



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **315517**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 07 K 14/72, C 12 N 15/12,
A 61 K 38/17

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19933272	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	1993.09.14	søknadsnummer	1992.01.02, PCT/US92/00122
(24) Løpedag	1992.01.02	(85) Videreføringsdag	1993.09.14
(41) Alm. tilgj.	1993.09.14	(30) Prioritet	1991.03.15, US, 670085
(45) Meddelt dato	2003.09.15		
(83) Mikroorganisme deponert:	ATCC nr.68538,68540,68539		

(71) Patenthaver	Applied Research Systems ARS Holding NV, Pietermaai 15, Curaçao, AN
(72) Oppfinner	Christie Ann Kelton, Hopkinton, MA 01748, US Shirley Vui Yen Cheng, Boston, MA 02114, US Patrice Noreen Nugent, Framingham, MA 01701, US Rene Lynn Schweickhardt, Quincy, MA 02169, US
(74) Fullmektig	Zacco Norway AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Polypeptid som er i stand til å gjenkjenne og selektivt binde humant FSH, DNA som koder for dette, rekombinant ekspresjonsvektor inneholdende dette DNA, celle transfektert med ekspresjonsvektoren, fremgangsmåte for fremstilling av polypeptidet, farmasøytisk sammensetning omfattende polypeptidet og en fremgangsmåte for analyse av FSH**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Ren human FSH-reseptor, eller et fragment eller en mutant derav som binder FSH, DNA kodende for nevnt reseptor, fragment eller mutant, ekspresjonsvektorer omfattende nevnte DNA, celler transfektert benevnede ekspresjonsvektorer og fremgangsmåter for fremstilling av nevnte reseptor, fragment eller mutant ved dyrking av nevnte transfekterte celler er beskrevet. Farmasøytiske sammensetninger omfattende nevnte reseptor, fragmenter eller mutant, samt fremgangsmåte for behandling av pasienter med slike sammensetninger for å redusere endogen FSH bioaktivitet samt en forbedret analyse for human FSH ved anvendelse av reseptoren, fragmentet eller mutanten ifølge foreliggende oppfinnelse er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et polypeptid som er i stand til å gjenkjenne og selektivt binde humant follikkelstimulerende hormon (FSH). Videre angår oppfinnelsen et DNA som koder for dette, en rekombinant ekspresjonsvektor omfattende dette DNA og en celle transfektert med ekspresjonsvektoren. Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for å fremstille polypeptidet, en farmasøytisk sammensetning omfattende polypeptidet og en metode for å analysere humant FSH.

Follikkelstimulerende hormon (FSH) er et hypofyseavledet heterodimert glykoprotein-hormon som har strukturelle likheter med luteiniserende hormon (LH) og thyroidstimulerende hormon (TSH) som begge blir produsert i hypofysekjertelen, og chorion gonadotropin (CG), som blir produsert i livmoren. Hormonene er relativt store (28-38 kilodalton) og består av en felles α -subenhet som er ikke-kovalent bundet til en bestemt β -subenhet som utviser reseptorbindende spesifisitet.

De cellulære reseptorene for disse hormonene er kjent for å være medlemmer av den G-protein-koblede klassen av membran-bundne reseptorer som når de er aktiverte stimulerer en økning i aktiviteten til adenylyl syklase. Dette resulterer i en økning i nivået av den intracellulære andre messenger adenosin 3',5'-monofosfat (cAMP), som igjen fører til økt stereoid syntese og utskillelse. Hydropatisitetsplott av aminosyresekvensene til disse reseptorene viser tre generelle domener: (1) en hydrofil amino-terminal region, antatt å være det amino-terminale ekstracellulære domenet, (2) syv hydrofobe segmenter med membran-dekkende lengde, betraktet å være transmembrandomene og (3) en karboksy-terminal region som inneholder potensielle fosforyleringsseter (serin, threonin og tyrosin residier), antatt å være den karboksy-terminale intracellulære eller sytoplasmiske domenen.

Glykoprotein-hormonreseptor-familien er forskjellige fra andre G-protein-koblede reseptorer, så som β_2 -adrenerge, rhodopsin- og forbindelse K-reseptorer, på grunn av den store størrelsen på den hydrofile amino-terminale domenet som er involvert i hormonbinding.

FSH-reseptoren blir uttrykt på testikulære Sertoli celler og ovarie granulosa celler. På grunn av at det har vært et behov for å tilveiebringe vesentlig ren human FSH-reseptor er rensing av naturlig forekommende preparater ikke praktisk og vil sannsynligvis ikke være tilstrekkelig for å muliggjøre bestemmelse av aminosyresekvensen. Nylig har en gruppe klonet cDNA kodende for rotte FSH reseptoren, avledet aminosyresekvensen og uttrykt den i pattedyrceller (Sprengel, Mol. Endocrinol. 4:525, 1990). En annen gruppe som forsøkte å klonere TSH-reseptoren klonet og identifiserte også en del av den

transmembrane regionen til den humane FSH-reseptoren (Parmentier, Science 246:1620, 1989).

- Foreliggende oppfinnelse omfatter vesentlig ren human FSH-reseptor, eller et fragment eller en mutant derav som binder FSH, DNA kodende for nevnte reseptor, fragment eller mutant, ekspresjonsvektorer som omfatter nevnte DNA, celler transfektert med nevnte ekspresjonsvektorer og fremgangsmåter for fremstilling av nevnte reseptor, fragment eller mutant ved dyrking av nevnte transfekterte celler. Foreliggende oppfinnelse omfatter også farmasøytiske sammensetninger omfattende nevnte reseptor, fragment eller mutant, til bruk for å redusere den endogene FSH-bioaktiviteten. En forbedret analyse for human FSH ved anvendelse av reseptoren, fragmentet eller mutanten ifølge foreliggende oppfinnelse er også beskrevet.

- Figur 1 er et kart av de humane FSH-reseptor cDNA klonene. Et delrestriksjonsendonuklease kart som ble bestemt ved kombinerings av DNA-sekvensdata avledet fra deler av hver av de fem klonene er vist. Størrelsesdeler på 0,2 kilobasepar (kb) er avmerket. Regionene som klonene tilsvarer er angitt med heltrukne linjer under restriksjonsendonukleasekartet. Klonbetegnelsen og den omtrentlige størrelsen i kb er angitt til venstre og høyre for hver heltrukne linje. Omtrentlige beliggenheter til det amino-terminale ekstracellulære domenen, transmembrandomenen og det karboksy-terminale intracellulære domenet til det kodede proteinet er angitt med de stiplede pilene over restriksjonsendonukleasekartet. Posisjonen til et innskudd (sansynligvis et intron eller en del av et intron) i 5-10 klonen er vist ved en åpen boks.

- Figurene 2A og 2B angir strategien anvendt for konstruering av et "full-lengde" humant FSH reseptor cDNA for å uttrykke det kodede proteinet i en pattedyrcellelinje.

- Figur 3 er et diagram av ekspresjonsvektorplasmidet anvendt for å utvikle CHO-DUKX cellelinjene som stabilt blir transfektert med den humane FSH-reseptoren.

- Figur 4 er et diagram av ekspresjonsvektorplasmidet anvendt for å utvikle Y1 cellelinje stabilt transfektert med den humane FSH reseptoren.

- Figur 5 illustrerer de intracellulære cAMP nivåene målt i CHO-DUKX cellelinjen CHOFSHR4Q-13, etter behandling med varierende doser av enten FSH (sirkler) eller LH (trekanter). Hvert punkt representerer gjennomsnittsverdien. Standardavvikene er vist med vertikale linjer.

Figur 6 illustrerer progesteron nivåene målt i kulturmediet til Y1 celledinjen Y1HFSHR4-38, etter behandling med varierende doser av FSH. Vertikale linjer angir standard avvikene i progesteronmålingene ved hver FSH-dose.

5

Foreliggende oppfinnelse angår således et rent polypeptid som er i stand til å gjenkjenne og selektivt binde humant follikkelstimulerende hormon (FSH), og som ikke frembringer en immunologisk respons i mennesker, kjennetegnet ved at det består av:

- 10 (a) den humane FSH-reseptoren med aminosyresekvensen 1-678 vist i SEQ ID NO: 2;
- (b) en mutant som bibeholder minst 95% identitet med sekvensen ifølge (a);
- (c) et polypeptid som inkluderer den aminoterminalle ekstracellulære del av den humane FSH-reseptoren, inkludert aminosyresekvensen 1-349 vist i SEQ ID NO: 2;
- 15 (d) et polypeptid som inkluderer en mutant som bibeholder minst 95% identitet med aminosyresekvensen 1-349 vist i SEQ ID NO: 2;
- (e) et polypeptid som inkluderer et fragment av den ekstracellulære del av den humane FSH-reseptoren ifølge (a) der fragmentet bibeholder de FSH-bindende egenskaper til den fullstendige ekstracellulære delen; eller
- 20 (f) et polypeptid som inkluderer en mutant av fragmentet ifølge (e), der mutanten bibeholder minst 95% identitet med fragmentet og som bibeholder de samme FSH-bindende egenskaper som den fullstendige ekstracellulære delen av den humane FSH-reseptoren der den fullstendige ekstracellulære delen inkluderer aminosyresekvensen 1-349 vist i SEQ ID NO: 2.

25

Videre angår oppfinnelsen et isolert DNA kjennetegnet ved at det koder for et polypeptid ifølge oppfinnelsen et isolert DNA kjennetegnet ved at det omfatter nukleotidsekvensen vist i SEQ ID NO: 1 samt en rekombinant ekspresjonsvektor, kjennetegnet ved at den omfatter DNA ifølge oppfinnelsen og en celle transfektert med

30

denne ekspresjonsvektoren.

Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for å fremstille nevnte polypeptid ved at den omfatter dyrking av den nevnte cellen i et næringsmedium og gjenvinning av reseptoren fra dette og en farmasøytisk sammensetning kjennetegnet ved at den omfatter

35

polypeptidet og en farmasøytisk akseptabel bærer.

Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for å analysere humant FSH *ex vivo* ved

anvendelse av en FSH-reseptor, kjennetegnet ved at det anvendes et polypeptid ifølge oppfinnelsen som FSH-reseptor.

- Som anvendt heri refererer human FSH-reseptor, og FSH-bindende fragmenter eller mutanter derav, til polypeptider som kan gjenkjenne og selektivt bli bundet til human FSH og som ikke produserer noen signifikant immunologisk respons i mennesker. Foreliggende oppfinnelse omfatter derfor human FSH-reseptor med aminosyresekvensen angitt i SEQ ID NO: 2, samt FSH-bindende fragmenter eller mutanter derav som har beholdt en meget høy grad av homologi (dvs. minst 95% identitet) med angitt aminosyresekvens, eller med minst den ekstracellulære delen derav. Fragmenter av den humane FSH-reseptoren omfattet i foreliggende oppfinnelse innbefatter de fragmentene som er igjen etter at de cytoplasmiske og/eller transmembran domenene er blitt fjernet fra det fullstendige polypeptidet. Som spesielt foretrukket fragment innbefattet i foreliggende oppfinnelse er den amino-terminale ekstracellulære delen omfattende omtrent aminosyrene 1-349 av den humane FSH-reseptoraminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 2. På grunn av at noen av løkkene som dekker de transmembrane regionene (angitt i "features region", sekvens IS No: 2) er også ekstracellulære og de kan bli koblet (for eksempel gjennom hensiktsmessige spacermolekyler) til et fragment inneholdende den amino-terminale ekstracellulære delen for å forbedre bindingen. Polypeptidet kan bli glykosylert, som i den naturlige reseptoren, eller kan bli delvis eller fullstendig deglykosylert.

- Det antas videre at bare en del av ovennevnte amino-terminale ekstracellulære domene kan bli effektivt anvendt for å binde FSH på grunn av at det er meget sannsynlig at den fullstendige ekstracellulære domenen ikke er nødvendig for denne hensikten. Et fragment som er noe kortere enn 349 aminosyrer av den fullstendige ekstracellulære domenen kan lett bli produsert og testet for effektiv binding til FSH. Dersom den FSH-bindende regionen til den ekstracellulære delen blir opprettholdt intakt, er lengden på hele det anvendte fragmentet ikke kritisk. På grunn av dette er det også antatt at ikke-interfererende aminosyrer kan bli tilsatt til hvilken som helst ende av den ekstracellulære domenen, eller det FSH-bindende fragmentet derav, uten å negativt påvirke FSH-bindende kapasiteten til polypeptidet. Foreliggende oppfinnelse omfatter derfor et fragment av den humane FSH-reseptoren som omfatter en vesentlig del av den ekstracellulære domenen og som har beholdt vesentlig de samme FSH-bindende karaktertrekk som det fullstendige ekstracellulære domenet.

