(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 260 T2** 2007.08.09

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 751 782 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 260.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/02067**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 911 043.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/022340**
(86) PCT-Anmeldetag: **17.02.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **24.08.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.01.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **11.10.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.08.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 38/00*** (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C07K 4/12 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
C07K 14/59 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
199382 **18.02.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Applied Research Systems ARS Holding N.V., Curacao, AN

(72) Erfinder:
MOYLE, William R., Piscataway, NJ 08854, US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **Verwendung eines nicht-neutralisierenden Antikörpers spezifisch für die beta-Untereinheit von luteinisierendem Hormon zur Erhöhung der Fertilität**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines nichtneutralisierenden Antikörpers, der die β-Untereinheit des luteinisierenden Hormons bindet und die Aktivität von Glycoprotein-Hormonen auf den luteinisierenden Hormon-Rezeptor reduziert aber nicht ausschaltet, selbst bei einer Konzentration, die alles vorhandene Glycoprotein-Hormon bindet, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Stimulierung der Fertilität in weiblichen Säugern durch Stimulierung der Produktion des follikelstimulierenden Hormons.

[0002] Die Publikationen, auf die hierin Bezug genommen wird, um den Hintergrund der Erfindung zu veranschaulichen und um zusätzliche Details ihrer Anwendung zur Verfügung zu stellen, werden der Einfachheit halber im nachfolgenden Text in numerischer Reihenfolge angegeben und sind in der angefügten Bibliographie entsprechend angeordnet.

[0003] Die Glycoprotein-Hormon-Familie (1) besteht aus drei α,β-heterodimeren Glycoproteinen, die in der vorderen Hypophyse gefunden werden, wo sie hergestellt werden. Zu den Glycoprotein-Hormonen gehören das luteinisierende Hormon (auch als Lutropin oder LH bekannt), das Follikel-stimulierende Hormon (Follitropin oder FSH) und das Thyroid-stimulierende Hormon (auch als Thyrotropin oder TSH bekannt). Die Hormone von Menschen sind als hLH, hFSH beziehungsweise hTSH bekannt. In einigen Arten wird ein Glycoprotein-Hormon, das in der Struktur dem LH ähnelt und das Choriogonadotropin oder CG genannt wird, von der Plazenta gebildet und in den Blutkreislauf abgegeben. Beim Menschen wird dieses Glycoprotein-Hormon hCG genannt. Bei Primaten werden deutliche Mengen von jedem dieser Hormone ebenfalls als Ausscheidungsprodukte im Urin gefunden. Nach der Menopause, wenn die LH- und FSH-Sekretion von der vorderen Hypophyse stark erhöht ist, werden deutliche Mengen von LH und FSH im Urin gefunden. Gonadotropin-Extrakte aus dem Urin von Frauen in der Menopause werden menschliches Menopause-Gonadotropin (hMG) genannt. Im Unterschied zu hCG, das wie LH mit LH-Rezeptoren interagiert, aber nur schwach mit FSH-Rezeptoren, interagiert hMG sowohl mit LH- als auch mit FSH-Rezeptoren. Die zweifache Aktivität von hMG ist auf die Anwesenheit von hLH, hFSH und ihrer Metaboliten im Urinextrakt zurückzuführen. Der Urin von schwangeren Frauen und Frauen in der Menopause ist die Hauptquelle von Gonadotropin-Aktivitäten und hat große kommerzielle Bedeutung.

