. Ve sloučeninách podle předkládaného vynálezu je alespoň jedna β -podjednotka navázaná přímo na α -podjednotku v jednořetězcové primární struktuře. Trojrozměrná konformace způsobená sekundární a terciární strukturou umožňuje funkci glykoproteinového hormonu způsobenou β -podjednotkou. Další β -podjednotka je navázaná na tento řetězec buď kovalentně (vzorci (1)-(3)), nebo nekovalentní vazbou uvedené α -podjednotky na další β -podjednotku.

Pomocí vhodných změn struktury β -podjednotek může mít prostředek podle předkládaného vynálezu agonistickou a/nebo antagonistickou aktivitu "odpovídající" aktivitě přirozeného hormonu; například mohou mít sloučeniny antagonistickou aktivitu vzhledem k receptoru pro jeden z glykoproteinových hormonů, ale agonistickou aktivitu na receptoru pro jiný hormon, nebo může mít agonistickou nebo antagonistickou aktivitu na obou receptorech. Spektrum aktivit vykazovaných sloučeninami podle předkládaného vynálezu je závislé na výběru použitých jednotlivých α a β -podjednotek a variant, stejně jako na charakteru spojovacích skupin a na orientaci α a β -

podjednotek.

Ve sloučeninách vzorce (1)-(3) jsou všechny tři podjednotky kovalentně vázané; sloučeniny vzorců (4) a (5) obsahují jednořetězcový β - α nebo α - β kovalentně navázaný dimer. Kovalentní vazba je v každém případě proximálně k N- nebo C-konci každé podjednotky a může být, v případě jakýchkoliv dvou podjednotek, hlava-hlava (t.j. na N-koncích obou složek), hlava-hlava (t.j. na C-koncích obou složek), nebo, nejlépe, hlava-pata, kdy je N-konec jedné podjednotky kovalentně navázán na C-konec druhé podjednotky. Fúzní proteiny obsahující vazbu hlava-pata mohou být snadno připraveny za použití standardních rekombinantních technik, při kterých jsou všechny aminokyseliny v podjednotkách a jakékoliv spojovací skupiny kódované genem. Alternativně mohou být sloučeniny podle předkládaného vynálezu připraveny synteticky, kdy v tomto případě mohou být kromě uspořádání hlava-pata použity pro vazbu podjednotek na příslušných koncích spojovací skupiny. Bifunkční spojovací skupiny, včetně heterobifunkčních a homobifunkčních skupin, jsou dostupné od Pierce Chemical Company, Rocford, Illinois. Jsou dostupné spojovací skupiny umožňující vazbu dvou amino-skupin, dvou karboxylových skupin nebo karboxylové skupiny a amino-skupiny. Pokud není vazba přesně na N-konci, je nutná přítomnost aminokyseliny dodávající vedlejší řetězec obsahující funkční skupinu v pozici poblíž konce, kde má být provedena vazba.

Ve výhodných provedeních vynálezu jsou sloučeniny vzorců (1), (2) a (3) fúzní proteiny, ve kterých jsou α a β -podjednotky navázané hlava-pata buď přímo, nebo prostřednictvím peptidových spojovacích skupin, kde sekvenci tvoří pouze aminokyseliny kódované jedním genem. Tyto mohou být syntetizovány rekombinantně. V jiném výhodném provedení

vynálezu obsahují prostředky vzorců (4) a (5) jednořetězcové formy, ve kterých jsou α a β -podjednotky navázány hlava-pata buď přímo, nebo prostřednictvím peptidových spojovacích skupin, a další β -podjednotka je navázána nekovalentně na uvedenou α -podjednotku, kde tento komplex obsahující více domén je tvořen aminokyselinami kódovanými pouze jedním genem. Tento komplex může být také syntetizován rekombinantně. Nicméně, není nutné omezovat prostředky podle předkládaného vynálezu tímto způsobem; α a β -podjednotky, stejně jako spojovací skupiny, mohou obsahovat aminokyseliny, které nejsou kódované genem. Kromě toho, spojovací skupiny mohou být nepeptidové a mohou být tvořeny například dikarboxylovými kyselinami nebo anhydridy, diaminy nebo se může jednat o bifunkční spojovací skupiny dodávané Pierce Chemical Co., Rockford, IL, a podobně. Dále, podjednotky v jednořetězcové formě mohou být navázány buď přímo nebo prostřednictvím spojovací skupiny v konfiguraci hlava-hlava nebo pata-pata, stejně jako v konfiguraci hlava-pata, podle potřeb ve fúzním proteinu. Za těchto okolností mohou být při konfiguraci hlava-hlava dvě amino skupiny navázány prostřednictvím anhydridu nebo derivátu dikarboxylové kyseliny; dvě karboxylové skupiny mohou být navázány prostřednictvím diaminu nebo diolu za použití standardních aktivačních technik.

Nicméně, nejvýhodnější formou je konfigurace hlava-pata, pro kterou jsou dostačující standardní peptidové vazby a jednořetězcová forma může být připravena jako fúzní protein rekombinantně nebo pomocí technik peptidové syntézy, buď v jedné sekvenci reakcí nebo - lépe - ligací jednotlivých částí celé sekvence.

Bez ohledu na určité provedení jsou α a β -podjednotky navázány na zbytek molekuly v pozici poblíž jejich N- a C-

konce. Je výhodné, aby byly tyto podjednotky navázané přímo na svých koncích; nicméně, vazba může být pouze poblíž těchto konců. Termín "poblíž" označuje pozici, která je v 10 aminokyselinách, výhodně v 5 aminokyselinách, lépe ve 2 aminokyselinách a nejlépe na konci jako takovém. Jak bylo uvedeno výše, když je vazba jinde než na N- či C-konci jako takovém, musí být v pozici poblíž konce přítomny vedlejší řetězce obsahující funkční skupiny.

Podjednotkové složky

Termíny "společná α -podjednotka" a FSH, TSH, LH a CG β -podjednotka", jak jsou zde použity, mají běžné definice a označují proteiny mající aminokyselinové sekvence známé v oboru nebo jejich alelické varianty, bez ohledu na charakter glykosylace nebo jinou derivatizaci vedlejších řetězců aminokyselin.

"Přirozené" formy peptidů jsou ty formy, které mají aminokyselinové sekvence izolované z relevantních tkání obratlovců nebo sekvence alelických variant.

"Variantní" formy těchto proteinů a CTP jednotek jsou ty formy, které odpovídají přirozeným podjednotkám, ale které mají libovolné alterace, včetně zkrácení, v aminokyselinové sekvenci přirozeného proteinu, které byly připraveny, například, místně cílenou mutagenesí nebo jinou rekombinantní technikou, nebo které byly připraveny synteticky.

Vzniklé "varianty" se mohou chovat jako agonisté nebo antagonisté. Agonista může mít zesílenou nebo zeslabenou aktivitu ve srovnání s přirozenou formou. Úpravou úrovně aktivity ve dvou β -podjednotkách použitých v prostředku podle

předkládaného vynálezu je možno provést změnu poměru účinků hormonů. Například, použitím LH složky se sníženou aktivitou a FSH β podjednotky s normální nebo vyšší aktivitou může být zvýšen poměr FSH/LH aktivity.

Alterace vedoucí ke vzniku variant se skládají z 1-10, lépe 1-8 a nejlépe 1-5 aminokyselinových změn, včetně delecí, insercí a substitucí, nejlépe konzervativních aminokyselinových substitucí. Vzniklá varianta si musí zachovávat aktivitu, která ovlivňuje příslušnou aktivitu přirozeného hormonu - t.j. musí si zachovávat biologicko aktivitu příslušného hormonu, takže se chová jako agonista, nebo se musí chovat jako antagonist, kdy v tomto případě je obvykle schopen vazby na receptory pro přirozený hormon, ale není schopen vyvolat přenos signálu.

Termín "konzervativní substituce" označuje, v běžném významu, substituci, při které je zbytek substituován aminokyselinou stejné kategorie. Aminokyseliny byly rozděleny do takových skupin, jak je v oboru známo, viz například Dayhoff, M. et al., Atlas of Protein Sequences and Structure (1972), 5: 89-99. Obecně jsou aminokyseliny děleny acidické, basické, neutrální atd. přesnější klasifikace je uvedena ve WO 96/05224, která je zde uvedena jako odkaz.