Mutante former av ovennevnte reseptor og fragmenter hører også inn under rammen av

foreliggende oppfinnelse. Slike mutanter innbefatter konservative substitusjoner i 1 til 10 aminosyreresidier, i det beliggenheten og naturen til disse substitusjonene blir valgt slik at de ikke i betydelig grad degraderer de FSH-bindende karaktertrekkene til reseptoren eller fragmentet derav som er modifisert.

5

Vesentlig ren human FSH-reseptor, eller et fragment eller en mutant derav, blir fremstilt ved isolering og kloning av DNA som koder for det fra et cDNA eller genomisk bibliotek, ligering av DNA inn i en vektor, transfektering av vertsceller med vektoren, dyrking av transfekterte vertsceller under betingelser som muliggjør ekspresjon av reseptoren, fragmentet eller mutanten, og isolering av reseptoren, fragmentet eller mutanten fra kulturen.

DNA som blir anvendt for å danne ekspresjonsvektorer kan være genomisk DNA eller cDNA kodende for human FSH-reseptor, og kan inneholde regioner som forsterker ekspresjon, så som introner, promotere enhancere osv. DNA kan lett bli modifisert ved substitusjon, delesjon eller innskudd av nukleotider (for eksempel ved sete-spesifikk mutagenese) som ikke påvirker den biologiske eller FSH-bindende aktiviteten til det uttrykte proteinet på en negativ måte. For eksempel kan konservative substitusjoner (mutasjoner) som endrer fra 1 til 10 aminosyrer bli dannet uten å negativt påvirke den helhetlige strukturen og aktiviteten til det uttrykte proteinet (muteinet). Likeledes kan visse deler av DNA, så som de delene som koder for de cytoplasmiske og/eller transmembrane domenene, bli deletert slik at bare et fragment, så som det oppløselige ekstracellulære domenet av proteinet, blir uttrykt. Den humane FSH-reseptoren eller det FSH-bindende fragmentet eller mutanten derav kan også bli uttrykt som et fusjonsprotein. Et slikt fusjonsprotein vil innbefatte et polypeptid ved karboksy-terminusen som vil gi karaktertrekk som vil lette rensingen av proteinet, eller immobiliseringen av det rensede proteinet på et fast substrat for anvendelse i FSH-analyser eller FSH-rensingsprotokoller. Et annet slikt fusjonsprotein vil innbefatte et spaltbart polypeptid ved amino-terminusen som vil lette ekspresjonen.

30

Human FSH-reseptor produsert i henhold til foreliggende oppfinnelse er vesentlig ren som betyr at den er vesentlig fri for ytterligere biologiske stoffer som normalt er assosiert med FSH-reseptor ekstrahert fra naturlige kilder, så som for eksempel bakterier, virus og andre proteiner. Reseptoren kan bli formulert til farmasøytiske sammensetninger ved blanding med egnede farmasøytisk akseptable bærere på en måte kjent for fagfolk innenfor dette området.

Generelt kan farmasøytiske sammensetninger blir formulert for oral, parenteral

(inkludert subkutan, intramuskulær og intravenøs), vaginal, rektal, buccal (inkludert sublingual), transdermal eller intranasal administrering. Sammensetninger for parenteral administrering er normalt i form av en flytende oppløsning, dispersjon eller emulsjon, fortrinnsvis isoton, for vaginal eller rektal administrering, som en krem eller suppositorie, for oral eller buccal administrering, som en tablett eller kapsel, og for intranasal administrering, som pulver, nesesdråper eller aerosol. Forskjellige doseringer med langsom frigjøring, depot implantater eller injiserbare doseringsformer kan bli anvendt. Den aktive komponenten kan også bli inkorporert i polymere matrikser, liposomer og mikrosfærer for å kontrollere avleveringen.

10

Disse sammensetningene kan hensiktsmessig bli administrert i enhetsdoseringsform og kan bli fremstilt ved hvilke som helst av de velkjente fremgangsmåtene innen det farmasøytiske området. Formuleringer for parenteral administrering kan inneholde som felles eksipienter sterilt vann eller saltvann, alkylenglykoler så som propylenglykol, polyalkylenglykoler så som polyetylenglykol, oljer av vegetabilsk opprinnelse, hydrogenerte naftalener og lignende. Formuleringer for vaginal eller rektal administrering, for eksempel suppositorier, kan inneholde som eksipienter, for eksempel, polyalkylenglykoler, vaselin, kakaosmør og lignende. Formuleringer for nasal administrering kan være i pulverform og inneholde som eksipienter, for eksempel, laktose eller dekstran, eller kan være vandige eller oljeholdige oppløsninger for administrering i form av nesesdråper eller dosert spray. For buccal administrering omfatter vanlige eksipienter sukkerforbindelser, kalsiumstearat, pregelatinisert stivelse og lignende. En eller flere overflate aktive syrer eller salter kan bli tilsatt til oppløsningen eller pulverformuleringen. Egnede farmasøytiske akseptable overflateaktive salter vil være de som beholder fenomenet med forsterket peptid absorpsjon, samt forbindelsenes overflate aktive karaktertrekk og som ikke er skadelige for individet eller på annen måte er kontraindikasjon.

15

20

25

30

Doseringen av den aktive ingrediensen som blir administrert, samt

administrasjonsmåten og frekvensen, vil avhenge av behovene og tilstanden for pasienten som blir behandlet, den terapeutiske virkningen som ønskes og vurderingen til legen som utfører behandlingen.

35

Farmasøytiske sammensetninger som omfatter human FSH-reseptor eller FSH-bindende fragmenter eller mutanter derav, kan bli administrert til en pasient i terapeutiske effektive doser for å bli bundet til endogent sirkulerende FSH i pasienten og derved kontrollere det tilgjengelige nivået av bioaktiv FSH. Farmasøytiske sammensetninger

- ifølge foreliggende oppfinnelse blir derfor effektivt anvendt for å redusere endogen FSH-bioaktivitet. Hos en hunnkjønnspasient kan en slik behandling bli effektivt anvendt for å forhindre follikkel veksten og modningen og derved forhindre graviditet. Hos en mannlig pasient kan en slik behandling bli effektivt anvendt for å forhindre
- 5 spermatogenese. En spesielt egnet farmasøytisk sammensetning for ovennevnt hensikter omfatter et fragment av den humane FSH-reseptoren som omfatter det amino-terminale ekstracellulære domenet eller en vesentlig del derav med vesentlig samme FSH-bindende karaktertrekk.
- 10 Vesentlig ren human FSH-reseptor kan også bli fordelaktig anvendt i konvensjonelle reseptoranalyser for FSH så som for eksempel den som er beskrevet i Reichert, Endocrinology 94:483, 1974. Substitusjon av den rene reseptoren ifølge foreliggende oppfinnelse, eller et fragment derav som binder FSH, vil vesentlig forbedre konsistensen og yteevnen ved slike analyser. Et fragment omfattende den amino-
- 15 terminale ekstracellulære domenen eller et FSH-bindende fragment og/eller fusjonsproteinet derav kan også bli koblet til en affinitetskolonne for å rense FSH fra fluider, ekstrakter o.s.v.
- Reseptoren kan bli inkorporert i en stabil cellelinje, fortrinnsvis en eukaryot cellelinje, og mest foretrukket er en pattedyrecellelinje, som kan produsere en målbar biologisk respons ved stimulering av reseptoren. Måling av celleresponsen i nærvær av FSH under analyse (for eksempel i testserum, plasma, kulturmedium, vevshomogenater o.s.v.) vil gi en indikasjon på bioaktiviteten, og derved tilveiebringe en meget nyttig diagnostisk analyse. En slik cellelinje kan også bli anvendt for å screene kjemiske
- 20 biblioteker for forbindelser som kan reagere med FSH-reseptoren eller å teste peptider eller små proteiner for deres evne til å bli bundet til FSH reseptoren i et hurtig "through-put" screeningssystem. Et eksempel på et hurtig "through-put" screeningssystem er hvor bindingen av en ligand til den rekombinante FSH-reseptoren resulterer i produksjon eller blokkering av produksjonen av et målbart produkt så som cAMP eller progesteron.
- 25 Et slikt system kan bli ytterligere forsterket ved operativ binding av et lett målbart markørelement som produserer bioluminisens (for eksempel luciferase genet) til reseptorsignal transduksjonsreaksjonsveien) for eksempel ved anvendelse av cAMP responselementet.
- 30 Vesentlig ren human FSH-reseptor eller FSH-bindende fragmenter eller mutanter derav kan også bli anvendt ved røntgen krystallografisk analyse for å utvikle molekylære modeller. Slike modeller er nyttige for å definere den tertiære strukturen til de
- 35

hormonbindende domenene til den humane FSH-reseptoren. Slik informasjon kan gi innsikt i strukturen til de gjeldende regionene av kontakten mellom FSH og reseptoren og dermed lette konstruksjon av peptider som har FSH-agonistisk eller -antagonistisk aktivitet.

5

Rekombinante teknikker egnet for produsering av proteiner og DNA ifølge foreliggende oppfinnelse, inkludert identifikasjon av egnede mutasjonsteknikker, vektorer, vertsceller, dyrkningsbetingelser o.s.v., er velkjent for fagfolk innenfor dette området og er tilstrekkelig beskrevet for eksempel i US-PS 4.761.371 og WO 88/09818, og

- 10 beskrivelsene er inkorporert heri som referanse. De eksperimentelle protokollene, bakterielle og bakteriofagkulturmedier og kjemiske oppløsninger anvendt i eksemplene nedenfor er beskrevet i detalj i Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, "2. utgave, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, dersom ikke annet er angitt.

15 Eksempel 1. Isolering og karakterisering av human FSH-reseptor cDNA kloner
Bibliotek screening.

- En FSH-reseptor cDNA klon fra rotte lik den som er beskrevet av Sprengel, Mol. Endocrinol. 4:525, 1990, ble oppnådd fra Dr. William Moyle, University of medicine and Dentistry, New Jersey-Robert Wood Johnson Medical School. Denne cDNA klonen
- 20 ble skutt inn i SV40 sen ekspressjonsvektor pSVL (Pharmacia LKB, produkt nr. 27-4509-01) og ble betegnet pSVLFSHR. Et 2,1 kb DNA fragment inneholdende regionene tilsvarende den fullstendige FSH reseptorprotein kodende regionen til rotte ble spaltet fra plasmidet ved anvendelse av restriksjonsendonuklease sete XbaI og BamHI. Det spaltede DNA ble størrelses-fraksjonert ved gelelektroforese, og 2,1 kb FSH-reseptor
- 25 fragmentet fra rotte ble rensset ved elektroeluering fra gelen. Dette rensede DNA-fragmentet ble anvendt som en probe for bibliotek screening for å identifisere human FSH-reseptor cDNA kloner.

- Et lambda gt11 cDNA bibliotek, konstruert fra RNA ekstrahert fra humane testikler, ble
- 30 oppnådd fra Clontech, Palo Alto, CA (katalognummer HL1010b) og ble amplifisert før bruk. 20 alikvoter av det amplifiserte biblioteket som tilsvarer omtrent $7,5 \times 10^4$ plaque dannende enheter (pfu), ble hver adsorbert til omtrent 0,5 milliliter (ml) av en utsående suspensjon av E. coli stamme Y1088. Suspensjonen var blitt dannet ved dyrking av en over natt kultur av Y1088 ved 37°C i NZYM eller LB supplementert med 0,2% maltose
- 35 og 10 millimolar (mM) MgSO₄, pelletering av cellene og deretter resuspending av disse i 10 mM MgSO₄ til en O.D.₆₀₀ på 0,5. Omtrent 6,5 ml smeltet NZYM topp agarose (0,7%), ved en omtrent 48°C ble tilsatt til hver fag/cellesuspensjon og den

- resulterende blandingen ble helt på en av tjue 150 millimeter (mm) NZYM agarskåler (forvarmet til 42°C). Det totale antallet fag sådd ut for primær screening var omtrent $1,5 \times 10^6$. Etter fire timers inkubasjon ved 42°C, etterfulgt av avkjøling ved 4°C i flere timer ble duplikate nitrocellulosefiltere (Millipore) plaque "lifts" dannet fra hver plate
- 5 ifølge fremgangsmåtene til Benton og Davies (Science, 196:180, 1977). Den tilfeldige oligonukleotid primingprosedyren til Feinberg og Vogelstein (Anal. Biochem. 137:266, 1983) ble anvendt for å danne fra templat rotte FSH reseptor DNA-fragmentet beskrevet i det foregående avsnittet, en ^{32}P -merket probe med en spesifikk aktivitet på $1-2 \times 10^9$ tellinger pr. minutt (cpm/mikrogram (μg)). Prehybridisering av nitrocellulosefilter fag
- 10 "lifts" ble utført i en buffer inneholdende 50% formamid, 5X SSC [1X SSC er 0,15 molar (M) natriumklorid, 0,015 M natriumsitrat], 20 mM natriumfosfatbuffer, pH 7,2, 10X Denhardts reagens (50X Denhardts reagens er 1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidon og 1% bovint serum albumin) og 100 $\mu\text{g/ml}$ tRNA ved 37°C i omtrent 6 timer. Hybridisering av filtrene ble utført i den samme bufferen med unntagelse av at FSH
- 15 reseptor DNA-proben fra rotte ble tilsatt i en konsentrasjon på omtrent 3×10^6 cpm/ml buffer. Etter hybridisering i 16-24 timer ved 37°C ble probe i overskudd vasket fra filtrene i 2X SSC, 0,1% SDS ved romtemperatur i 30 minutter og deretter i 0,2X SSC, 0,1% SDS ved 37°C i 60 minutter. Filtrene ble deretter utsatt for XAR film (Kodak) over natt ved -70°C. Seks duplikate positiver ble identifisert fra den primære bibliotek
- 20 screening. Med den vide enden av en pasteur pipette ble plaquedannende agarpluggen fjernet fra 150 mM skåler i regioner hvor de positive klonene var beliggende. Fagen ble eluert ved å nedsenke pluggene i SM. Den suspenderte fagen ble deretter på ny platet på 150 mm NZYM agarskåler som beskrevet for den primære screenen. Skåler som inneholdt omtrent 500 pfu pr. skål ble valgt for sekundær screening. Prosedyrene
- 25 anvendt for filter "liftene" og filterhybridiseringene for den sekundære screening var de samme som beskrevet for den primære screening.