[0004] Gonadotropine wie FSH, LH und, bei einigen Arten, CG spielen eine Hauptrolle im reproduktiven Prozess (1-6), während das strukturell verwandte Hormon TSH für die Schilddrüsenfunktion wichtig ist (1). Sowohl LH als auch FSH sind essentiell für die Pubertät und für die normale reproduktive Funktion. Das Fehlen einer ausreichenden Menge an FSH, LH oder hCG zu geeigneten Zeitpunkten führt zur Unfruchtbarkeit oder zur Beendigung einer Schwangerschaft. Überschüssige Mengen dieser Hormone können zu einer frühzeitigen Pubertät oder zur Hyperstimulation der Gonaden führen. Beim Mann ist FSH essentiell für den Beginn und die Aufrechterhaltung der Spermatogenese (7, 8). Die Immunneutralisierung von FSH führt zu einer Verminderung der Spermatogenese und zu einer Abnahme der Fruchtbarkeit. Bei der Frau ist FSH essentiell für die Follikelentwicklung, die zur Herstellung der weiblichen Gamete bei der Ovulation führt. Das polyzystische Ovarsyndrom ist eine häufige Ursache für Unfruchtbarkeit bei Frauen und ist ein Zustand, der durch eine unvollständige follikuläre Entwicklung gekennzeichnet ist. Die Fruchtbarkeit kann im Allgemeinen durch die Verabreichung von FSH oder hMG wiederhergestellt werden. Die Fruchtbarkeit kann ebenfalls häufig durch Behandlung mit Antiöstrogenen, Verbindungen, welche die negative Feedback-Wirkung von Östrogenen auf die FSH-Sekretion hemmen, wodurch der FSH-Spiegel steigen kann, wiederhergestellt werden. Bei Männern wird LH für die Pubertät benötigt und bei seinem Fehlen werden die sexuellen Attribute und die Fruchtbarkeit eines Erwachsenen nicht erworben. LH ist hauptsächlich für die Synthese von Androgenen im Hoden verantwortlich. Diese Steroide besitzen einen vorteilhaften Einfluss auf die Spermatogenese und abnorm hohe Mengen von Androgenen können die Spermatogenese aufrechterhalten, wenn sie einmal initiiert wurde (9). Bei Frauen ist LH essentiell für die Ovulation und die Bildung des Corpus luteum. LH besitzt ebenfalls einen synergistischen Einfluss mit FSH auf die Follikelentwicklung (4) und ist dafür bekannt, die Synthese von follikulären Androgenen zu fördern. Diese Androgene dienen als Vorläufer für die Bildung von FSH-stimuliertem Östrogen. LH kann ebenfalls die Wirkung von FSH auf Granulosa-Zellen verstärken, besonders in den späteren Stadien der Follikelreifung, wenn die Granulosa-Zellen LH-Rezeptoren erworben haben. Das hCG, das von dem Trophoblasten hergestellt wird, ist für die Aufrechterhaltung der Progesteron-Sekretion vom Corpus luteum während des Frühstadiums der Schwangerschaft beim Menschen wichtig. Die klinischen Aktivitäten dieser Hormone und ihre Verwendungen sind umfassend in mehreren Standard-Fachbüchern, einschließlich dem von Yen und Jaffe (2), als Übersichtsartikel dargestellt worden.

[0005] Die Unterschiede in den Wirkungen von FSH und LH und die komplexen endokrinen Interaktionen zwischen den zwei Hormonen führen zu einem synergistischen Effekt bei der follikulären Entwicklung und der

Synthese von Östradiol (4). Beispielsweise ist die normale Bildung von Östrogen im Eierstock auf die Wirkung von LH auf die Androgenbildung und den Einfluss von FSH auf die Umwandlung von Androgenen zu Östradiol zurückzuführen. Östradiol wiederum kann die FSH-Sekretion der Hypophyse unterdrücken. Während des normalen Menstruationszyklus nehmen die FSH-Spiegel ab, während sich das Follikel vergrößert und steigende Mengen von Östradiol absondert. Wenn die Östradiol-Spiegel während der follikulären Phase eine ausreichende Menge erreichen, können sie eine Zunahme der LH-Sekretion der Hypophyse auslösen, was zur Ovulation führt. Das Verhältnis der LH/FSH-Aktivität sowie die absoluten Hormonspiegel im Blut sind wichtig für die reproduktiven Funktionen wie z.B. die Follikelreifung und die Ovulation der geeigneten Anzahl von Oocyten während der Menstruations- und Östruszyklen.

[0006] Während die Sekretion sowohl von LH als auch von FSH durch Steroidhormone gehemmt werden kann, reagiert die FSH-Sekretion im Allgemeinen sensitiver auf eine negative Feedback-Regulation durch Östrogene als die LH-Sekretion. Tatsächlich können bei vielen Arten hohe Östrogenmengen die LH-Sekretion steigern, insbesondere wenn die Progesteronspiegel niedrig sind. Die Verabreichung von Anti-Östrogenen, Verbindungen, welche die normale negative Feedback-Regulierung von Östradiol auf die FSH-Sekretion unterbrechen, führet häufig zu einer erhöhten Freisetzung von FSH und einer gesteigerten Gametenbildung. Weitgehende klinische Verwendung finden Anti-Östrogene, um die Wahrscheinlichkeit einer Ovulation bei Frauen mit einem polyzystischen Ovarsyndrom zu erhöhen. Da der negative Einfluss von Östradiol auf die FSH-Sekretion teilweise für die Anzahl der Follikel, die sich bis zur Ovulation entwickeln, verantwortlich ist, kann die Unterbrechung des normalen negativen Östrogen-FSH-Feedback-Regelkreises dazu führen, dass eine ungeeignete Anzahl von Eizellen ausgeschüttet wird. Ein Mechanismus, der zu einer erhöhten FSH-Sekretion führt, ohne die negative Feedback-Kontrolle der FSH-Sekretion zu eliminieren, wäre wertvoll zur Steigerung der Fruchtbarkeit.