Jednou sadou výhodný variant je ta, kde jsou změněna glykosylační místa jedné nebo obou α a β -podjednotek. Některé užitečné varianty těchto čtyř hormonů jsou popsány v U.S. patentu 5177193, uděleném 5.1.1993, který je zde uveden jako odkaz. Jak je uvedeno v tomto patentu, charakter glykosylace může být pozměněn zrušením příslušných míst, nebo alternativně, volbou hostitelské buňky, ve které je protein produkován.

Alterace aminokyselinové sekvence také zahrnují inserce a delece. mezi varianty hormonů také patří jejich zkrácené formy, například mutanty α -podjednotky, které neobsahují některé nebo všechny aminokyseliny v pozicích 88-92 na C-konci. Dále sem patří α -podjednotky s delecí 1-10 aminokyselin z N-konce.

Mezi varianty také patří ty sloučeniny, ve kterých byly pozměněny nebo odstraněny nezásadní regiony. Takové delece a alterace mohou postihovat celé smyčky, takže mohou být deletovány sekvence výrazně větší než 10 aminokyselin. Vzniklá varianta si však musí zachovávat alespoň domény pro vazbu na receptor s nebo bez domén nutných pro přenos signálu.

Existuje rozsáhlá literatura týkající se variant glykoproteinových hormonů a je jasné, že může být připraveno velké množství variant majících agonistickou nebo antagonistickou aktivitu. Takové varianty jsou popsány, například, v Chen, F. et al., *Molec. Endocrinol.* (1992) 6 914-919; Yoo, J. et al., *J. Biol. Chem.* (1993) 268: 13034-13042; Yoo, J. et al., *J. Biol. Chem.* (1991), 17741-17743; Puett, D. et al., *Glycoprotein Hormones*, Lusbader, J.W. et al., ed., Springer Verlag New York (1994) 122-134; Kuetmann, H.T. et al. (ibid.) strany 103-117; Erickson, L.D. et al., *Endocrinology* (1990), 126: 2555-2560; a Bielineska, M. et al., m (1990) 111: 330a)abstrakt 1844).

Další varianty zahrnují ty, ve kterých je deletována jedna nebo více cysteinových vazeb, obvykle pomocí substituce neutrální aminokyseliny za jeden nebo více cysteinů, které se účastní na vazbě. Zejména vhodné cysteinové vazby pro delecí jsou ty, které jsou mezi pozicemi 26 a 110 a mezi pozicemi 23

a 72.

Dále bylo zjištěno, že β -podjednotky těchto čtyř hormonů mohou být konstruovány v chimerické formě tak, aby měly biologické funkce obou složek chimerické formy, nebo obecně, hormonů s pozměněnou biologickou funkcí. Chimerické molekuly vykazující aktivity FSH i LH/CG mohou být připraveny způsobem popsáným v Moyle, Proc. Natl. Acad. Sci. (1991) 88: 760-764; Moyle, Nature (1994) 368: 251-255. Jak je popsáno v uvedených člancích, substituce aminokyselin 101-109 FSH- β příslušnými zbytky CG- β -podjednotky vede k zisku analogu s aktivitou hCG a FSH.

Termíny "peptid" a "protein" jsou zaměnitelné, protože jejich odlišení podle délky je arbitrážní.

Jak bylo uvedeno výše, "varianty" použité jako α a β -podjednotky při přípravě sloučenin podle předkládaného vynálezu s nebo bez spojovacích skupin mohou představovat kompletní aminokyselinové sekvence podjednotek nebo pouze jejich části.

"Varianty" také zahrnují α a/nebo β řetězce obsahující CTP (nebo variantu CTP) insertovanou do nekritického regionu.

"varianty" mohou být agonisté nebo antagonisté hormonu obsahující příslušné přirozené β -podjednotky - t.j. "varianta" β -podjednotky LH bude mít agonistickou nebo antagonistickou aktivitu vzhledem k LH. Agonistická aktivita může být stejná, vyšší nebo nižší než aktivita přirozené β -podjednotky.

"Nekritické" regiony α a β -podjednotky jsou ty regiony

molekuly, které nejsou nutné pro biologickou aktivitu (včetně agonistické a antagonistické aktivity). Obecně, tyto regiony jsou odstraněny z vazebných míst, prekursorových štěpicích míst a katalytických regionů. Musí být vyhodnoceny regiony zásadní pro správné skládání, vazbu na receptory, katalytickou aktivitu a podobně. Je třeba uvést, že některé regiony, které jsou kritické v případě α a β interakcí v dimeru, jsou nekritické v jednořetězcové sloučenině, protože konformace molekuly může v tomto případě vyloučit nezbytnost těchto regionů. Určení nekritických regionů se snadno provede delecí nebo modifikací vybraných regionů a provedením vhodného testu na požadovanou aktivitu. Regiony, ve kterých vede modifikace ke ztrátě aktivity, jsou kritické; regiony, ve kterých modifikace vede ke stejné nebo podobné aktivitě (včetně antagonistické aktivity), jsou považovány za nekritické.

Je třeba znovu zdůraznit, že "aktivitou" je míněna aktivita, která je buď agonistická, nebo antagonistická vzhledem k příslušnému přirozenému hormonu. Některé regiony jsou tedy kritické pro antagonistické chování varianty, i když antagonistu nemá přímé fyziologické účinky hormonu.

Například, pro α -podjednotku se považují pozice 33-59 za pozice nutné pro přenos signálu a 20 aminokyselinový řetězec na karboxylovém konci je nutný pro přenos signálu/vazbu na receptor. Zbytky kritické pro sestavení s β -podjednotkou jsou nejméně zbytky 33-58, zejména 37-40. Když je nekritický region "poblíž" N- nebo C-konce, tak je inserce provedena v jakýchkoliv 10 aminokyselinách konce, lépe v 5 aminokyselinách a nejlépe na konci samotném.

Termín "CTP jednotka", jak je zde použit, označuje aminokyselinovou sekvenci z karboxylového konce β -podjednotky

lidského choriového gonadotropinu v rozsahu od aminokyselin 112-118 do zbytku 145 na C-konci nebo na jeho části. Každá "kompletní" CTP jednotka obsahuje 28-34 aminokyselin, podle N-konce CTP.

"Částečná" CTP jednotka je tvořena aminokyselinovou sekvencí mezi zbytky 112-118 a 145 čteně, ve které byla alespoň jedna aminokyselina deletována z nejkratší možné "kompletní" CTP jednotky (t.j. od pozic 118-145). Tyto "částečné" sekvence jsou zahrnuty v termínu "varianta". "Částečná" CTP jednotka výhodně obsahuje alespoň jedno O-glykosylační místo. CTP jednotka obsahuje čtyři glykosylační místa na serinových zbytcích v pozicích 121 (místo 1); 127 (místo 2); 132 (místo 3); a 138 (místo 4). Částečné formy CTP použitelné jako agonisté budou obsahovat jedno nebo více z těchto míst uspořádaných jako v přirozené CTP sekvenci, ačkoliv místa mezi nimi mohou být vynechána. Některé neglykosylované formy hormonů jsou antagonisté a mohou být použity jako antagonisté.

V některých případech mohou být CTP jednotky insertovány nebo použity jako spojovací skupiny v tandemu. "Tandemové" inserce nebo prodloužení označuje to, že insert nebo prodloužení obsahuje alespoň dvě "CTP jednotky". Každá CTP jednotka může být kompletní nebo se může jednat o fragment, a může být přirozená nebo variantní. Všechny CTP jednotky v tandemovém prodloužení nebo insertu mohou být identické nebo mohou být různé.

"Spojovací skupina" je skupina, která spojuje α a β sekvence bez interference s aktivitou vykazovanou stejnými α a β řetězci jako součástmi hormonu, nebo která mění jejich aktivitu z agonistické na antagonistickou. Úroveň aktivity se může

měnit v rozumném rozsahu, ale přítomnost spojovací skupiny nemůže zbavit jednořetězcový hormon významné části agonistické nebo antagonistické aktivity. Jednořetězcová formy musí vykazovat aktivitu podobnou hormonální aktivitě přirozených hormonů, jejichž prvky tvoří jejich složky.