- Etter den sekundære screening ble fem antatte humane FSH-reseptorpositiver identifisert og isolert som rensede $\lambda\text{gt}11$ bakteriofagkloner. De ble tildelt følgende
- 30 betegnelser: 1-5, 5-10, 11-11, 13-9 og 15-6.

Bestemmelse av DNA-sekvensene til antatte humane FSH-reseptor cDNA kloner

- Bakteriofag DNA ble dannet fra hver av $\lambda\text{gt}11$ cDNA isolatene ved anvendelse av platelysatmetoden beskrevet i Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, "
- 35 2. utgave, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, side 2.118. Bakteriofag DNA ble spaltet med EcoRI restriksjonsendonuklease og deretter størrelses-fraksjonert i en agarosegel for rensing av cDNA innskuddsfragmentene. Rensede cDNA innskudd ble

subklonet inn i EcoRI setet til pUC18 for å lette påfølgende kloning og sekvenseringsmanipuleringer. Dobbelt-trådet plasmid DNA ble rensset fra 5 ml kulturer av vertsstammen *E. coli* MC1061 ved alkalisk lyseringsmetoden i liten skala (Sambrook, ibid. s. 1.25), og deretter rensset ved føring over Elutip-d kolonner (Schleicher & Schuell, Keene, NH) ved anvendelse av forhandlerens protokoll. Halvparten av plasmid DNA oppnådd fra hver liten-skala plasmid preparering ble deretter denaturert i 0,2 normal NaOH, 0,2 mM EDTA i et volum på 20 mikroliter (μ l) ved romtemperatur i 10 minutter. Denaturert plasmid DNA ble nøytralisert og etanol presipitert ved tilsetning av 7,5 μ l 7,5 M ammoniumacetat og 110 μ l 100% etanol og avkjøling av blandingen i flytende nitrogen. DNA presipitatet ble pelletert ved sentrifugering i en mikrofuge i 10 minutter. DNA pelletene ble vasket i 70% etanol og tørket. Sekvenseringsreaksjonene ble utført med sekvenase T7 DNA polymerase (United States Biochemical) ifølge forhandlerens spesifikasjoner. Preliminære sekvenseringsreaksjoner ble utført med forover og reverse sekvenseringsprimere (Pharmacia LKB) for pUC18 polylinker regionen. Data dannet fra den prliminære sekvenseringen ble anvendt for å konstruere humane FSH-reseptor-spesifikke sekvenseringsprimere. Primerene ble enten syntetisert på en modell 391 Applied Biosystems DNA syntetisator eller bestilt fra national Biosciences, Inc., Hamel, MN. Noen DNA-sekvensdata ble oppnådd ved subkloning av mindre restriksjonsendo-nukleasefragmenter av opprinnelige kloner inn i pUC18 og gjentatte sekvenseringsreaksjoner med forover og revers primere.

Preliminære sekvensdata viste at ingen av de fem cDNA isolatene representerte full-lengde protein kodende regionen til den humane FSH-reseptoren, men at kombinerte sekvensdata fra klonene kunne bli anvendt for å oppnå fullstendig proteinsekvens. Et skjematisk diagram av relative beliggenheter til hver av de fem klonene i relasjon til et kart av den fullstendige humane FSH-reseptor cDNA sekvensen er gitt i figur 1. Den fullstendige humane FSH-reseptor cDNA sekvensen, oppnådd ved kombinerende av sekvensavlesningene fra de overlappende klonene ved anvendelse av Genetics Computer Group (GCG) fragment oppstillings computerprogrammet er angitt i sekvens ID: 1 og den utledede aminosyresekvensen er angitt i sekvens ID: 2. Analyse av human FSH reseptor DNA sekvensen resulterte i identifikasjon av en lang åpen leseramme på 2085 nukleotider som koder for et protein på 695 aminosyrer. Den humane FSH reseptoren er derfor 3 aminosyrer lengre enn FSH-reseptoren fra rotte. Totale prosentvis identiteter mellom rotte og human FSH-reseptor DNA og proteinsekvensene ble bestemt ved anvendelse av GCG Bestfit programmet og var på henholdsvis 87% og 90%. Den ekstracellulære aminoterminale hydrofile delen av den humane FSH

reseptoren blir vurdert å være 349 aminosyrer i lengde og har 87% identitet felles med den tilsvarende regionen til FSH-reseptoren til rotte. De syv membrandekkende regionene til de to artene, som er koblet ved tre ekstracellulære og tre intracellulære løkker har 95% identitet felles og dikarboksy-terminale intracellulære regionene har bare 81% identitet felles. Den delvise aminosyresekvensen publisert av Parmentier, Science 246:1620-1622, 1989, tilsvarer aminosyrene 399 til 525 i sekvens ID No:2.

Klon 5-10 var en variant på grunn av at den inneholdt et innskudd på 0,25 kb etter T i nukleotidposisjon 448 i sekvens ID No:1. DNA-sekvensen til innskuddet var ikke lik noen del av rotte eller human FSH-reseptor DNA-sekvens og er heller ikke lik noen kjent sekvens i genbanken eller EMBL DNA sekvens databasene. Den tilsvarende regionen i klon 11-11 inneholdt ikke dette innskuddet. LH reseptor cDNA klonene isolert fra et humant thyroid cDNA bibliotek inneholder lignende variasjoner (Frazier, Mol. Endocrinol. 4:1264-1276, 1990). Disse variantene er sannsynligvis avledet fra ufullstendige og/eller varierende spleisede mRNA molekyler. Tilstedeværelse av en 3' spleise consensus sekvens (CAG'G) ved 3' grensen av 5-10 innskuddet er bevis som understøtter denne forklaringen.

pUC18 plasmidene inneholdende 11-11 (betegnet pHFSHR11-11), 15-6 (betegnet pHFSHR15-6) og 5-19 (betegnet pHFSHR5-10) cDNA innskudd ble deponert til American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, mars 1, 1991 og har mottatt aksessjonsnumrene på henholdsvis ATCC68538, ATCC68540 og ATCC68539. Disse deponeringene ble utført i henhold til alle kravene ifølge Budapestavtalen.

Eksempel 2. Konstruksjon av vektorer for ekspresjon av full-lengde human FSH-reseptor i pattedyrceller.

Strategi for omkonstruksjon av en human FSH-reseptor DNA konstruksjon for ekspresjon i pattedyrceller er vist i figurene 2A og 2B. Med referanse til figur 2A ble 5' 691 basepar (bp) NsiI-BamHI fragmentet som inneholdt start ATG rensset fra pHFSHR11-11 og subklonet inn i pUC18 spaltet med PstI og BamHI. Det resulterende plasmidet pHFSHR11-11nb ble linearisert med SphI. termini ble gjort butte ved behandling med Klenow fragment av DNA-polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA). Etter ligering av XhoI linkerene (New England Biolabs, Beverly, MA) til buttendete termini, ble blandingen spaltet med XhoI og BamHI og det omtrent 700 bp human FSH reseptor fragmentet ble gelrenset. Et fragment fra midtregionen av human FSH-reseptor cDNA ble isolert fra pHFSHR11-11 ved spalting med BamHI og SphI og gelrensing av stykker på omtrent 734 bp. Det 3' humane FSH-reseptorfragmentet,

som inneholdt TAA stoppkodonet, ble isolert fra pHFSHR15-6 ved først spaltning av plasmidet med DraIII og deretter gjøre termini butte i en reaksjon med T4 DNA polymerase. XhoI linkerene ble ligert til de butte endene og den resulterende blandingen ble spaltet med SphI og XhoI og 3' 690 bp (omtrentlig) SphI-XhoI fragmentet ble isolert og renset.

Med referanse til figur 2B ble 5' 700 bp XhoI-BamHI og midtre 734 bp BamHI-SphI human FSH reseptor cDNA fragmentene subklonet inn i pUC18-XhoI (dannet i dette laboratoriet ved omdanning av SmaI setet i pUC18 polylinkeren til et XhoI sete med XhoI linkerene) spaltet med XhoI og SphI. Det resulterende plasmidet pHFSHR1.4xs ble spaltet med XhoI og SphI. Spaltet DNA ble størrelsesfraksjonert ved elektroforese i en 5-6% polyakrylamidgel og fragmentet på omtrent 1400 bp inneholdende 5' og de midtre regionene av human FSH-reseptor cDNA ble spaltet ut og renset ved elektroeluering. 3' SphI-XhoI fragmentet som inneholder TAA stoppkodonet ble subklonet inn i pUC18-XhoI spaltet med SphI og XhoI. Det resulterende plasmidet, pHFSHR675sx, ble spaltet med SphI og EcoRI. Spaltet DNA ble fraksjonert i en 5-6% polyakrylamidgel og omtrent 700 bp stykker ble tatt ut og renset ved elektroeluering. Den fullstendige humane FSH-reseptor kodende regionen ble oppstilt ved kombinerings av 5' 1400 bp XhoI-SphI fragmentet med 3' 700 bp SphI-EcoRI fragmentet i en ligering med pUC18-XhoI spaltet med XhoI og EcoRI. Den riktige oppstillingen av konstruksjonen, betegnet pFSHRX, ble verifisert ved restriksjonsendonukleasespaltning og DNA-sekvensering. Det fullstendige omkonstruerte humane reseptor 2.1 kb XhoI fragmentet som inneholder omtrent 18 bp av den 5' ikke-kodende sekvensen og 12 bp av den 3' ikke-kodende sekvensen i tillegg til hele humane FSH-reseptor protein kodende regionen, ble spaltet fra pHFSHRX ved XhoI spaltning. Spaltet DNA ble størrelsesfraksjonert ved elektroforese i en 0,7% agarosegel. 2.1 kb XhoI fragmentet ble spaltet fra gelen, renset ved elektroeluering i en Little Blue TankTM (ISCO) ved anvendelse av fremgangsmåten anbefalt av forhandleren og skutt inn i XhoI kloningssetene til celle-ekspresjonsvektorplasmidene til pattedyr. Plasmidene inneholdende innskuddet i den hensiktsmessige orienteringen for human FSH-reseptor mRNA transkripsjon ble selektert ved restriksjonsendonukleasefragmentanalyse. Før innføring i pattedyrceller ble ekspresjonsvektorplasmid DNA renset enten ved to påfølgende sentrifugeringer med høy hastighet gjennom cesiumklorid tetthetsgradienter, eller ved anvendelse av plasmid maxi kit (Qiagen, Chatsworth, CA) ifølge forhandlerens protokoll.