[0007] Gereinigtes FSH kann die Follikelentwicklung bei Frauen stimulieren, insbesondere wenn ebenfalls etwas endogenes LH vorhanden ist. Das Verhältnis von FSH/LH ist zu dem Zeitpunkt des Menstruationszyklus am höchsten, wenn die Follikelentwicklung eingeleitet wird. Jedoch sind beide Hormone für die Fruchtbarkeit essentiell. Die Immunneutralisierung von LH führt zur Unfruchtbarkeit bei Männern und Frauen (10-12). Ebenso wurde gezeigt, dass die Immunneutralisierung von CG, einem Hormon, das über die LH-Rezeptoren wirkt, die Fruchtbarkeit in Primaten blockiert (13-16). Es war zuvor nicht bekannt, dass Antikörper gegen LH die Fruchtbarkeit stimulieren.

[0008] Es wurde gezeigt, dass monoclonale Antikörper gegen hCG (hCG-mAk genannt) in vitro die Bindung von hCG an seinen Rezeptor hemmen (17). In Abhängigkeit von der Lage ihrer Epitope besitzen hCG-mAks unterschiedliche Fähigkeiten, um die Bindung von hCG an die LH-Rezeptoren zu hemmen. B105 und B110 sind Beispiele für monoclonale Antikörper, die Epitope auf hCG und LH erkennen, die exponiert bleiben, wenn die Hormone an die LH-Rezeptoren binden (17). Komplexe der Hormone mit diesen monoclonalen Antikörpern binden an die LH-Rezeptoren, aber mit einer geringeren Affinität als die freien Hormone. Daher hemmen diese Antikörper die Bindung der Hormone an die LH-Rezeptoren. Der höchste Grad der Hemmung, der beobachtet wird, wenn der Antikörper im Überschuss vorliegt, beträgt jedoch weniger als 100% und ist niedriger als der von den Antikörpern, die Komplexe mit den Hormonen erzeugen, die nicht an LH-Rezeptoren binden. Wenn genügend B105 oder B110 vorhanden ist, erhöht sich die Menge des Hormons, die benötigt wird, um eine biologische Antwort zu induzieren. Daher ist auch ein starker Überschuss von einem der Antikörper, der ausreichend ist, um so gut wie alle freien hCG oder LH in einer Analyse zu binden, nicht dazu fähig, eine Reaktion auf eines der Hormone zu verhindern, wenn die Konzentrationen des Hormon-Antikörper-Komplexes einen Schwellenwert übersteigen.

[0009] Wie vorstehend diskutiert wurde, wurde vor mehreren Jahren gezeigt, dass die Immunneutralisierung von LH die Fruchtbarkeit verhindert. Dieses Phänomen erfolgt, weil die Antiseren, die in diesen Studien verwendet wurden, die biologische Aktivität von LH neutralisierten. Wenn jedoch geeignete Antiseren oder Antikörper wie z.B. B105 oder B110 verwendet werden, wird die biologische Aktivität von LH nicht eliminiert. Hingegen wird sie um eine zuvor bestimmte Menge vermindert. Wenn dies geschieht, wird die Androgensynthese vermindert. Da Androgene die Vorläufer von Östrogenen sind, wird die Östrogensynthese ebenfalls vermindert. Die Abnahme von Östradiol besitzt eine größere Wirkung auf die FSH-Sekretion als auf die LH-Sekretion. Die Sekretion von FSH nimmt zu und dies führt zu einer Erhöhung des FSH/LH-Verhältnisses und zu einer erhöhten Follikelbildung. Bei Frauen wird dieses Verhältnis von FSH/LH zu einer erhöhten Follikelbildung führen. Bei Männern führt dieses Verhältnis von FSH/LH zur Erhöhung der Funktion der Sertoli-Zellen und zu erhöhter Spermatogenese.