Termín "≈" nebo "nekovalentní vazba" označuje nekovalentní vazbu mezi α -podjednotkou kovalentně navázanou na β^1 -podjednotku a další β^2 -podjednotkou.

Výhodná provedení různě účinkujících glykoproteinových hormonů

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou neúčinněji a neekonomičtěji produkovány rekombinantními technikami. Proto jsou výhodné jednořetězcové proteiny obsahující ty formy α a β řetězců, CTP jednotek a jiných spojovacích skupin, které obsahují pouze aminokyseliny kódované genem. Je možné, nicméně, jak bylo uvedeno výše, připravit alespoň části jednořetězcových hormonů za použití technik peptidové syntézy a tak připravit varianty, které obsahují aminokyseliny nekódované genem a nepeptidové spojovací skupiny, které také spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

V jednom výhodném provedení je C-konec β^1 -podjednotky kovalentně navázán, volitelně prostřednictvím spojovací skupiny, na N-konec zralé α -podjednotky, která je potom navázána - volitelně prostřednictvím spojovací skupiny - na β^2 -podjednotku. Vazbou může být přímá peptidová vazba, při které je C-koncová aminokyselina jedné podjednotky navázána přímo peptidovou vazbou na N-konec jiné; nicméně, v mnoha případech je vhodné použití spojovací skupiny mezi dvěma konci. V mnoha případech způsobí spojovací skupina alespoň jednu β otočku mezi

dvěma řetězci. Přítomnost prolinových zbytků ve spojovací skupině může být proto výhodná.

(Je třeba si uvědomit, že při diskusi o vazbách mezi konci podjednotek v jednořetězcové formě může být jeden nebo více konců pozměněn substitucí a/nebo delecí, jak je popsáno výše).

V jedné zejména výhodné sadě provedení je vazbou vazba hlava-pata a spojovací skupina obsahuje jednu nebo více CTP jednotek a/nebo jejich variant nebo zkrácených forem. Výhodné formy CTP jednotek použité v takových spojovacích skupinách jsou popsány dále.

Kromě použití jako spojovací skupiny mohou být CTP a varianty CTP použity v jakémkoli nekritickém regionu podjednotek pro vytvoření jednořetězcového hormonu, jak je popsáno výše.

Ačkoliv jsou vhodnými spojovacími skupinami CTP jednotky, může být spojovací skupinou jakýkoliv vhodný kovalentně navázaný materiál, který umožňuje dosažení vhodných prostorových vztahů mezi α a β -podjednotkami. Pro konfiguraci hlava-pata může být spojovací skupinou bivalentní skupina, jako je peptid obsahující arbitrážní počet, ale obvykle méně než 100, lépe méně než 50 aminokyselin, které mají správný poměr hydrofilnosti/hydrofobnosti pro dosažení vhodné rozložení a konformace v roztoku, nebo se jedná o nepeptidovou spojovací skupinu, která způsobuje tyto charakteristiky. Obecně by měla být spojovací skupina vyváženě hydrofilní, aby zůstávala v okolním roztoku a neinterferovala s interakcí mezi α a β -podjednotkami nebo dvěma β -podjednotkami. Je výhodné, aby spojovací skupina obsahovala β -závity, obvykle dodané prolinovými zbytky v peptidové spojovací skupině, nebo aby

obsahovala serinové a/nebo glycinové zbytky. Může být použit jakýkoliv vhodný polymer, včetně peptidových spojovacích skupin, s výše uvedenými charakteristikami.

Zejména výhodnými provedeními jednořetězcových forem podle předkládaného vynálezu jsou následující konfigurace hlava-pata:

β FSH- α - β FSH; α . β FSH- β LH; β FSH- α - β LH;

β LH- α - β LH; α - β LH- β FSH; β LH- α - β FSH;

β TSH- α - β TSH; β TSH- β FSH- α ; β TSH- α - β FSH;

β CG- α - β CG; α - β CG- β FSH; α - β CG- β TSH; β CG- β FSH- α ; β CG- α - β TSH;

β FSH-CTP- α β FSH; α - β FSH-CTP- β LH; β FSH-CTP- α - β LH;

β LH-CTP- α β LH; α - β LH-CTP- β FSH; β LH- α -CTP- β FSH;

β LH(δ 115-123)- α - β FSH; β LH(δ 115-123)-CTP- α - β FSH;

β CG-CTP- α -CTP- β FSH-CTP-CTP;

β TSH-CTP-CTP- α β FSH-CTP-CTP;

β FSH-CTP-CTP- α β LH; β LH-CTP-CTP- β LH- α ;

β CG-CTP-CTP- α - β TSH; β CG-CTP-CTP- β LH- α ;

β FSH-CTP- β LH(δ 115-123)-CTP- α ;

a podobně. Také výhodné jsou lidské formy podjednotek. Ve výše uvedených konstruktech označuje "CTP" CTP nebo jeho varianty včetně zkrácených forem, jak je popsáno v PCT přihlášce WO 96/05224.

V jednom provedení je C konec β^1 -podjednotky kovalentně navázán, volitelně prostřednictvím spojovací skupiny, na N-konec zralé α -podjednotky, která je potom nekovalentně navázaná na další β^2 -podjednotku. α a β -podjednotky v jednořetězcové formě podle předkládaného vynálezu umožňují nekovalentní navázání další β -podjednotky na uvedenou α -podjednotku. Zejména výhodná provedení prostředků vzorce (4) a (5) pro použití v předkládaném vynálezu jsou následující

konfigurace hlava-pata (pro jednořetězcovou složku):

$\beta\text{FSH-}\alpha \approx \beta\text{FSH}$; $\beta\text{FSH-}\alpha \approx \beta\text{CG}$; $\beta\text{FSH-}\alpha \approx \beta\text{LH}$; $\beta\text{FSH-}\alpha \approx \beta\text{TSH}$;

$\beta\text{CG-}\alpha \approx \beta\text{CG}$; $\beta\text{CG-}\alpha \approx \beta\text{FSH}$; $\beta\text{CG-}\alpha \approx \beta\text{LH}$; $\beta\text{CG-}\alpha \approx \beta\text{TSH}$;

$\beta\text{LH-}\alpha \approx \beta\text{LH}$; $\beta\text{LH-}\alpha \approx \beta\text{FSH}$; $\beta\text{LH-}\alpha \approx \beta\text{CG}$; $\beta\text{LH-}\alpha \approx \beta\text{TSH}$;

$\beta\text{TSH-}\alpha \approx \beta\text{TSH}$; $\beta\text{TSH-}\alpha \approx \beta\text{CG}$; $\beta\text{TSH-}\alpha \approx \beta\text{LH}$; $\beta\text{TSH-}\alpha \approx \beta\text{FSH}$;

$\beta\text{FSH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{FSH}$; $\beta\text{CG} \approx \alpha\text{-}\beta\text{CG}$; $\beta\text{LH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{FSH}$; $\beta\text{TSH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{FSH}$;

$\beta\text{CG} \approx \alpha\text{-}\beta\text{CG}$; $\beta\text{FSH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{CG}$; $\beta\text{LH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{CG}$; $\beta\text{TSH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{CG}$;

$\beta\text{LH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{LH}$; $\beta\text{FSH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{LH}$; $\beta\text{CG} \approx \alpha\text{-}\beta\text{LH}$; $\beta\text{TSH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{LH}$;

$\beta\text{TSH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{TSH}$; $\beta\text{CG} \approx \alpha\text{-}\beta\text{TSH}$; $\beta\text{LH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{TSH}$; $\beta\text{FSH} \approx \alpha\text{-}\beta\text{TSH}$; a

podobně. Tak se v jednom provedení navázaná β -podjednotka a další β -podjednotka od sebe liší. Například, pokud je navázanou β -podjednotkou β -podjednotka FSH nebo varianta a nekovalentně navázanou β -podjednotkou je β -podjednotka CG nebo varianta, tak má vzniklá sloučenin schopnost působit na FSH a CG receptory současně. Nekovalentně vázaná β -podjednotka může mít agonistickou nebo antagonistickou aktivitu, nezávisle na aktivitě první β -podjednotky. Dále, další β -podjednotka může mít jiný cirkulační poločas než první β -podjednotka. Tento rozdíl v cirkulační aktivitě β -podjednotek umožňuje připravení různých úrovní aktivity v čase.