Hvilke som helst egnet ekspresjonsvektor fra pattedyrcelle kan bli anvendt for ekspresjon av den humane FSH-reseptoren. Nødvendige vektorplasmidkomponenter

innbefatter følgende: en eukaryot promoter så som metallothionein I (MMT-I) promoteren fra mus, Rous Sarcoma virus promoteren eller simian virus 40 early eller late promoterne for å drive transkripsjonen av den humane FSH-reseptor mRNA, et markørgen så som neomycin resistensgenet (Neo), dihydrofolat reduktase (DHFR) genet eller multimedikament resistens genet (MDR) for seleksjon av transfekterte celler, et polyadenyleringssignal (poly A), så som SV40 tidlig polyadenyleringsregion for 3' prosessering av reseptor RNA transkriptet og et bakterielt replikasjonsorigo og antibiotisk resistensgen så som pBR 322 ori og ampicillin resistensgenet for å muliggjøre vekst og propagering av vektor plasmidet i en egnet *E. coli* stamme. For noen cellerlinjer kan det være viktig å innbefatte en intron i regionen som blir transkribert inn i den humane FSH-reseptoren kodende for mRNA. Det er foretrukket å plassere intronet mellom promoteren og det humane FSH-reseptor cDNA innskuddet for derved å posisjonere det i den 5' utranslaterte regionen til det humane FSH-reseptor RNA transskriptet. En hvilken som helst egnet intron kan bli anvendt. Intronet anvendt i våre eksperimenter var en 2 kb XbaI-PstI del av intron A i det humane glykoproteinet α subenhet gen (Fiddes, J. Mol. Appl. Genet. 1:13, 1981). I ekspresjonsvektorene ble det skutt inn mellom MMT-1 promoterregionen og det humane FSH-reseptor cDNA fragmentet. Det forkortede intronet beholdt endogen spleiseakseptor, mens spleisedonoren ble gitt av et syntetisk oligonukleotid.

Et diagram av den humane FSH-reseptor ekspresjonsvektoren anvendt for CHO-celletransfeksjoner, pD α HFSHRX (human FSH reseptor i CLH3AXSV2DHFRh α IVS), er vist i figur 3 og et diagram av den humane FSH-reseptor ekspresjonsvektoren anvendt for å stabilt transfektere Y1 cellene, pN_HFSHRX (human FSH reseptor i CLH3AXSV2NEOh α IVS), er vist i figur 4. MMT-I gensekvensene (nukleotidnumrene 4542-7514 i figur 3, nukleotidnumrene 5192-8164 i figur 4) som innbefatter promoterregionen, er de samme som de som er vist oppstrøms for XhoI setet i konstruksjon av CLH3X (Reddy, DNA 6:461, 1987). Det humane glykoprotein α subenhet gen intron A fragmentet beskrevet i foregående avsnitt, er beliggende mellom nukleotidnumrene 7514 og 9514 i figur 3 og mellom nukleotidnumrene 8164 og 10164 i figur 4. Nedstrøms for XhoI setet ble MMT-I intronene og polyadenyleringssignalsekvensene fjernet og erstattet med SV40 tidlig polyadenyleringsregionen (nukleotidnumrene 11614-11857 i figur 3, nukleotidnumrene 12264-12508 i figur 4). pML regionen (Lusky, Nature 293:79, 1981) inneholdt bakteriell replikasjonsorigo og ampicillin resistensgenet fra pBR322 (nukleotidnumrene 1925-4542 i figur 3, nukleotidnumrene 2575-5192 i figur 4). DHFR gen transkripsjonsenheten (nukleotidnumrene 1 til 1925 i figur 3), som omfatter DHFR cDNA fra mus og SV40 tidlig region

promoteren, Small T intron og early region polyadenyleringssekvenser, tilsvarer PvuII-BamHI fragmentet i pSV2DHFR (Subramani, Mol. Cell. Biol. 1:854, 1981). PvuII setet ble omdannet til BamHI sete før innskudd av fragmentet inn i ekspresjonsvektorasplasmidet. Neogen transkripsjonsenheten (nukleotidnumrene 1-2575 i figur 4) ble

5 oppstilt ved erstatning av DHFR cDNA (nukleotidnumrene 342-1077 i figur 3) med et 1385 bp HindIII-SmaI fragment fra pSV2-neo (Southern, J. Mol. Appl. Genet. 1:327, 1982), SmaI setet ble omdannet til et BamHI sete før innskudd av fragmentet inn i ekspresjonsvektorasplasmidet.

- 10 Plasmid pNohFSHRX kan bli anvendt for å transfektere de fleste kontinuerlige pattedyrcellelinjene og ble deponert til ATCC november 19, 1991 med aksesjonsnummer ATCC68833. Deponeringen ble utført i henhold til alle kravene ifølge Budapest avtalen. Plasmid pDohFSHRX er best egnet for transfeksjon av celler som mangler dihydrofolat reduktase (DHFR) aktivitet.

15

DNA-kloning og omkonstrueringsteknikker kan bli anvendt av fagfolk innenfor dette området for å modifisere den humane FSH-reseptor DNA-ekspresjonskonstruksjonen slik at FSH-bindende fragmenter blir kodet. Disse modifiserte DNA-fragmentene kan bli skutt inn i ekspresjonsvektorer som de som er beskrevet heri og anvendt for å

20 transfektere pattedyrceller for å utvikle linjer som utskiller oppløselig FSH-bindende fragmenter av den humane FSH-reseptoren, så som den aminoterminal ekstrasellulære domenen eller et FSH-bindende fragment derav.

Eksempel 3. Utvikling av pattedyrceller som stabilt uttrykker en funksjonell human rekombinant FSH-reseptor eller et FSH-bindende fragment eller en mutant derav.

25

Egnede pattedyrceller for ekspresjon av rekombinant human FSH og derivater derav innbefatter kinesisk hamster ovarie (CHO), adenocarcinoma Y1 fra mus, hypofyse GH₃ fra rotte, human brystcarcinoma MCF7 og human embryonisk nyre 293. I dette eksemplet er anvendelsen av Y1 og CHO cellene beskrevet.

30

Y1 cellene er en klonal steroid utskillende celledamme initiert fra en adrenal cortex tumor fra mus (Yasumura, Cancer Res. 26: 529-536, 1966). Disse cellene ble oppnådd fra ATCC celledammen (ATCC CCL 79) og ble opprettholdt i kultur ved vekst i Ham's F10 medium supplementert med 15% hesteserum (HS), 2,5% FBS, og 1% L-glutamin

35 (Y1 vekstmedium).

CHO-DUKX cellene er en klonal mutant av kinesisk hamster ovarie celler som mangler

dihydrofolat reduktase aktivitet (urlaub G. og Chasin, .A. PNAS 77: 4216-4220, 1980). Cellene ble opprettholdt i minimalt essensielt medium alfa (MEM- α) supplementert med 10% FBS og 1% L-glutamin (CHO vekstmedium).

- 5 All celledyrkning ble utført ved 37°C i en 5% CO₂, fuktatmosfære.

Kalsiumfosfat transfeksjoner

- Transfeksjonsprotokollen som ble anvendt var en modifikasjon av en publisert metode (Graham, Virology 52: 456, 1973). Omtrent 24 timer før transfeksjonen ble cellene sådd
- 10 ut i 100 mm diameter skåler i en tetthet på 7×10^5 celler/skål (CHO-DUKX) eller 1×10^6 celler/skål (Y1). For transfeksjoner ble 10 μ g av vektorplasmid DNA (pD α HFSHRX for CHO-DUKX celler, pN α HFSHRX for Y1 cellene) tilsatt til 0,5 ml transfeksjonsbuffer. Transfeksjonsbufferen ble dannet ved kombinerings av 4 gram (g) NaCl, 0,185 g KCl, 0,05 g Na₂HPO₄, 0,5 g dekstrose og 2,5 g HEPES i sterilt, destillert
- 15 vann og justering av volumet til 500 ml og pH til 7,5. Til DNA/transfeksjonsbufferblandingen ble det tilsatt 31 μ l 2 M CaCl₂. Oppløsningen ble blandet ved anvendelse av en vortex mikser og latt stå ved romtemperatur i 45 minutter for å muliggjøre at DNA presipitatet dannes. DNA presipitatet ble lagt over cellene etter fjerning av kulturmediet. Etter 20 minutter ved romtemperatur 5 ml av hensiktsmessig
- 20 vekstmedium tilsatt og cellene ble dyrket i 6 timer. Mediet ble fjernet og cellene ble sjokkbehandlet i 3,5 minutter i 3-4 ml transfeksjonsbuffer inneholdende 15% glyserol. Cellene ble skylt to ganger med fosfatbuffret saltvann før tilsetning av 10 ml vekstmedium. Omtrent 48 timer etter transfeksjonen ble CHO-DUKX cellene subdyrket ved et 1:10 splittforhold og seleksjonsmedium ble tilsatt. Y1 cellene ble dyrket i 72 timer
- 25 etter transfeksjonen før subdyrking ved et 1:5 splittforhold i seleksjonsmediet. Seleksjonsmedium for CHO-DUKX cellene består av MEM- α uten ribonukleosider og deoksyribonukleosider supplementert med 10% dialysert FBS, 1% L-glutamin og 0,02 μ M methotreksat (MTX). Seleksjonsmediet for Y1 cellene besto av Y1 vekstmedium med 80 μ g/ml G418. MTX-resistente CHO-DUKX cellekolonier og G418-resistente Y1
- 30 cellekolonier ble dannet etter omtrent 2 til 3 uker og ble individuelt plukket og dyrket helt til celleantallet var tilstrekkelig for cryopreservering og testing for hormonreagerbarhet.

Demonstrering av human rekombinant FSH-reseptor bioaktivitet i stabilt transfekterte CHO-celler

- 35 For å bestemme om den omkonstruerte humane FSH-reseptor cDNA konstruksjonen kunne produsere et protein som var biologisk funksjonell i stabilt transfekterte CHO

- celler ble MTX-resistente CHO-cellekolonier behandlet med human rekombinant FSH og intracellulære cAMP nivåer ble målt. For cAMP analysen ble cellene subdyrket i skåler med 12 brønner i en tetthet på $2,5 \times 10^4$ celler/brønn i CHO celleseleksjons-medium. Etter 72 timers dyrkning ble hver brønn vasket med 1,5 ml varmt
- 5 vekstmedium. Til hver vasket brønn ble det tilsatt 300 μ l serumfritt vekstmedium inneholdende 0,1 mM 3-isobutyl-1-metylxanthin (Sigma). Etter 15 minutters dyrkning ble human rekombinant FSH tilsatt til mediet i hver brønn slik at den endelige konsentrasjonen var på omtrent 335 ng (2413 mIU) pr. ml. Etter 30 minutters dyrkning ble analysen avsluttet ved å utsette cellene for 4 hurtige frysetine sykluser. Et 50 μ l
- 10 alikvot av hvert cellelysat ble overført til et 1,5 ml rør for å bestemme proteininnholdet. Kald etanol (300 μ l) ble tilsatt til hver gjenværende lysatprøve før overføring til separate 1,5 ml rør. Alle lysatprøvene ble sentrifugert ved $13.000 \times g$ i 15 minutter for å fjerne celledebriet. Bestemmelse av totalt oppløselig protein ble utført med et protein analysekit fra Bio-Rad (katalog nr. 500-0002) ved anvendelse av protokollen fra
- 15 forhandleren. Etanol-behandlede lysatprøver ble frysetørket i alikvoter på 5-100 μ l og resuspendert i 100 μ l av analysebufferen gitt i Dupont/NEN Medcal Products cAMP analysekitt (katalog nr. NEK-033). cAMP-innholdet til de resuspenderte lysatprøvene ble bestemt ved anvendelse av den acetylte radioimmunanalyseprotokollen tilført med kittet. Prøvene ble ikke fortynnet for analysen. I de fleste humane FSH-reseptor-
- 20 transfekterte CHO cellelinjene ble høyere intracellulære cAMP nivåer målt etter FSH-stimulering enn i kontrollene (utransfekterte CHO-DUKX celler og CHO-DUKX celler transfektet med CLH3AXSV2DHFRhoIVS). Den gjennomsnittlige responsen var på omtrent 16-ganger i forhold til kontrollene.
- 25 En ikke-klonal cellelinje, CHOFSHR4Q-13 ble valgt for en hormondoseresponsanalyse. Den anvendte prosedyren var den samme som i det foregående avsnittet med unntagelse av at cellene ble behandlet med enten human rekombinant FSH eller LH i konsentrasjoner varierende fra 0-10.000 mIU/ml. Hver dose ble analysert i triplikat. Mengden av intracellulært cAMP som ble produsert ble
- 30 uttrykt i nanomol (nmol) pr. milligram (mg) oppløselig protein og plottet mot FSH eller LH konsentrasjon for å danne doseresponskurver. FSH og LH doseresponskurvene er vist i figur 5. Resultatene viser at CHOFSHR4Q-13 CHO cellelinjen utviser en mettbart økning i intracellulær cAMP i respons til FSH-stimuleringen, men ikke i respons til LH-stimuleringen. Halv-maksimal FSH-stimulering (ED_{50}) oppsto ved en
- 35 dose på 144 mIU/ml FSH. Human FSH-reseptor cDNA kan derfor bli anvendt for å produsere et biologisk funksjonelt humant FSH-reseptor protein i CHO celler og dette muliggjør at cellene formidler en spesifikk cAMP respons overfor FSH og ikke LH.