[0010] Ein auf der Verminderung der LH-Spiegel beruhender Ansatz zur Erhöhung der Fruchtbarkeit wurde

zuvor nicht verwendet. Zum Teil ist dies auf die vielen Berichte zurückzuführen, dass Antikörper gegen LH die Fruchtbarkeit hemmen, und darauf, dass Verfahren zur Herstellung und Selektion von Antikörpern, welche die Aktivität von LH vermindern, aber nicht neutralisieren, zuvor unbekannt waren. Daher würde man nicht erwarten, dass dieser Ansatz zur Erhöhung der Fruchtbarkeit zum Erfolg führt. Wie nachfolgend diskutiert wird, besitzt dieser Ansatz zur Erhöhung der Fruchtbarkeit mehrere Vorteile gegenüber gegenwärtigen Techniken, besonders bei Frauen, die LH und FSH in der Hypophyse bilden und daraus freisetzen. Weil die Verminderung der LH-Spiegel nicht die normalen endokrinen Feedback-Beziehungen zwischen Östradiol und FSH auf die Funktion der Hypophyse unterbricht, ist die Wahrscheinlichkeit, eine Hyperstimulation der Ovarien zu induzieren, viel geringer als bei den existierenden Techniken. Dies bedeutet, dass der Bedarf für eine teure und aufwendige Überwachung des Patienten geringer ist. Zusätzlich wird nur eine oder höchstens einige wenige Behandlungen notwendig sein, um Fruchtbarkeit zu induzieren.

[0011] Ein anderes neues Verfahren zur Steigerung der Fruchtbarkeit besteht darin, einen LH-Antagonisten während der follikulären Phase des Menstruationszyklus einzusetzen. Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass die Oligosaccharidketten auf den Glycoprotein-Hormonen für deren Fähigkeit, eine Signaltransduktion zu induzieren, essentiell sind (1). Die Fähigkeit von Glycoprotein-Hormonen, denen Kohlenhydratreste fehlen, eine biologische Antwort zu erzeugen, ist beeinträchtigt. Diese Analoga können verwendet werden, um die Bindung von LH an seine Rezeptoren zu hemmen. Dies wird die Aktivität des zirkulierenden LH vermindern und dadurch die Fruchtbarkeit verbessern. Man hat nachgewiesen, dass deglycosylierte Gonadotropine kurze biologische Halbwertzeiten besitzen, und es zeigte sich, dass sie für ihren ursprünglichen Verwendungszweck, nämlich die Fruchtbarkeit durch die Verminderung der Synthese des Lutealprogesterons zu hemmen und eine Fehlgeburt auszulösen, nicht geeignet sind. Die Verlagerung der Kohlenhydratreste zu alternierenden Teilen des Hormons, indem Glycosylierungssignale (das heißt, die Aminosäuresequenzen Asparagin-X-Threonin oder Asparagin-X-Serin, wobei X für jede Aminosäure außer Prolin steht) von einer Stelle entfernt und Glycosylierungssignale an anderen Stellen der α- und β-Untereinheiten erzeugt werden, ermöglicht es, Analoga mit einer verminderten Agonistenaktivität zu entwerten, die ausreichend lange Halbwertzeiten besitzen, um nützlich zu sein. Zusätzlich ist es durch die Herstellung von Einzelketten-Gonadotropinen, in denen die α- und β-Untereinheiten kovalent verbunden sind, möglich, die Stabilität der Hormone im Blutkreislauf zu erhöhen. Dies liegt daran, dass die Rezeptor-Bindungsaktivitäten und die Halbwertzeiten der heterodimeren Gonadotropine im Plasma größer sind als bei einer der Untereinheiten. Die kovalente Bindung verhindert die Trennung der zwei im Blutkreislauf befindlichen Untereinheiten.