V jiném výhodném provedení předkládaného vynálezu jsou první β -podjednotka a druhá β -podjednotka stejné nebo navzájem variantní. Například, kovalentně je navázaná FSH β -podjednotka a nekovalentně je navázaná FSH β -podjednotka. Provedení tohoto typu může zvyšovat agonistickou nebo antagonistickou aktivitu. Aktivita bude nejvyšší během trvání kratšího poločasu. Z důvodu delšího cirkulačního poločasu první β -podjednotky (kde dvě β -podjednotky jsou jinak identické) má po ukončení účinnosti nekovalentně navázané β -podjednotky jednořetězcová forma stále ještě aktivitu, která je však slabší.

Jiné provedení předkládaného vynálezu je provedení, ve kterém je β -podjednotka mutována tak, že má nižší nebo vyšší aktivitu ve srovnání s jinými β -podjednotkami. Například, první α -podjednotka mající LH antagonistickou aktivitu v kombinaci s β -podjednotkou mající FSH agonistickou aktivitu budou mít vyšší poměr FSH/LH, který je vhodný pro vývoj folikulu a oplodnění. Pokud je žádoucí kratší cirkulační poločas LH aktivity, tak může mít první β -podjednotka FSH aktivitu a druhá β -podjednotka může mít LH aktivitu.

Pro použití u člověka jsou vhodné lidské α a β -podjednotky, zatímco odpovídající formy od jiných obratlovců jsou vhodné pro veterinární použití. FSH, TSH a LH podjednotky od skotu, ovcí, koní, prasat, koček, psů a jiných druhů jsou vhodné pro použití u těchto druhů.

V některých provedeních může spojovací skupina obsahovat další léčivo. Takovými léčivy mohou být peptidy nebo proteiny, jako jsou insulinu podobné růstové faktory, epidermální růstové faktory, kyselé nebo bazické fibroblastové růstové faktory, trombocytární růstové faktory, různé faktory stimulující kolonie, jako je granulocytární CSF, makrofágový CSF a podobně, stejně jako různé cytokiny, jako je IL-2, IL-3 a mnoho dalších interleukinů, různé interferony, faktor nekrosy nádorů a podobně. Mohou být obsažena vhodná cílová místa pro uvolnění těchto léčiv, jako jsou cílové sekvence pro proteasy, jejichž cílová místa nejsou přítomna v α a β -podjednotkách. Peptidová nebo proteinová léčiva mají výhodu v tom, že celý konstrukt může být rychle produkován rekombinantní expresí jediného genu. Také mohou být použita léčiva s malou molekulou, jako jsou antibiotika,

protizánětlivá léčiva, toxiny a podobně.

Obecně, léčiva obsažená ve spojovací skupině jsou ta léčiva, která mají působit poblíž receptorů, na které se hormony obvykle váží. Spojovací skupina by měla obsahovat nástroj pro uvolnění léčiva z vazby, jako jsou například místa pro štěpení katalyzované enzymem, jak je dále popsáno v části „Způsoby přípravy“.

Dále, pokud je to žádoucí, může být doba, po kterou je léčivo aktivní a přítomné v cirkulaci, omezena kratším cirkulačním poločasem nekovalentně navázané β -podjednotky. Toto může být provedeno tak, že léčivo je obsaženo v nekovalentně navázané β -podjednotce místo v jednořetězcové formě.

Další modifikace

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být dále konjugovány nebo derivatizovány způsoby známými pro derivatizaci aminokyselinových sekvencí, jako je fosforylace, glykosylace, deglykosylace řádně glykosylovaných forem, acylace, modifikace vedlejších řetězců aminokyselin (například konverze prolinu na hydroxyprolin) a podobné modifikace analogické k postranslačním dějům, které se mohou vyskytovat.

Stav glykosylace hormonů podle předkládaného vynálezu je zejména významný. Hormony mohou být připraveny v neglykosylované formě buď produkcí v prokaryotických hostitelích, nebo mutací glykosylačních míst normálně přítomných v podjednotkách a/nebo jakýchkoliv CTP jednotkách, které mohou být přítomny. Glykosylované verze a částečně glykosylované verze hormonů mohou být připraveny úpravou glykosylačních míst. Glykosylované verze jsou, samozřejmě,

součástí předkládaného vynálezu.

Jak je v oboru všeobecně známo, mohou být sloučeniny podle předkládaného vynálezu také navázány na značky, nosiče, pevné nosiče a podobně, podle požadované aplikace. Značené formy mohou být použity pro sledování jejich metabolického zpracování; vhodnými značkovacími činidly pro tento účel jsou zejména radioizotopová značkovací činidla, jako je jod 131, technecium 99, indium 111 a podobně. Značkovací činidla mohou být také použita pro detekci jednořetězcových proteinů v testovacích systémech; v tomto případě mohou být použity radioizotopy, stejně jako enzymy, fluorescenční činidla, chromogenní činidla a podobně. Použití takových značkovacích činidel umožňuje lokalizování relevantních receptorů, protože mohou být použita jako činidla cíleně se vážící na takové receptory.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být navázány na nosiče pro zvýšení jejich imunogenicity při přípravě protilátek specificky imunoreaktivních s těmito novými modifikovanými formami. Vhodnými nosiči pro tento účel jsou přílipkový hemokyanin (KLH), hovězí sérový albumin (BSA) a difterický toxoid a podobně. Pro navázání modifikovaných peptidů podle předkládaného vynálezu na nosiče, včetně bifunkčních spojovacích skupin, mohou být použity standardní techniky.

Podobné techniky navazování, kromě jiných technik, mohou být použity pro navázání proteinů podle předkládaného vynálezu na pevné nosiče. Po navázání mohou být tyto proteiny použity jako afinitní činidla pro separaci požadovaných složek, se kterými proběhne specifická reakce. Proto jsou použitelné při přečištění a izolování receptorů, se kterými interaguje

vybraná β -podjednotka.

Způsoby přípravy

Způsoby pro přípravu sloučenin podle předkládaného vynálezu jsou dobře známé v oboru. Jak bylo uvedeno výše, pokud jsou použity aminokyseliny kódované jedním genem a jednořetězcová forma má konfiguraci hlava-pata, tak je v současnosti nejvýhodnějším způsobem rekombinantní syntéza těchto materiálů pomocí exprese DNA kódující požadovaný proteiny nebo proteiny. DNA obsahující nukleotidovou sekvenci kódující jednořetězcovou formu obsaženou v prostředku podle předkládaného vynálezu, včetně variant, může být připravena z nativních sekvencí nebo může být syntetizována de novo nebo může být připravena kombinováním těchto technik. Techniky pro místně cílenou mutagenesi, ligaci dalších sekvencí, amplifikační techniky jako je PCR, a konstrukce vhodných expresních systémů, jsou dobře známé v oboru. Části nebo celá DNA kódující požadovaný protein může být syntetizována za použití standardních technik syntézy na pevné fázi, výhodně tak, aby obsahovaly restriční místa pro usnadnění ligace. Vhodné kontrolní elementy pro transkripci a translaci obsažené kódující sekvence mohou být dodána k DNA kódující sekvenci. Jak je dobře známo, expresní systémy jsou v současnosti kompatibilní s mnoha hostiteli, včetně prokaryotických hostitelů, jako je *E. coli* nebo *B. subtilis*, a eukaryotických hostitelů, jako jsou kvasinky, jiné houby jako je *Aspergillus* a *Neurospora*, rostlinné buňky, hmyzí buňky, savčí buňky jako jsou CHO, ptačí buňky, a podobně.

Volba hostitele je zejména významná pro posttranslační zpracování, zejména pro glykosylaci. Lokalizace glykosylace je nejvíce kontrolována charakterem glykosylačních míst v molekule; nicméně, charakter sacharidů obsazujících tato

místa je určován typem hostitele. V souladu s tím může být jemné doladění vlastností hormonů podle předkládaného vynálezu provedeno správnou volbou hostitele.