- Det humane FSH-reseptor innholdet i CHO^HFSHR4Q-13 linjen, eller en lignende linje som produserer den humane rekombinante FSH-reseptoren eller FSH-bindende fragmenter eller mutanter derav, kan bli økt ved å utsette cellene for trinnvise økninger i MTX konsentrasjonen. Dette forårsaker amplifikasjon av DHFR cDNA kopi antallet sammen med koblede sekvenser som omfatter human FSH-reseptor cDNA, indirekte økning av syntesen av de kodede proteinene. Det kan om nødvendig bli utført for å øke sensitiviteten til bioanalysen. Pattedyceller som uttrykker høye nivåer av human FSH-reseptor eller FSH-bindende fragmenter eller mutanter derav, kan bli anvendt for fremstilling av store mengder human FSH-reseptorprotein for anvendelse som terapeutiske stoffer eller i reseptorradioimmunanalyser.

- CHO^HFSHR4Q-13 linjen, eller en lignende linje, kan også bli anvendt i en analyse for å vurdere in vitro bioaktiviteten til farmasøytiske preparater inneholdende FSH, eller FSHlignende forbindelser. Et reportergen så som luciferase kan bli operasjonelt koblet til en cAMP responselement og økninger i cAMP nivåene kan bli indirekte målt ved en ikke-radioaktiv metode, så som bioluminisens, for å oppnå et mål på FSH-bioaktiviteten.
- CHO^HFSHR4Q-13 linjen ble deponert til ATCC november 19, 1991, som aksjonsnummer ATCC CRL 10921. Deponeringen ble utført i henhold til alle kravene i Budapestavtalen.

- Demonstrasjon av rekombinant human FSH-reseptor bioaktivitet i stabilt transfekterte Adrenal Y1 celler fra mus
- For å bestemme om den omkonstruerte humane FSH-reseptor cDNA konstruksjonen kunne produsere et protein som var biologisk funksjonelt i stabilt transfekterte Y1 celler ble G418-resistente Y1 cellekolonier behandlet med human rekombinant FSH og kulturmediet ble analysert for progesteroninnhold. For progesteronanalysen ble cellene subdyrket i 6 brønnskåler (35 mm brønndiamter) ved en tetthet på 4×10^5 celler/brønn i Y1 celleseleksjonsmedium. Etter to dagers dyrkning ble Y1 celleseleksjonsmediet fjernet og erstattet med 3 ml Hams F10 medium supplementert med 5% hesteserum, 0,8% føtalt bovint serum, 1% L-glutamin og 80 µg/ml G418. Etter inkubasjon i en dag ble mediet fjernet og cellene ble vasket to ganger med 2 ml Hams F10 medium supplementert med 1 mg/ml bovint serumalbumin (fraksjon V), 1% L-glutamin og 80 µg/ml G416 (analysemedium). På dette tidspunktet ble det gjennomsnittlige celleantallet pr. brønn vurdert for hver cellelinje ved å fjerne og telle celler fra de tre

- forsøksbrønnene. Cellene ble deretter dyrket i 4 timer med 1 ml analysemedium inneholdende 100 mIU/ml human rekombinant FSH. Etter inkubasjon ble kulturskålene plassert på is mens kulturmediet fra hver brønn ble overført til separate glass 12 x 75 reagensrør. Rørene inneholdende kulturmediet ble plassert i et kokende vannbad i 10 minutter, sentrifugert ved 1.100 x g ved 4°C. Supernatantene ble overført til rene 12 x 75 glassreagensrør og lagret ved -20°C over natt. Progesteronnivåene ble målt ved anvendelse av Serono Diagnostics Progesterone MAIA, produkt nr. 12274, distribuert av Ciba Corning, Medfield, MA. Analysen ble utført ifølge instruksjonene gitt av forhandlerene, med unntagelse av at kulturmedieprøvene og progesteronet for standardkurven ble fortynnet i en oppløsning av fosfatbuffret saltvann inneholdende 0,1% bovint serumalbumin og 0,6% natriumazid, i stedet for fortynningsbuffer gitt i kittet. Progesteronet for standardkurven ble oppnådd fra Cal Biochem (katalog nr. 5341) og ble fortynnet til en konsentrasjon på 15 µg/ml i 100% etanol før bruk. Stamoppløsningen ble lagret ved -70°C. Sluttkonsentrasjonene til progesteronfortynningene i standardkurven var de samme som de som ble anbefalt i analysekittet. Fortynnete progesteronstandarder var stabile ved 4°C i en uke.

- Flere FSH-behandlede Y1 linjer, stabilt transfektert med human FSH-reseptor, utskilte økte nivåer av progesteron relativt til kontrollene (samme linje som ikke ble behandlet med FSH, utransfektete Y1 celler, Y1 celler transfektert med CHL3AXSV2NEOh α IVS). En ikke-klonal linje, Y1HFSHR4-38, ble valgt for hormondoseresponsanalyser. Den anvendte prosedyren var den samme som den som ble beskrevet i det foregående avsnittet med unntagelse av at cellene ble behandlet med et område av FSH-konsentrasjoner, 0-100 mIU/ml. Hver dose ble laget i duplikat. Mengden av progesteron produsert av FSH-stimulerte Y1 celler ble normalisert til 1×10^6 celler og plottet mot FSH-konsentrasjonen for å danne en doseresponskurve. Doseresponskurven er vist i figur 6. I dette bestemte eksperimentet ble en 25 ganger økning i progesteronaktivitet observert ved en dose på 20 mIU/ml human rekombinant FSH. Det lineære området var fra 2,5 til 20 mIU/ml FSH og ED₅₀ var 6,4 mIU/ml FSH. Disse resultatene demonstrerer at FSH-dose avhengig økninger i progesteronsekresjonen ble observert i Y1 celler som var stabilt transfektete med den humane rekombinante FSH-reseptoren. Den humane FSH-reseptoren er derfor funksjonelt aktiv når den blir uttrykt i adrenale Y1-celler fra mus.
- Celle populasjoner avledet fra CHO^HF^HSHR4Q-13 eller Y1HFSHR4-38 cellelinjer, eller lignende cellelinjer, sensitive in vitro bioanalyser for FSH og FSH-lignende forbindelser. Andre FSH in vitro bioanalyser som for tiden blir anvendt, så som

- granulosa celledaromatasebioanalysen og Sertoli celledaromatase bioanalysen, krever etablering av primære cellekulturer fra rotte hver gang en analyse blir utført. For den nye Y1 cellen og CHO cellebioanalysene blir stabilt transformerte kontinuerlige cellelinjer anvendt. Dette muliggjør praktisering av in vitro bioanalysemetoder som er
- 5 overlegne ifølge kjente metoder når det gjelder letthet, nøyaktighet og samsvar.

SEKVENSLISTE

INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 1

SEKVENNS KARAKTERTREKK

- 5 (A) lengde: 2179
 (B) type: nukelinsyre
 (C) trådtype: dobbel
 (D) topologi: lineær
 molekyltype: cDNA til mRNA
- 10 opprinnelig kilde:
 (A) organisme: homo sapiens
 (F) vevstype: testikler
 kilde:
 (A) bibliotek: λ gt11 cDNA bibliotek, ClonTech #HL1010b
- 15 (B) klon: pHFSHR11-11, pHFSHR15-6
 trekk:
 (A) navn/nøkkel: protein kodende region
 (B) beliggenhet: 75 til 2159
 Sekvensbeskrivelse: SEQ ID NO: 1

20	TGTGGAGCTT CTGAGATCTG TGGAGGTTTT TCTCTGCAAA TGCAGGAAGA AATCAGGTGG	60
	ATGGATGCAT AATT ATG GCC CTG CTC CTG GTC TCT TTG CTG GCA TTC CTG	110
	Met Ala Leu Leu Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Leu	
	-15 -10	
	AGC TTG GGC TCA GGA TGT CAT CAT CGG ATC TGT CAC TGC TCT AAC AGG	158
	Ser Leu Gly Ser Gly Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg	
	-5 1 5 10	
	GTT TTT CTC TGC CAA GAG AGC AAG GTG ACA GAG ATT CCT TCT GAC CTC	206
	Val Phe Leu Cys Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp Leu	
	15 20 25	
	CCG AGG AAT GCC ATT GAA CTG AGG TTT GTC CTC ACC AAG CTT CGA GTC	254
	Pro Arg Asn Ala Ile Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val	
	30 35 40	
	ATC CAA AAA GGT GCA TTT TCA GGA TTT GGG GAC CTG GAG AAA ATA GAG	302
	Ile Gln Lys Gly Ala Phe Ser Gly Phe Gly Asp Leu Glu Lys Ile Glu	
	45 50 55	
	ATC TCT CAG AAT GAT GTC TTG GAG GTG ATA GAG GCA GAT GTG TTC TCC	350
	Ile Ser Gln Asn Asp Val Leu Glu Val Ile Glu Ala Asp Val Phe Ser	
	60 65 70 75	
	AAC CTT CCC AAA TTA CAT GAA ATT AGA ATT GAA AAG GCC AAC AAC CTG	398
	Asn Leu Pro Lys Leu His Glu Ile Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asn Leu	
	80 85 90	

CTC	TAC	ATC	AAC	CCT	GAG	GCC	TTC	CAG	AAC	CTT	CCC	AAC	CTT	CAA	TAT	446
Leu	Tyr	Ile	Asn	Pro	Glu	Ala	Phe	Gln	Asn	Leu	Pro	Asn	Leu	Gln	Tyr	
			95					100					105			
CTG	TTA	ATA	TCC	AAC	ACA	GGT	ATT	AAG	CAC	CTT	CCA	GAT	GTT	CAC	AAG	494
Leu	Leu	Ile	Ser	Asn	Thr	Gly	Ile	Lys	His	Leu	Pro	Asp	Val	His	Lys	
			110				115					120				
ATT	CAT	TCT	CTC	CAA	AAA	GTT	TTA	CTT	GAC	ATT	CAA	GAT	AAC	ATA	AAC	542
Ile	His	Ser	Leu	Gln	Lys	Val	Leu	Leu	Asp	Ile	Gln	Asp	Asn	Ile	Asn	
			125				130					135				
ATC	CAC	ACA	ATT	GAA	AGA	AAT	TCT	TTC	GTG	GGG	CTG	AGC	TTT	GAA	AGT	590
Ile	His	Thr	Ile	Glu	Arg	Asn	Ser	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Phe	Glu	Ser	
					145					150					155	
GTG	ATT	CTA	TGG	CTG	AAT	AAG	AAT	GGG	ATT	CAA	GAA	ATA	CAC	AAC	TGT	638
Val	Ile	Leu	Trp	Leu	Asn	Lys	Asn	Gly	Ile	Gln	Glu	Ile	His	Asn	Cys	
				160					165						170	
GCA	TTC	AAT	GGA	ACC	CAA	CTA	GAT	GAG	CTG	AAT	CTA	AGC	GAT	AAT	AAT	686
Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Gln	Leu	Asp	Glu	Leu	Asn	Leu	Ser	Asp	Asn	Asn	
			175					180					185			
AAT	TTA	GAA	GAA	TTG	CCT	AAT	GAT	GTT	TTC	CAC	GGA	GCC	TCT	GGA	CCA	734
Asn	Leu	Glu	Glu	Leu	Pro	Asn	Asp	Val	Phe	His	Gly	Ala	Ser	Gly	Pro	
			190				195					200				
GTC	ATT	CTA	GAT	ATT	TCA	AGA	ACA	AGG	ATC	CAT	TCC	CTG	CCT	AGC	TAT	782
Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ser	Arg	Thr	Arg	Ile	His	Ser	Leu	Pro	Ser	Tyr	
			205				210					215				
GGC	TTA	GAA	AAT	CTT	AAG	AAG	CTG	AGG	GCC	AGG	TCG	ACT	TAC	AAC	TTA	830
Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Asn	Leu	
			220				225			230					235	
AAA	AAG	CTG	CCT	ACT	CTG	GAA	AAG	CTT	GTC	GCC	CTC	ATG	GAA	GCC	AGC	878
Lys	Lys	Leu	Pro	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	Met	Glu	Ala	Ser	
				240					245						250	
CTC	ACC	TAT	CCC	AGC	CAT	TGC	TGT	GCC	TTT	GCA	AAC	TGG	AGA	CGG	CAA	926
Leu	Thr	Tyr	Pro	Ser	His	Cys	Cys	Ala	Phe	Ala	Asn	Trp	Arg	Arg	Gln	
			255					260					265			
ATC	TCT	GAG	CTT	CAT	CCA	ATT	TGC	AAC	AAA	TCT	ATT	TTA	AGG	CAA	GAA	974
Ile	Ser	Glu	Leu	His	Pro	Ile	Cys	Asn	Lys	Ser	Ile	Leu	Arg	Gln	Glu	
			270				275					280				
GTT	GAT	TAT	ATG	ACT	CAG	ACT	AGG	GGT	CAG	AGA	TCC	TCT	CTG	GCA	GAA	1022
Val	Asp	Tyr	Met	Thr	Gln	Thr	Arg	Gly	Gln	Arg	Ser	Ser	Leu	Ala	Glu	
			285				290				295					
GAC	AAT	GAG	TCC	AGC	TAC	AGC	AGA	GGA	TTT	GAC	ATG	ACG	TAC	ACT	GAG	1070
Asp	Asn	Glu	Ser	Ser	Tyr	Ser	Arg	Gly	Phe	Asp	Met	Thr	Tyr	Thr	Glu	
					305					310					315	