Zejména výhodnou formou genu pro α -podjednotku, ať modifikovanou, nebo nemodifikovanou, je "minigenová" konstrukce. Termín "minigen pro α -podjednotku", jak je zde použit, označuje genový konstrukt popsany v Matzuk, M.M. et al., Mol. Endocrinol. (1988) 2: 95-100, v popisu přípravy pM²(CG α nebo pM²/ α).

Pro rekombinantní produkci jsou použity modifikované hostitelské buňky využívající expresní systémy a tyto buňky jsou kultivovány za produkce požadovaného proteinu. Termíny použité v popisu mají následující významy:

"Modifikovaná" rekombinantní hostitelská buňka, tj. "buňka modifikovaná tak, aby obsahovala" rekombinantní expresní systém podle předkládaného vynálezu, je hostitelská buňka, která byla pozměněna tak, aby obsahovala tento expresní systém, jakýmkoliv vhodným způsobem jeho vložení, jako je transfekce, virová infekce atd. Termín "modifikované buňky" označuje buňky obsahující tento expresní systém, ať integrovaný do chromosomu nebo extrachromosomální. "Modifikované buňky" mohou být stabilní s ohledem na expresní systém nebo může být kódující sekvence exprimována dočasně. Stručně, rekombinantní hostitelská buňka "modifikovaná" expresním systémem podle předkládaného vynálezu označuje buňku, která obsahuje tento expresní systém v důsledku úpravy, nikoliv za přirozených okolností, bez ohledu na způsob provedení vložení tohoto systému.

Termín "expresní systém" označuje DNA molekulu, která obsahuje kódující nukleotidovou sekvenci, která má být exprimována, a doprovodné kontrolní sekvence nutné pro dosažení exprese kódující sekvence. Obvykle patří mezi tyto kontrolní sekvence promotor, terminační sekvence a - v některých případech - operátor nebo jiný prvek regulující expresi. Kontrolní sekvence jsou ty sekvence, které jsou funkční v určitých cílových rekombinantních hostitelských buňkách a proto musí být hostitelské buňky vybrány tak, aby byly kompatibilní s kontrolními sekvencemi v konstruovaném expresním systému.

Sekrece produkovaného proteinu je obvykle žádoucí. Proto jsou nukleotidové sekvence kódující signální peptid také obsaženy, takže je produkován signální peptid operativně navázaný na požadovaný jednořetězcový hormon za vzniku preproteinu, který je - po sekreci - štěpen za uvolnění jednořetězcového hormonu nebo požadované β -podjednotky. Glykoproteinové hormony jsou za normálních okolností secernovanými proteiny a použité signální sekvence mohou být signální sekvence hormonů samotných, nebo mohou být tyto sekvence heterologní k hormonům. Ačkoliv to není výhodné, může být intracelulární produkce hormonů provedena vhodnou úpravou kódujících genů.

Termíny "buňky", "buněčné kultury" a "buněčné linie" jsou použity zaměnitelně bez nějakých odlišností významů. Pokud je odlišení mezi těmito termíny důležité, vyplýne z kontextu. Při uvedení jednoho z těchto termínů jsou míněny i ostatní.

Produkovaný protein může být získán z lyzátu buněk, pokud je produkován intracelulárně, nebo z media, pokud je secernován. Techniky pro získání rekombinantních proteinů

z buněčných kultur jsou dobře známé v oboru a tyto proteiny mohou být přečištěny za použití známých technik, jako je chromatografie, gelová elektroforesa, selektivní srážení a podobně.

Při rekombinantní produkci sloučenin vzorců (1) až (3) se použije jeden expresní systém obsahující nukleotidovou sekvenci kódující sloučeniny těchto vzorců. Pro sloučeniny vzorců (4) a (5) se výhodně použijí dva expresní systémy, oba obsažené v rekombinantním hostiteli. Tak bude buňka obsahovat jeden expresní systém pro konstrukci α -(spojovací skupina)_m β^1 nebo β^1 -(spojovací skupina)_m- α část sloučeniny, který obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující tento jednořetězcový peptid, a dále bude obsahovat expresní systém kódující β^2 . Dva expresní systémy mohou být obsaženy v jediném vektoru, v chromosomu hostitele, na samostatných vektorech, nebo může být jeden expresní systém na chromosomu a druhý může být na extrachromosomálně se replikujícím vektoru. Alternativně může být použit dicistronický expresní systém obsahující obě nutné kódující nukleotidové sekvence, buď na extrachromosomálně se replikujícím vektoru nebo v chromosomu hostitelské buňky. V ještě jiném způsobu mohou být dvě nekovalentně navázané složky připraveny samostatně a mohou být asociovány za vhodných podmínek in vitro. Podmínky usnadňující sestavení sloučenin vzorců (4) nebo (5) budou jasné odborníkům v oboru a budou napodobovat intracelulární podmínky.

Dále, celé nebo části sloučenin podle předkládaného vynálezu mohou být syntetizovány přímo za použití technik peptidové syntézy známých v oboru. Syntetizované části mohou být ligovány a místa pro uvolňování jakýchkoliv léčiv obsažených ve spojovací skupině mohou být vložena standardními technikami. Pro ta provedení, která obsahují aminokyseliny,

které nejsou kódované genem a pro ta provedení, kde je použita konfigurace hlava-pata nebo pata-pata, musí být syntéza alespoň částečně na proteinové úrovni. Vazby hlava-hlava na přirozených N-koncích nebo v pozicích poblíž N-konců mohou být připraveny pomocí spojovacích skupin, které obsahují funkční skupiny reaktivní s amino skupinami, jako jsou deriváty dikarboxylových kyselin. Konfigurace pata-pata na C-koncích nebo v pozicích poblíž C-konců může být připravena za použití spojovacích skupin, kterými jsou diaminy, dioly nebo jejich kombinace.

Protilátky

Proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro přípravu protilátek specificky imunoreaktivních s glykoproteinovými hormony obsahujícími více domén podle předkládaného vynálezu. Tyto protilátky jsou použitelné v mnoha diagnostických a terapeutických aplikacích.

Protilátky jsou obvykle připraveny za použití standardních imunizačních protokolů u savců jako jsou králíci, myši, ovce nebo krysy a tyto protilátky jsou titrovány jako polyklonální antiséra pro zajištění adekvátní imunizace. Polyklonální antiséra mohou být získána a jako taková mohou být použita v, například, imunotestech. Buňky secernující protilátky, jako jsou například buňky sleziny nebo leukocyty periferní krve, mohou být imortalizovány známými technikami a mohou být testovány na produkci monoklonálních protilátek imunospécifických pro proteiny podle předkládaného vynálezu.

Termín "protilátka", od jakéhokoliv druhu, včetně člověka, zahrnuje jakýkoliv fragment, který si zachovává požadovanou imunospécifitu, jako například Fab, Fab' nebo F(ab')₂ Fv atd.

Tak mohou být protilátky připraveny také za použití rekombinantních technik, obvykle izolací nukleotidové sekvence kódující alespoň variabilní regiony monoklonálních protilátek s požadovanou specificitou a konstrukcí vhodných expresních systémů. Tento přístup umožňuje jakékoliv požadované modifikace, jako je produkce Fv forem, chimerických forem, "humanizovaných" forem a podobně.

Výraz "imunospesifické pro proteiny podle předkládaného vynálezu" označuje protilátky, které se specificky váží na dané sloučeniny podle předkládaného vynálezu, ale ne na přirozené glykoproteinové hormony nebo na jednotlivé podjednotky nebo jiné samostatné jednořetězcové jednotky, které obsahují pouze jednu β -podjednotku, v souladu s obecnými parametry afinity a neafinity. Je třeba si uvědomit, že specificita je relativní pojem a že musí být určen arbitrážní limit, jako je rozdíl specifické vazby 100-násobný nebo vyšší. Tak je imunospesifická protilátka podle předkládaného vynálezu alespoň 100-násobně reaktivnější s komplexem obsahujícím více domén než s příslušným přirozeným hormonem, předchozími známými jednořetězcovými formami nebo samostatnými podjednotkami. Takové protilátky mohou být získány, například, vyhledáváním těch protilátek, které se váží na sloučeniny podle předkládaného vynálezu a odstraňováním těch, které se také váží na přirozené hormony, podjednotky nebo dříve známé jednořetězcové formy uvedené ve WO 95/22340 a WO 96/05224.

Prostředky a způsoby použití

Proteiny podle předkládaného vynálezu jsou připraveny a podány za použití způsobů podobných známým způsobům pro heterodimery s celkovou podobností. Použité prostředky a způsoby podání se budou lišit podle konkrétního použitého

hormonu a kombinace. Nicméně, dávka a frekvence podání mohou být odlišné ve srovnání s přirozenými heterodimery, zejména pokud jsou přítomné CTP jednotky, protože je jejich přítomností prodloužen biologický poločas.

Prostředky pro proteiny podle předkládaného vynálezu jsou typická proteinová nebo peptidová léčiva, jak jsou popsána v Remington's Pharmaceutical Sciences, poslední vydání, Mack Publishing Company, Easton, PA. Obecně, proteiny jsou podávány injekčně, obvykle intravenosně, intramuskulárně, podkožně nebo intraperitoneálně, nebo v prostředcích pro transslizniční nebo transdermální podání. Mohou být použity i jiné způsoby podání, jako je podání ve formě čípků. Tyto prostředky obvykle obsahují detergentní činidlo nebo činidlo zesilující penetraci, jako jsou žlučové sole, fusidické kyseliny a podobně. Tyto prostředky mohou být podány jako aerosoly nebo čípky, nebo - v případě transdermálních prostředků - ve formě kožních náplastí. Orální podání je také možné, s podmínkou, že prostředek chrání peptidy podle předkládaného vynálezu před degradací v trávicím systému.

Optimalizace dávkování a prostředků se provede běžným způsobem. Tyto prostředky mohou být také modifikovány tak, aby byly vhodné pro veterinární použití.

Prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být použity mnoha způsoby, nejčastěji jako substituce za přirozené formy hormonů. Tak mohou být prostředky podle předkládaného vynálezu použity pro léčbu infertility, při technikách fertilizace in vitro a v jiných terapeutických způsobech asociovaných s přirozenými hormony nebo jejich podjednotkami. Tyto techniky jsou použitelné pro člověka, stejně jako pro jiná zvířata. Volba prostředku ve smyslu druhové specificity závisí -

samozřejmě - na jedinci, který je léčen. Předpokládá se, že schopnost diferencovaného působení, kterou mají prostředky podle předkládaného vynálezu, umožní nové způsoby léčby, které nebyly předtím možné.

Prostředky podle předkládaného vynálezu jsou také použitelné jako reakční činidla podobně jako příslušné přirozené heterodimery.

Dále, sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být použity jako diagnostické prostředky pro detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti protilátek, které se váží na přirozené proteiny v rozsahu, v jakém se takové protilátky váží na relevantní části sloučeniny s více doménami v biologickém vzorku. Jsou také použitelné jako kontrolní reakční činidla v kitech pro hodnocení koncentrací těchto hormonů v různých vzorcích. Protokoly pro hodnocení koncentrací hormonů samotných nebo protilátek proti hormonům jsou standardní imunotestovací protokoly známé v oboru. Mohou být použity různé kompetitivní a přímé testovací metody, včetně různých značkovacích technik, včetně radioizotopového značení, fluorescenčního značení, enzymového značení a podobně.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou také použitelné při detekci a přečištění receptorů, na které se přirozené hormony váží. Tak mohou být sloučeniny podle předkládaného vynálezu navázány na pevné nosiče a mohou být použity při afinitní chromatografické přípravě receptorů nebo protilátek proti hormonům. Získané receptory jsou sami o sobě použitelné při testování hormonální aktivity léčiv ve skriningových testech na terapeutická a jiná činidla. Samozřejmě musí být brána v úvahu duální specifita β -podjednotek v jakékoliv z těchto sloučenin, kde jsou β -

podjednotky odlišné. Nicméně, jsou li dvě β -podjednotky identické, tak je sloučenina účinným nástrojem pro afinitní přečištění relevantního receptoru.

Konečně, protilátky specificky reaktivní se sloučeninami podle předkládaného vynálezu mohou být použity jako přečišťovací činidla pro izolaci těchto materiálů pro jejich následné zpracování. Mohou být také použity pro sledování koncentrací těchto sloučenin podaných jako léčiva.

Následující příklady jsou pouze ilustrativní a nijak neomezují předkládaný vynález.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: CG β - α -CTP-FSH β

Nukleotidová sekvence kódující titulní sloučeninu byla připravena za použití dostupných nukleotidových sekvencí pro relevantní části podjednotek. CG β region kóduje 145 aminokyselin lidského CG β ; nukleotidová sekvence kódující α -podjednotku kóduje 92 aminokyselin lidské α -podjednotky ve formě minigenu; sekvence kódující CTP kóduje 28 aminokyselin představujících pozice 118-145 lidského choriového gonadotropinu; a region kódující FSH β kóduje 111 aminokyselin lidské FSH β -podjednotky.

Amplifikovaný fragment obsahující CG β exon 3, α minigen, CTP a β FSH se insertovaly do SalI místa pM²HA-CG β exon1,2 expresního vektoru, který byl připraven z pM² a obsahoval CG β exony 1 a 2, za použití způsobu popsaného v Sachais, B., Biol. Chem. (1993), 268: 2319. pM² obsahující CG β exony 1 a 2 je popsán

v Matzuk, M.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), 84: 6354-6358 a Matzuk, M.M. et al., J. Cell Biol. (1988) 106: 1049-1059. Nejprve se fragment obsahující α minigen za CG β exonem 3 insertoval do tohoto vektoru za zisku pM²-HACG β α . pM²-HACG β α se potom štěpil ScaI a ligoval se s ScaI tráveným pBIIKS(+) α -CTP-FSH. Vzniklý expresní vektor pM²-HACG β - α -CTP-FSH produkuje po inserci do vhodného hostitele titulní sloučeninu.

Příklad 2: Produkce a aktivita CG β - α -CTP-FSH β

Expresní vektor připravený v příkladu 1 se transfektoval do ovariálních buněk čínské křečka (CHO) a produkce proteinu byla hodnocena imunosrážením radioaktivně značeného proteinu na SDS gelech.

Kultivační medium se odebralo, zahustilo se a testovalo se na vazbu lidský LH receptor (předpokládala se vazba na β CG- α část).

Pro tento test byl LH receptor připraven insercí cDNA kódující celý lidský LH receptor do expresního vektoru pCMX (Oikawa, J. X-C. et al., Mol. Endocrinol. (1991) 5: 759-768). Exponenciálně rostoucí 293 buňky se transfektovaly tímto vektorem za použití metody dle Chen, C. et al., Mol. Cell Biol. (1987) 7: 2745-2752, za dosažení exprese LH receptoru na povrchu buněk.

V tomto testu se buňky exprimující lidský LH receptor (2×10^5 /zkumavku) inkubovaly s 1 ng značeného hCG v kompetici se stoupajícími koncentracemi neznačeného hCG nebo stoupajícími dávkami testovaného vzorku při 22 °C po dobu 18 hodin. Snížení značení za přítomnosti vzorku odpovídá vazebné schopnosti vzorku. V tomto testu - pro lidský LH receptor na 293 buňkách

- má heterodimerní hCG typickou normální aktivitu, jak bylo stanoveno dříve, a medium obsahující $CG\beta-\alpha-FSH\beta$ také vykazuje aktivitu. Tyto výsledky jsou uvedeny na obr. 1. Jak je uvedeno, jak heterodimerní (plné čtverečky) hCG, tak bifunkční jednořetězcový protein podle předkládaného vynálezu (plné kolečka) soutěží úspěšně o vazbu na LH receptor se značeným hCG. Bifunkční sloučenina je méně účinná z důvodu modifikace karboxylového konce α podjednotky.