TTT GAC TAT GAC TTA TGC AAT GAA GTG GTT GAC GTG ACC TGC TCC CCT	1118
Phe Asp Tyr Asp Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser-Pro	
320 325 330	
AAG CCA GAT GCA TTC AAC CCA TGT GAA GAT ATC ATG GGG TAC AAC ATC	1166
Lys Pro Asp Ala Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile	
335 340 345	
CTC AGA GTC CTG ATA TGG TTT ATC AGC ATC CTG GCC ATC ACT GGG AAC	1214
Leu Arg Val Leu Ile Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn	
350 355 360	
ATC ATA GTG CTA GTG ATC CTA ACT ACC AGC CAA TAT AAA CTC ACA GTC	1262
Ile Ile Val Leu Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val	
365 370 375	
CCC AGG TTC CTT ATG TGC AAC CTG GCC TTT GCT GAT CTC TGC ATT GGA	1310
Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly	
380 385 390 395	
ATC TAC CTG CTG CTC ATT GCA TCA GTT GAT ATC CAT ACC AAG AGC CAA	1358
Ile Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln	
400 405 410	
TAT CAC AAC TAT GCC ATT GAC TGG CAA ACT GGG GCA GGC TGT GAT GCT	1406
Tyr His Asn Tyr Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala	
415 420 425	
GCT GGC TTT TTC ACT GTC TTT GCC AGT GAG CTG TCA GTC TAC ACT CTG	1454
Ala Gly Phe Phe Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu	
430 435 440	
ACA GCT ATC ACC TTG GAA AGA TGG CAT ACC ATC ACG CAT GCC ATG CAG	1502
Thr Ala Ile Thr Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln	
445 450 455	
CTG GAC TGC AAG GTG CAG CTC CGC CAT GCT GCC AGT GTC ATG GTG ATG	1550
Leu Asp Cys Lys Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met	
460 465 470 475	
GGC TGG ATT TTT GCT TTT GCA GCT GCC CTC TTT CCC ATC TTT GGC ATC	1598
Gly Trp Ile Phe Ala Phe Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile	
480 485 490	
AGC AGC TAC ATG AAG GTG AGC ATC TGC CTG CCC ATG GAT ATT GAC AGC	1646
Ser Ser Tyr Met Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser	
495 500 505	
CCT TTG TCA CAG CTG TAT GTC ATG TCC CTC CTT GTG CTC AAT GTC CTG	1694
Pro Leu Ser Gln Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu	
510 515 520	
GCC TTT GTG GTC ATC TGT GGC TGC TAT ATC CAC ATC TAC CTC ACA GTG	1742
Ala Phe Val Val Ile Cys Gly Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val	
525 530 535	

CGG AAC CCC AAC ATC GTG TCC TCC TCT AGT GAC ACC AGG ATC GCC AAG	1790
Arg Asn Pro Asn Ile Val Ser Ser Ser Ser Asp Thr Arg Ile Ala Lys	
540 545 550 555	
CGC ATG GCC ATG CTC ATC TTC ACT GAC TTC CTC TGC ATG GCA CCC ATT	1838
Arg Met Ala Met Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile	
560 565 570	
TCT TTC TTT GCC ATT TCT GCC TCC CTC AAG GTG CCC CTC ATC ACT GTG	1886
Ser Phe Phe Ala Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val	
575 580 585	
TCC AAA GCA AAG ATT CTG CTG GTT CTG TTT CAC CCC ATC AAC TCC TGT	1934
Ser Lys Ala Lys Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys	
590 595 600	
GCC AAC CCC TTC CTC TAT GCC ATC TTT ACC AAA AAC TTT CGC AGA GAT	1982
Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp	
605 610 615	
TTC TTC ATT CTG CTG AGC AAG TGT GGC TGC TAT GAA ATG CAA GCC CAA	2030
Phe Phe Ile Leu Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln	
620 625 630 635	
ATT TAT AGG ACA GAA ACT TCA TCC ACT GTC CAC AAC ACC CAT CCA AGG	2078
Ile Tyr Arg Thr Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg	
640 645 650	
AAT GGC CAC TGC TCT TCA GCT CCC AGA GTC ACC AAT GGT TCC ACT TAC	2126
Asn Gly His Cys Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr	
655 660 665	
ATA CTT GTC CCT CTA AGT CAT TTA GCC CAA AAC TAAAACACAA TGTGAAAATG	2179
Ile Leu Val Pro Leu Ser His Leu Ala Gln Asn	
670 675	

25 INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 2

SEKVENSKARAKTERTREKK

(A) lengde: 695

(B) type: aminosyre

30 (D) topologi: lineær

molekyltype: protein

trekk:

(A) navn/nøkkel: signalsekvens

(B) beliggenhet: -17 til -1

35 (C) identifikasjonsmetode: hydrofobisk

trekk:

(A) navn/nøkkel: antatt amino-terminal ekstracellulær domene

(B) beliggenhet: 1 til 349

(C) identifikasjonsmetode: likhet med andre dimeriske glykoproteinreseptor ekstracellulære domener, hydrofilisk

5 Trekk:

(A) navn/nøkkel: transmembrandomene

(B) beliggenhet: 350 til 613

(C) identifikasjonsmetode: likhet med andre G-protein-koblede reseptortransmembrane domener

10

Trekk:

(A) navn/nøkkel: antatt transmembran region I

(B) beliggenhet: 350 til 370

(C) identifikasjonsmetode: lik andre G-protein-koblede reseptor

15 transmembranregioner, hydrofobisk, omtrent 20-23 aminosyrer i lengde

Trekk:

(A) navn/nøkkel: antatt transmembranregion II

(B) beliggenhet: 382 til 404

20 (C) identifikasjonsmetode: lik andre G-protein-koblede

reseptortransmembranregioner, hydrofobisk, omtrent 20-23 aminosyrer i lengde

Trekk:

(A) navn/nøkkel: antatt transmembranregion III

25 (B) beliggenhet: 427 til 448

(C) identifikasjonsmetode: lik andre G-protein-koblede

reseptortransmembranregioner, hydrofobisk, omtrent 20-23 aminosyrer i lengde

Trekk:

30 (A) navn/nøkkel: antatt transmembranregion IV

(B) beliggenhet: 469 til 491

(C) identifikasjonsmetode: lik andre G-protein-koblede

reseptortransmembranregioner, hydrofobisk, omtrent 20-23 aminosyrer i lengde

35 Trekk:

(A) navn/nøkkel: antatt transmembranregion V

(B) beliggenhet: 512 til 533

(C) identifikasjonsmetode: lik andre G-protein-koblede
respetortransmembranregioner, hydrofobisk, omtrent 20-23 aminosyrer i lengde

Trekk:

5 (A) navn/nøkkel: antatt transmembranregion VI

(B) beliggenhet: 557 til 580

(C) identifikasjonsmetode: lik andre G-protein-koblede
respetortransmembranregioner, hydrofobisk, omtrent 20-23 aminosyrer i lengde

10 Trekk:

(A) navn/nøkkel: antatt transmembranregion VII

(B) beliggenhet: 592 til 613

(C) identifikasjonsmetode: lik andre G-protein-koblede
respetortransmembranregioner, hydrofobisk, omtrent 20-23 aminosyrer i lengde

15

Trekk:

(A) navn/nøkkel: antatt karboksy-terminal intracellulær domene

(B) beliggenhet: 614 til 678

Sekvensbeskrivelse: SEQ ID NO: 2:

```

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

Gly Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg Val Phe Leu Cys
   1          5          10          15

Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp Leu Pro Arg Asn Ala
    20                25                30

Ile Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val Ile Gln Lys Gly
    35                40                45

Ala Phe Ser Gly Phe Gly Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ile Ser Gln Asn
    50                55                60

Asp Val Leu Glu Val Ile Glu Ala Asp Val Phe Ser Asn Leu Pro Lys
    65                70                75

Leu His Glu Ile Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asn Leu Leu Tyr Ile Asn
   80                85                90                95

Pro Glu Ala Phe Gln Asn Leu Pro Asn Leu Gln Tyr Leu Leu Ile Ser
    100                105                110

Asn Thr Gly Ile Lys His Leu Pro Asp Val His Lys Ile His Ser Leu
    115                120                125

Gln Lys Val Leu Leu Asp Ile Gln Asp Asn Ile Asn Ile His Thr Ile
    130                135                140

Glu Arg Asn Ser Phe Val Gly Leu Ser Phe Glu Ser Val Ile Leu Trp
    145                150                155

Leu Asn Lys Asn Gly Ile Gln Glu Ile His Asn Cys Ala Phe Asn Gly
   160                165                170                175

Thr Gln Leu Asp Glu Leu Asn Leu Ser Asp Asn Asn Asn Leu Glu Glu
    180                185                190

Leu Pro Asn Asp Val Phe His Gly Ala Ser Gly Pro Val Ile Leu Asp
    195                200                205

Ile Ser Arg Thr Arg Ile His Ser Leu Pro Ser Tyr Gly Leu Glu Asn
    210                215                220

Leu Lys Lys Leu Arg Ala Arg Ser Thr Tyr Asn Leu Lys Lys Leu Pro
    225                230                235

Thr Leu Glu Lys Leu Val Ala Leu Met Glu Ala Ser Leu Thr Tyr Pro
   240                245                250                255

Ser His Cys Cys Ala Phe Ala Asn Trp Arg Arg Gln Ile Ser Glu Leu
    260                265                270

```

His Pro Ile Cys Asn Lys Ser Ile Leu Arg Gln Glu Val Asp Tyr Met
 275 280 285.
 Thr Gln Thr Arg Gly Gln Arg Ser Ser Leu Ala Glu Asp Asn Glu Ser
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Arg Gly Phe Asp Met Thr Tyr Thr Glu Phe Asp Tyr Asp
 305 310 315
 Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro Lys Pro Asp Ala
 320 325 330 335
 Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile Leu Arg Val Leu
 340 345 350
 Ile Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn Ile Ile Val Leu
 355 360 365
 Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val Pro Arg Phe Leu
 370 375 380
 Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly Ile Tyr Leu Leu
 385 390 395
 Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln Tyr His Asn Tyr
 400 405 410 415
 Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala Ala Gly Phe Phe
 420 425 430
 Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu Thr Ala Ile Thr
 435 440 445
 Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln Leu Asp Cys Lys
 450 455 460
 Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met Gly Trp Ile Phe
 465 470 475
 Ala Phe Ala Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile Ser Ser Tyr Met
 480 485 490 495
 Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser Pro Leu Ser Gln
 500 505 510
 Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu Ala Phe Val Val
 515 520 525
 Ile Cys Gly Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val Arg Asn Pro Asn
 530 535 540
 Ile Val Ser Ser Ser Ser Asp Thr Arg Ile Ala Lys Arg Met Ala Met
 545 550 555
 Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile Ser Phe Phe Ala
 560 565 570 575

Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val Ser Lys Ala Lys
 580 585 590

Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe
 595 600 605

Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp Phe Phe Ile Leu
 610 615 620

Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln Ile Tyr Arg Thr
 625 630 635

Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg Asn Gly His Cys
 640 645 650 655

Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr Ile Leu Val Pro
 660 665 670

Leu Ser His Leu Ala Gln Asn
 675

Patentkrav

1.