Na obr. 1 jsou také uvedeny výsledky testu, ve kterém byla testována různá množství supernatantu kultury buněk modifikovaných tak, aby obsahovaly dva expresní systémy. Jeden expresní systém produkoval jednořetězcový $FSH\beta-\alpha$; druhý produkoval β -podjednotku hCG. Vzniklý nekovalentně asociovaný komplex jednořetězcového $FSH\alpha-\beta/CG\beta$ (plné trojúhelníčky) také úspěšně soutěžil o vazbu na receptor.

Podobně byl testován supernatant kultivačního media obsahující $CG\beta-\alpha-CTP-FSH\beta$ na vazbu na receptor pro FSH, exprimovaný na 293 buňkách. Test byl proveden způsobem popsaným výše s tou výjimkou, že buňky exprimující lidský receptor pro FSH byly použity místo buněk exprimujících lidský receptor pro LH a značený FSH byl použit jako kompetitor. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny na obr. 2.

Jak je uvedeno, jednořetězcová titulní sloučenina (plná kolečka) soutěžila úspěšně o vazbu na receptor s FSH (plné čtverečky). V nezávislém pokusu, též uvedeném na obr. 2, byla směs jiného typu komplexu, tj. jednořetězcového $FSH\beta-\alpha$ nekovalentně asociovaného s $CG\beta$, který byl smísen s nadbytkem nekomplexovaného jednořetězcového $FSH\beta-\alpha$ (plné trojúhelníčky) vynikajícím kompetitorem.

Příklad 3: Příprava dalších expresních vektorů

Podobně jako v příkladu 1 se připravily expresní vektory pro produkci jednořetězcového bifunkčního $\text{FSH}\beta\text{-CTP-}\alpha\text{-CG}\beta$; $\alpha\text{-FSH}\beta\text{-CTP-CG}\beta$; $\text{CG}\beta\text{-}\beta\text{FSH-CTP-}\alpha$; a $\beta\text{LH-CTP-}\beta\text{FSH-CTP-}\alpha$ a transfektovaly se do CHO buněk. Supernatanty kultur se odebraly a testovaly se způsobem uvedeným výše na vazbu na příslušné LH a FSH receptory. Tyto sloučeniny také vykazovaly schopnost vazby na tyto receptory.

Příklad 4: Příprava $\text{FSH}\beta\text{-}\alpha \approx \text{CG}\beta$

Pro přípravu sloučeniny $\text{FSH}\beta\text{-}\alpha \approx \text{CG}\beta$ byly připraveny expresní vektory pro produkci jednořetězcového $\text{FSH}\beta\text{-}\alpha$ a lidské $\text{CG}\beta$ -podjednotky a tyto vektory byly současně transfektovány do ovariálních buněk čínského křečka (CHO) způsobem podobným způsobu popsanému v PCT přihlášce WO 96/05224, publikované 22.2.1996. $\text{CG}\beta$ -podjednotka se kombinuje s $\text{FSH}\beta\text{-}\alpha$ za vzniku nekovalentně vázaného komplexu $\text{FSH}\beta\text{-}\alpha \approx \text{CG}$. Produkce a aktivita nekovalentně vázaného komplexu $\text{FSH}\beta\text{-}\alpha \approx \text{CG}$ byly hodnoceny imunoprecipitací radioaktivně značeného proteinu na SDS gelech.

Kultivační medium se odebralo, zahustilo se a testovalo se na vazbu lidský LH receptor (předpokládala se vazba na βCG část) a na lidský FSH receptor (předpokládá se vazba na $\text{FSH}\beta\text{-}\alpha$).

Výsledky ukazují, že nekovalentně vázaný komplex $\text{FSH}\beta\text{-}\alpha \approx \text{CG}$ vykazuje specifickou vazbu na CG a FSH receptor. Tato data ukazují, že α -podjednotka komplexu může, ačkoliv je kovalentně

navázaná na FSH β doménu, funkčně interagovat s jinou β -podjednotkou a přítomnost této konfigurace neruší biologickou aktivitu. Jiné komplexy obsahující více domén, jako je β FSH- $\alpha \approx \beta$ LH, β CG- $\alpha \approx \beta$ LH, β LH- $\alpha \approx \beta$ TSH a β TSH- $\alpha \approx \beta$ FSH, mohou být připraveny podobným způsobem.

Příklad 5: Použití různě působících sloučenin pro regulaci poměrů hormonů

Různě působící sloučeniny se připraví a podají za použití metod odpovídajících metodám pro přirozené příslušné hormony.

A. Zvýšení fertility zvýšením poměru FSH/LH a/nebo snížením CG

Zvýšení fertility může být dosaženo zvýšením poměru FSH/LH za použití sloučeniny vzorce (1)-(5), ve které má β -podjednotka slabší LH agonistickou aktivitu nebo LH agonistickou aktivitu a druhá β -podjednotka má (volitelně zesílenou) FSH agonistickou aktivitu. LH β -podjednotka může být modifikována pro snížení agonistické nebo dosažení antagonistické aktivity eliminací glykosylace LH β řetězce nebo bodovými mutacemi, zatímco FSH β -podjednotka může být použita ve své přirozené formě nebo může být modifikována tak, aby měla zvýšenou agonistickou aktivitu. Výsledné sloučeniny budou zvyšovat hladiny FSH hormonů za simultánního snížení hladiny LH hormonu. Když je terapeutická dávka této sloučeniny podána savci během folikulární fáze menstruačního cyklu, je výsledkem zvýšená fertilita.

Dále může být výhodné prodloužit cirkulační poločas FSH podjednotky vzhledem k cirkulačnímu poločasu LH β . Toto je dosaženo za použití FSH β - $\alpha \approx$ LH β sloučeniny.

Zvýšená fertilita může být také dosažena zvýšením hladin CG hormonu a snížením hladin LH hormonu pomocí podání sloučeniny vzorce (1)-(5), ve které má β -podjednotka slabší LH agonistickou aktivitu nebo LH antagonistickou aktivitu a druhá β -podjednotka má CG agonistickou aktivitu. Dále, CG β -podjednotka může být upravena tak, aby měla vyšší vazebnou afinitu než LH β k CG/LH receptoru. Při podání ve vhodnou dobu a ve vhodných dávkách se poměr FSH/LH zvýší ve prospěch fertility a CG aktivita se také zvýší na hladiny výhodné pro těhotenství.

Zvýšená fertilita může být také dosažena pomocí sloučeniny vzorce (1)-(5), ve které má jedna β -podjednotka FSH agonistickou aktivitu a druhá β -podjednotka má CG agonistickou aktivitu. Podání těchto komplexů zvýší poměr FSH/LH ve prospěch fertility a také zvýší CG aktivitu na hladiny výhodné pro těhotenství.

Může být výhodné prodloužení cirkulačního poločasu jedné β podjednotky vzhledem k druhé, což se provede pomocí sloučenin vzorce (4) nebo (5).

B. Indukce infertility snížením poměru FSH/LH a/nebo snížením CG

Infertilita může být dosažena snížením poměru FSH/LH za použití sloučeniny vzorce (1)-(5), ve které má jedna β -podjednotka LH agonistickou aktivitu a druhá β -podjednotka má FSH antagonistickou nebo sníženou agonistickou aktivitu. Pro tento účel může být LH β -podjednotka modifikována pro zvýšení agonistické pozměněním glykosylace LH β řetězce nebo bodovými mutacemi, zatímco FSH β -podjednotka může být modifikována tak,

aby měla sníženou agonistickou aktivitu. Výsledné sloučeniny budou zvyšovat LH aktivitu za simultánního snížení FSH aktivity, což sníží poměr FSH/LH na koncentrace nevhodné pro fertilitu.

Infertilita může být také dosažena snížením poměru FSH/LH pomocí podání sloučeniny vzorce (1)-(5), ve které má jedna β -podjednotka LH agonistickou aktivitu a druhá β -podjednotka má CG agonistickou aktivitu. Při podání této sloučeniny se sníží poměr FSH/LH zvýší se koncentrace CG hormonu, což je oboje nevhodné pro fertilitu a těhotenství.

Stejně jako výše může být výhodné prodloužení cirkulačního poločasu jedné β podjednotky vzhledem k druhé, což se provede pomocí sloučenin vzorce (4) nebo (5). Může být také výhodné změnit vazebné afinity β -podjednotek.