Rent polypeptid som er i stand til å gjenkjenne og selektivt binde humant

- 5 follikkelstimulerende hormon (FSH), og som ikke frembringer en immunologisk respons i mennesker, k a r a k t e r i s e r t v e d at det består av:

(a) den humane FSH-reseptoren med aminosyresekvensen 1-678 vist i SEQ ID NO: 2;

(b) en mutant som bibeholder minst 95% identitet med sekvensen ifølge (a);

- 10 (c) et polypeptid som inkluderer den aminoterminalle ekstracellulære del av den humane FSH-reseptoren, inkludert aminosyresekvensen 1-349 vist i SEQ ID NO: 2;

(d) et polypeptid som inkluderer en mutant som bibeholder minst 95% identitet med aminosyresekvensen 1-349 vist i SEQ ID NO: 2;

- 15 (e) et polypeptid som inkluderer et fragment av den ekstracellulære del av den humane FSH-reseptoren ifølge (a) der fragmentet bibeholder de FSH-bindende egenskaper til den fullstendige ekstracellulære delen; eller

- (f) et polypeptid som inkluderer en mutant av fragmentet ifølge (e), der mutanten bibeholder minst 95% identitet med fragmentet og som bibeholder de samme
20 FSH-bindende egenskaper som den fullstendige ekstracellulære delen av den humane FSH-reseptoren der den fullstendige ekstracellulære delen inkluderer aminosyresekvensen 1-349 vist i SEQ ID NO: 2.

2.

- 25 Polypeptid som er i stand til å binde humant FSH ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det består av aminosyresekvensen 1-678 vist i SEQ ID NO: 2 eller en mutant som bibeholder minst 95% identitet med denne sekvens.

3.

- 30 Polypeptid som er i stand til å binde humant FSH ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det består av aminosyresekvensen 1-613 vist i SEQ ID NO: 2 eller en mutant som bibeholder minst 95% identitet med denne sekvens.

4.

- 35 Polypeptid som er i stand til å binde humant FSH, ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den består av aminosyresekvensen 1-349 vist i SEQ ID NO: 2 eller en mutant som bibeholder minst 95% identitet med denne sekvens.

5.

Mutant form av polypeptidet ifølge krav 1 (a), (c) eller (e), k a r a k t e r i s e r t v e d at delen som korresponderer til hele eller deler av den naturlige humane FSH-reseptoren inkluderer konservative substitusjoner i en til ti aminosyrerester der plasseringen og egenskapene til nevnte substitusjoner utvelges slik at de samme FSH-bindende egenskaper til reseptoren eller fragmentet av denne beholdes umodifisert.

6.

Isolert DNA, k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for et polypeptid ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5.

7.

Isolert DNA ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter nukleotidsekvensen vist i SEQ ID NO: 1.

8.

Rekombinant ekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter DNA ifølge krav 6 eller 7.

9.

Celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transfektert med ekspresjonsvektoren ifølge krav 8.

10.

Celle ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er en pattedyrceelle.

11.

Fremgangsmåte for å fremstille et polypeptid ifølge kravene 1-6, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter dyrking av cellen ifølge kravene 9 eller 10 i et næringsmedium og gjenvinning av reseptoren fra dette.

12.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et polypeptid ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

13.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 12, for anvendelse som et endogent FSH-

bioaktivitetsreducerende middel hos en pasient.

14.

5 Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 12, for anvendelse som et forebyggende middel mot follikkelvekst og modning hos kvinnelige pasienter.

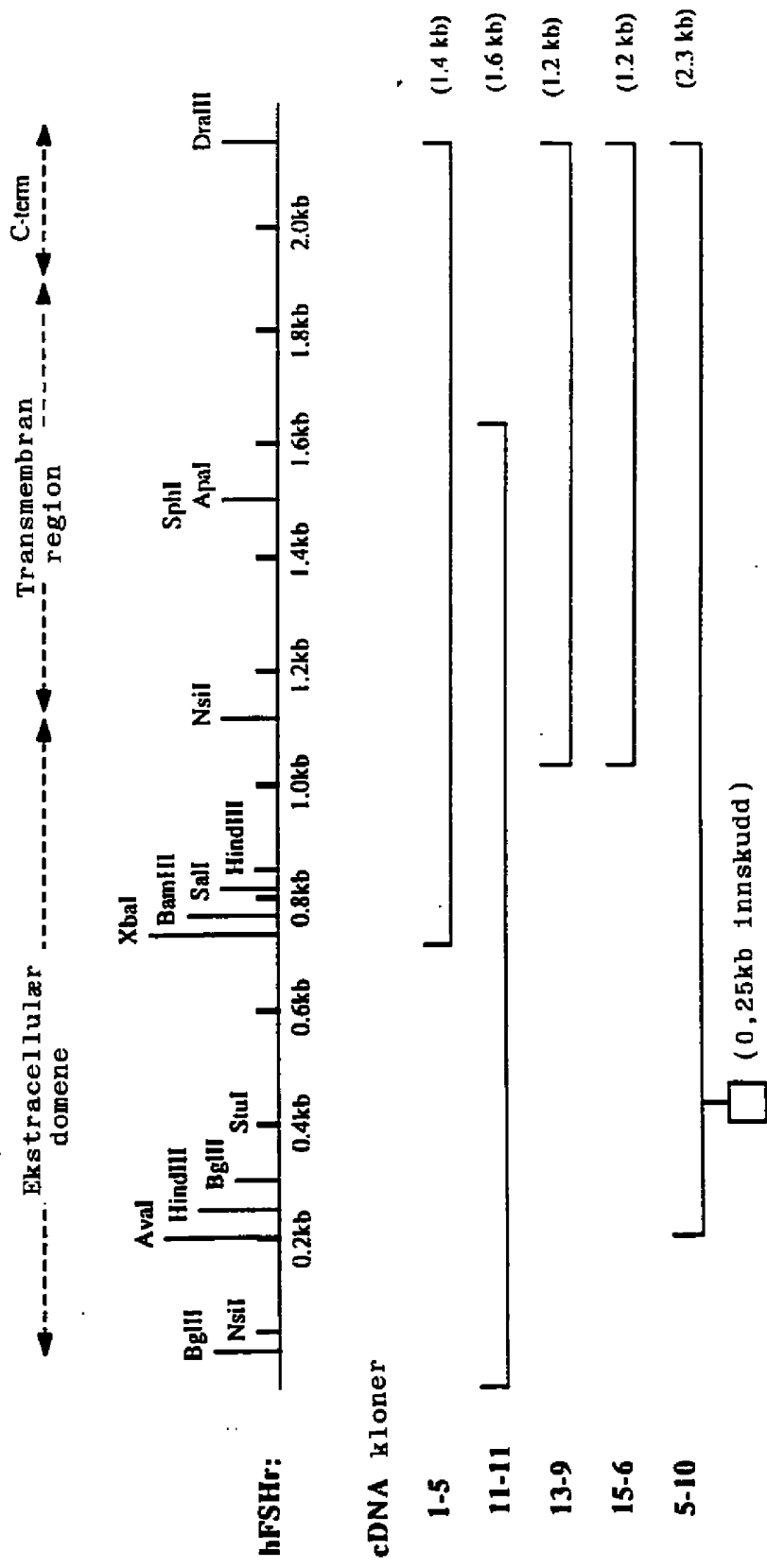
15.

10 Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 12, for anvendelse som et spermatogeneseforebyggende middel hos en mannlig pasient.

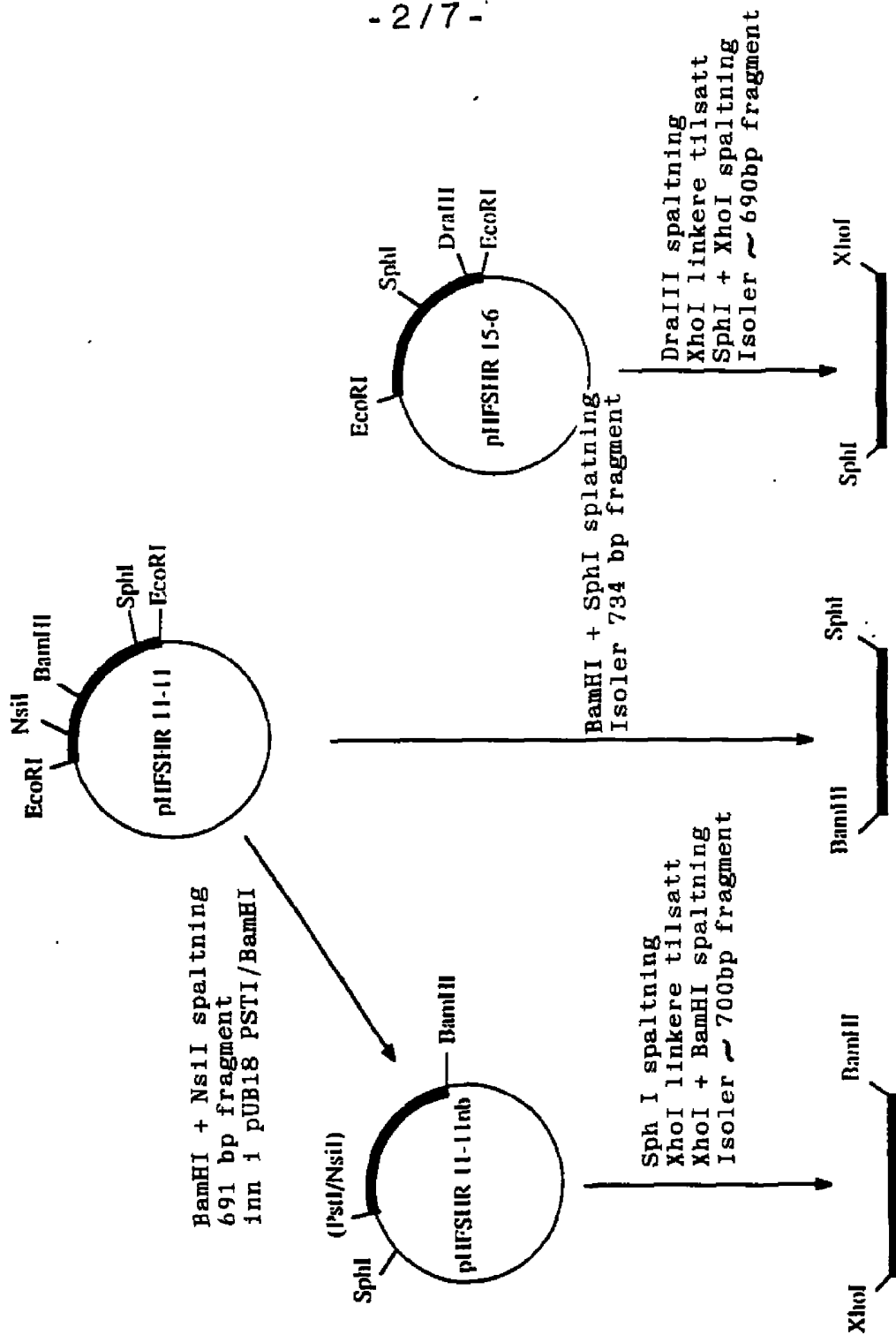
16.

15 Fremgangsmåte for å analysere humant FSH *ex vivo* ved anvendelse av en FSH-reseptor, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes et polypeptid ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5 som FSH-reseptor.