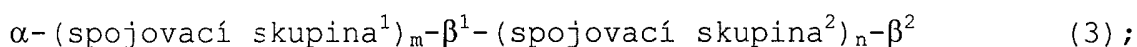
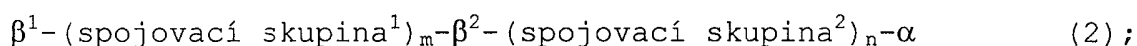
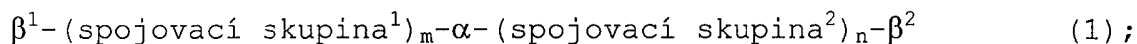
C. Léčba syndromu polycystických ovarií snížením poměru LH/FSH

Syndrom polycystických ovarií je charakterizován inkompletním vývojem folikulu a abnormální ovulací. Ženy s tímto onemocněním mají zvýšené hladiny androgenů a vysoký poměr LH/FSH ve srovnání s normálně fertiálními ženami. Proto, v době menstruačního cyklu, kdy se předpokládá iniciace vývoje folikulu, vyvolá podání sloučeniny vzorce (1)-(5), ve které má jedna β -podjednotka sníženou LH agonistickou aktivitu nebo antagonistickou aktivitu a druhá β -podjednotka má FSH agonistickou aktivitu, indukci vývoje folikulu a způsobí ovulaci. Protože podání FSH agonisty je rizikové pro možnost hyperstimulace, je výhodné, aby byla FSH β -podjednotka nekovalentně vázaná β -podjednotka mající kratší cirkulační poločas a/nebo aby byla FSH β -podjednotka upravena tak, aby měla

sníženou vazebnou afinitu.

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Způsob dodávání různých aktivit glykoproteinových hormonů jedinci, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedinci potřebujícím takovou léčbu se podává sloučenina vzorce:



kde každý z β^1 a β^2 má aminokyselinovou sekvenci β podjednotky glykoproteinového hormonu obratlovců nebo varianty uvedené sekvence;

" α " má aminokyselinovou sekvenci α podjednotky glykoproteinového hormonu obratlovců nebo její varianty; a

" \approx " je nekovalentní vazba mezi α a β^2 ; a

každé m a n je nezávisle 0 nebo 1;

kde každý z β^1 a β^2 dodává uvedenému prostředku odlišnou aktivitu.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že β^1 a β^2 odpovídají různým přirozeným β -podjednotkám.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že β^1 a β^2 mají různé biologické poločasy.

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeden z β^1 a β^2 dodává agonistickou aktivitu a druhý dodává antagonistickou aktivitu.

5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený jedinec potřebuje zvýšení fertility.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jak β^1 , tak β^2 dodává FSH agonistickou aktivitu v uvedeném prostředku; nebo

jak β^1 , tak β^2 dodává CG agonistickou aktivitu; nebo

jak β^1 , tak β^2 dodává LH antagonistickou aktivitu; nebo

jeden z β^1 a β^2 dodává FSH agonistickou aktivitu a druhý dodává LH antagonistickou aktivitu nebo sníženou LH agonistickou aktivitu; nebo

jeden z β^1 a β^2 dodává FSH agonistickou aktivitu a druhý dodává CG agonistickou aktivitu; nebo

jeden z β^1 a β^2 dodává LH antagonistickou aktivitu nebo sníženou LH agonistickou aktivitu a druhý dodává CG agonistickou aktivitu.

7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený jedinec má potřebu stát se nebo zůstat infertilním.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jak β^1 , tak β^2 dodává FSH antagonistickou aktivitu v uvedeném prostředku; nebo

jak β^1 , tak β^2 dodává CG antagonistickou aktivitu; nebo

jak β^1 , tak β^2 dodává LH agonistickou aktivitu; nebo

jeden z β^1 a β^2 dodává FSH antagonistickou aktivitu nebo sníženou FSH agonistickou aktivitu a druhý dodává LH agonistickou aktivitu; nebo

jeden z β^1 a β^2 dodává FSH antagonistickou aktivitu nebo sníženou FSH agonistickou aktivitu a druhý dodává CG antagonistickou aktivitu nebo sníženou CG agonistickou aktivitu; nebo

jeden z β^1 a β^2 dodává LH agonistickou aktivitu a druhý dodává CG antagonistickou aktivitu nebo sníženou CG agonistickou aktivitu.

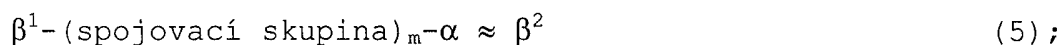
9. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený jedinec potřebuje léčbu syndromu polycystických ovarií.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeden z β^1 a β^2 dodává FSH agonistickou aktivitu a druhý dodává LH antagonistickou aktivitu nebo sníženou LH agonistickou aktivitu v uvedeném prostředku; nebo

jak β^1 , tak β^2 dodává FSH agonistickou aktivitu; nebo

jak β^1 , tak β^2 dodává LH antagonistickou aktivitu.

11. Glykosylovaná nebo neglykosylovaná kompozice vzorce:



kde každý z β^1 a β^2 má aminokyselinovou sekvenci β podjednotky glykoproteinového hormonu obratlovců nebo varianty uvedené sekvence;

" α " má aminokyselinovou sekvenci α podjednotky glykoproteinového hormonu obratlovců nebo její varianty; a

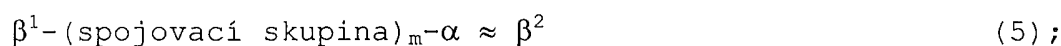
" \approx " je nekovalentní vazba mezi α a β^2 ;

m je 0 nebo 1;

kde každý z β^1 a β^2 dodává odlišnou aktivitu uvedeného prostředku;

a s podmínkou, že pokud je β^1 CG, pak β^2 není FSH.

12. Farmaceutický prostředek regulující koncentrace glykoproteinových hormonů u savců, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství kompozice vzorce:



kde každý z β^1 a β^2 má aminokyselinovou sekvenci β podjednotky glykoproteinového hormonu obratlovců nebo varianty uvedené sekvence;

" α " má aminokyselinovou sekvenci α podjednotky glykoproteinového hormonu obratlovců nebo její varianty; a

" \approx " je nekovalentní vazba mezi α a β^2 ;

m je 0 nebo 1;

kde každý z β^1 a β^2 dodává odlišnou aktivitu uvedeného prostředku;

a s podmínkou, že pokud je β^1 CG, pak β^2 není FSH.

13. Rekombinantní hostitelské buňky modifikované tak, aby obsahovaly nukleové kyseliny obsahující první expresní systém obsahující nukleotidovou sekvenci kódující α -(spojovací skupina)_m- β^1 nebo β^1 -(spojovací skupina)_m- α operativně navázanou na kontrolní sekvenci pro její expresi a nukleovou kyselinu obsahující druhý expresní systém obsahující nukleotidovou sekvenci kódující β^2 operativně navázanou na kontrolní sekvenci pro její expresi;

kde α , β^1 , β^2 , spojovací skupina a m jsou stejné, jak byly definovány v nároku 11.

14. Buňky podle nároku 13, ve kterých mají první expresní systém a druhý expresní systém stejnou kontrolní sekvenci.

15. Buňky podle nároku 13, ve kterých jsou první expresní systém a druhý expresní systém umístěny na samostatných extrachromosomálně se replikujících vektorech.

16. Buňky podle nároku 13, ve kterých jsou první expresní systém a druhý expresní systém umístěny v chromosomu hostitelské buňky.

17. Buňky podle nároku 13, ve kterých jsou uvedený první a druhý expresní systém umístěny v chromosomu uvedených buněk a další je umístěn na extrachromosomálně se replikujícím vektoru.

18. Buňky podle nároku 13, ve kterých jsou první a druhý expresní systém umístěny na stejném extrachromosomálně se replikujícím vektoru.

19. Způsob přípravy kompozice vzorce (4) nebo (5)

v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

kultivací buněk podle nároku 13 za podmínek, za kterých je uvedená kompozice produkována; a

získání uvedené kompozice z kultury.

20. Protilátky specificky imunoreaktivní s kompozicí podle nároku 11.