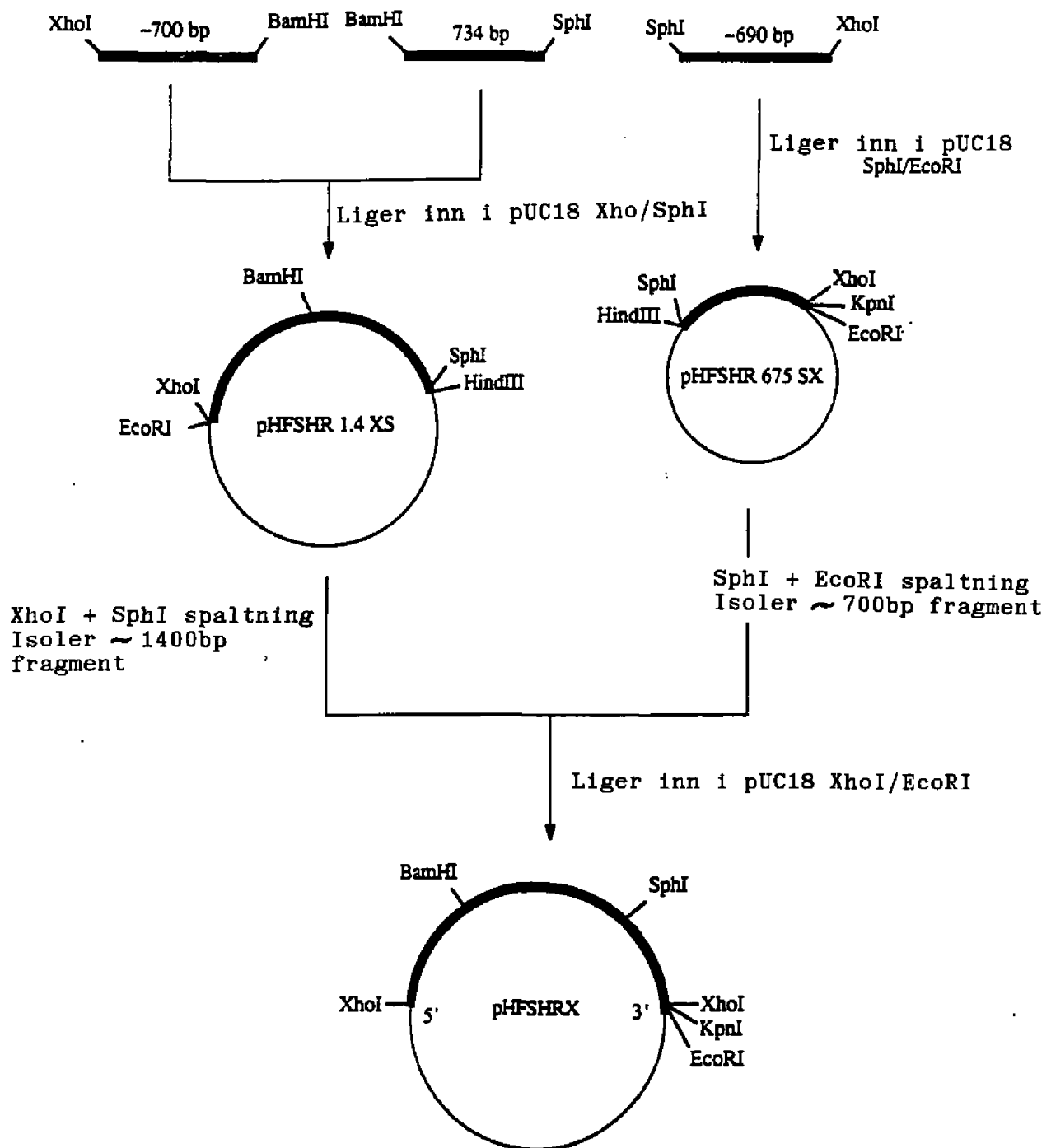
Figur 1



Figur 2A



Figur 2B



Figur 3

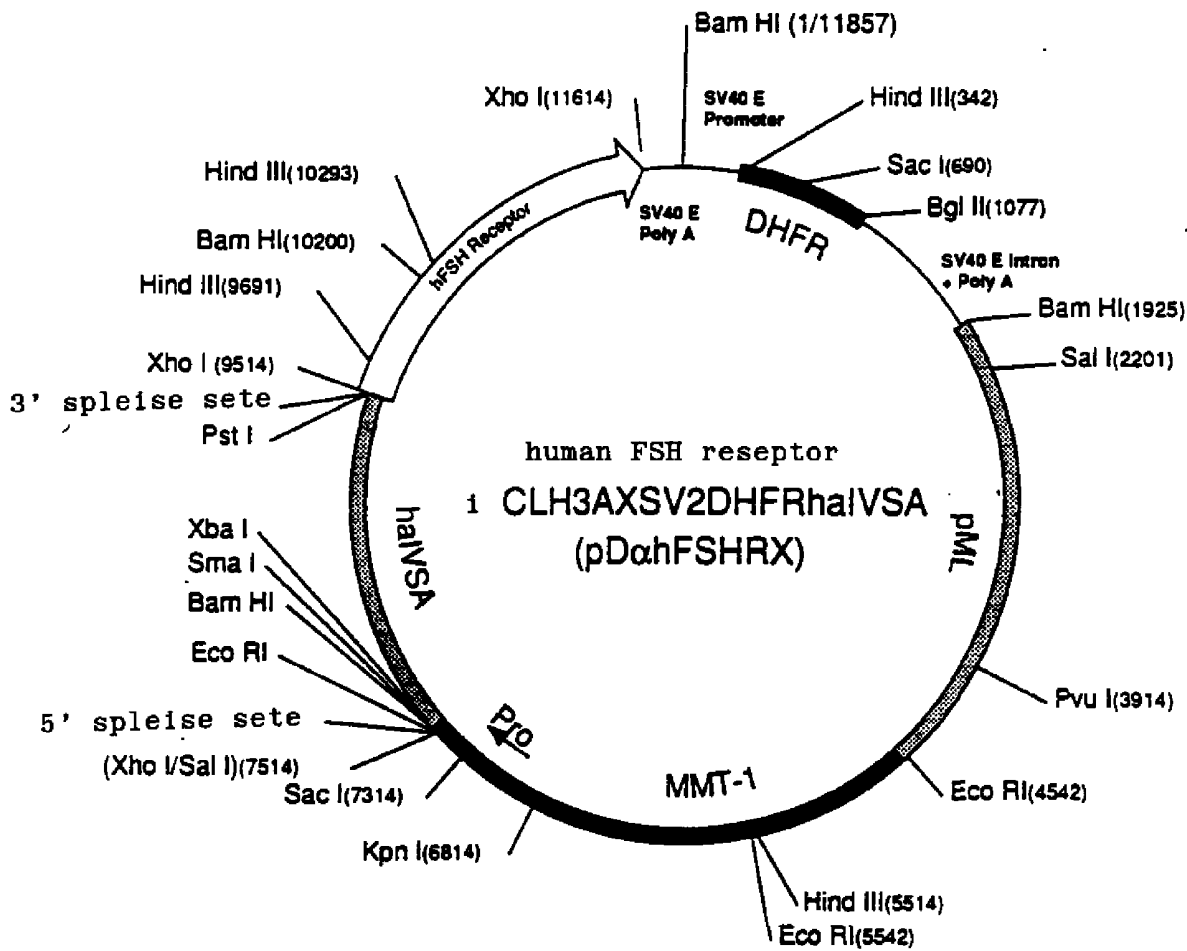
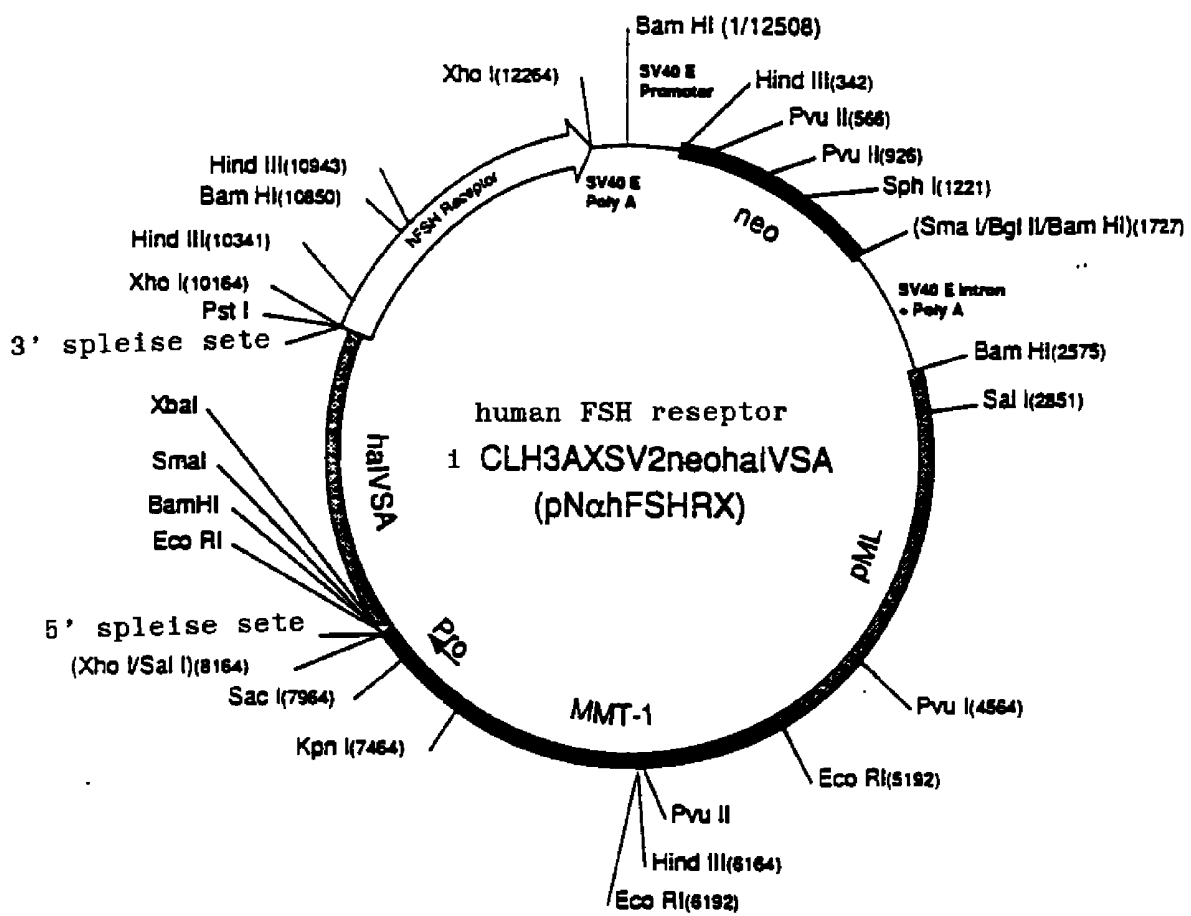
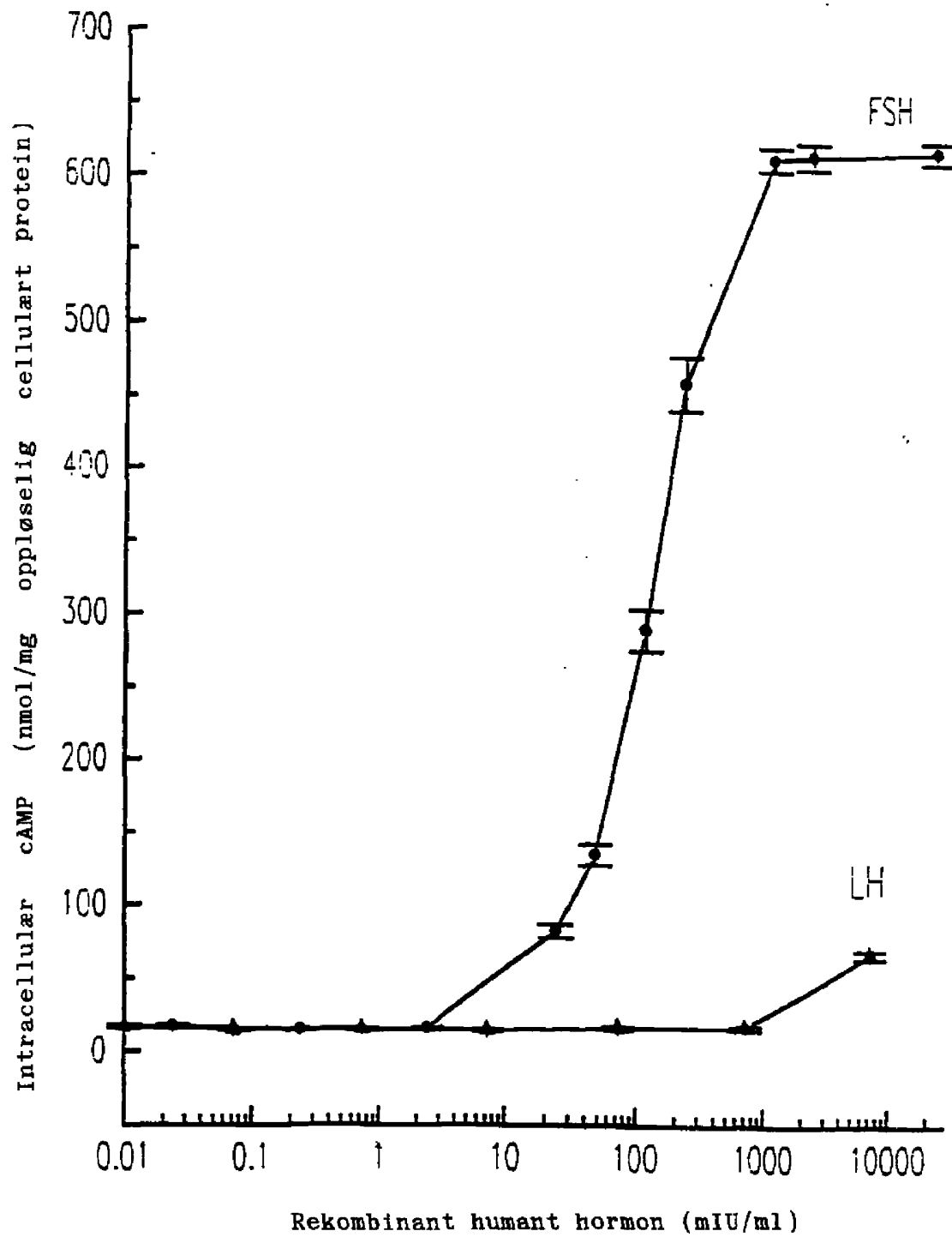


Figure 4



- 6 / 7 -

Figur 5



- 7 / 7 -

Figur 6