[0012] Während die Stimulierung der Fruchtbarkeit wichtig ist, um die Fruchtbarkeit bei unfruchtbaren Paaren wiederherzustellen, ist die Hemmung der Fruchtbarkeit häufig als ein Verfahren zur Familienplanung erwünscht. Zusätzlich wäre die Hemmung der Fruchtbarkeit bei der kommerziellen Züchtung von Vieh nützlich, da es den Bedarf an Kastration eliminieren und die Entwicklung der Brunst bei Rindern, die auf der Weide gehalten werden, verhindern würde. Die Hemmung der Fruchtbarkeit bei anderen Tieren einschließlich Hunden und Katzen wäre ebenfalls als Ersatz für Sterilisation und Kastration wünschenswert. Die Hemmung der Fruchtbarkeit bei Pferden ist ebenfalls gegenüber einer Kastration zu bevorzugen, besonders wenn diese rückgängig gemacht werden kann. Wie vorstehend beschrieben wurde, kann die Fruchtbarkeit durch die Verabreichung von neutralisierenden Antikörpern gegen LH oder FSH gehemmt werden. Sie kann ebenfalls durch die Verwendung eines Impfstoffes zur Induktion der Erzeugung dieser Antikörper gehemmt werden. Aufgrund der Wirkung von hCG, die Schwangerschaft aufrechtzuerhalten, würde man von Behandlungen, die dazu führen, dass die Sekretion oder Aktivität von hCG verringert wird, erwarten, dass sie Unfruchtbarkeit hervorrufen. Bei Frauen wäre es wünschenswerter, die Fruchtbarkeit durch Hemmung von hCG statt von hLH oder hFSH zu hemmen. Dies liegt darin begründet, dass Behandlungen, die hLH oder hFSH neutralisieren, einen Stillstand der Eierstockfunktion hervorrufen und den Beginn von Problemen, die mit der Menopause zusammenhängen, beschleunigen würden. Bei Rindern und anderen Haustieren wäre es wichtiger, LH zu hemmen, damit die Pubertät verhindert oder die Hitze zum Erliegen gebracht wird. Wie zuvor beschrieben wurde, können geeignete Antikörper gegen Choriogonadotropin die Fruchtbarkeit bei Primaten und Frauen hemmen, und die Entwicklung von Antikörpern gegen hCG ist schon seit vielen Jahren als ein wichtiges mögliches Verfahren zur Empfängnisverhütung anerkannt (18). Da hCG von einer großen Anzahl von menschlichen Krebsarten hergestellt wird und da Antikörper gegen hCG diese Tumore zerstören können, hätte eine Immunisierung ebenfalls vorteilhafte Auswirkungen auf die Krebstherapie oder die Krebsprävention (19).

[0013] Verschiedene Versuche wurden unternommen, um einen solchen auf hCG basierenden Impfstoff zur Empfängnisverhütung zu entwickeln, wobei die Unterschiede zwischen hCG und den anderen Glycoprotein-Hormonen berücksichtigt wurden (14, 18). Leider wurde die Entwicklung des Impfstoffs durch die strukturellen Homologien zwischen allen Glycoprotein-Hormonen behindert. Das bevorzugte Immunogen muss hoch antigen sein, darf aber nicht Antikörper erzeugen, die mit den anderen Glycoproteinen wie z.B. menschliches

FSH, LH oder TSH kreuzreagieren. Aufgrund der Kenntnis der vorstehend skizzierten Wirkungen von Glycoprotein-Hormonen ist davon auszugehen, dass ein Impfstoff, der Antikörper induziert, die mit LH, FSH oder TSH interagieren, ebenfalls Unfruchtbarkeit und/oder die Hemmung der Schilddrüsenfunktion verursacht. Leider würde die Neutralisierung von LH oder FSH ebenfalls zur Einstellung normaler Menstruationszyklen und zum Ausfall der Östrogen-Herstellung führen, die bei Frauen mit Fruchtbarkeit verbunden ist. Der Ausfall der Eierstockfunktion würde sehr wahrscheinlich zu frühzeitiger Entwicklung von Osteoporose und anderen mit der Menopause verbundenen Problemen führen. Die Hemmung der Schilddrüsenfunktion würde zu einer Schilddrüsenunterfunktion führen. Die Ähnlichkeiten in den Strukturen von hCG und hLH haben es besonders schwierig gemacht, ein geeignetes Immunogen zu entwerfen, das keine kreuzreagierenden Antikörper erzeugt. Die meisten Anstrengungen wurden der Herstellung von Antikörpern gegen den einzigartigen C-Terminus der hCG-β-Untereinheit gewidmet, da dieser Teil des Moleküls nicht in hLH gefunden wird (1). Diese Region zeigt jedoch keine große antigene Wirkung. Bei dem Versuch Immunogene zu entwickeln, wurden ebenfalls von der β-Untereinheit stammende Peptide (14), Konjugate der β-Untereinheit mit anderen Proteinen (20) oder Konjugate von β-Untereinheiten von hCG enthaltende Heterodimere sowie α-Untereinheiten von Schafen (18) verwendet. Leider sind die meisten dieser Immunogene nicht sehr wirksam und ein besseres Immunogen wird benötigt, um dieses Verfahren praktikabel zu machen.

[0014] Die Schwierigkeiten, einen Impfstoff, der auf hCG basiert, zu entwickeln, können durch Verständnis der Strukturen der Glycoprotein-Hormone verstanden werden. Jedes der Glycoprotein-Hormone enthält eine gemeinsame α-Untereinheit. Während die Konformation von Teilen der α-Untereinheit sich in allen Hormonen unterscheidet und durch ausgewählte monoclonale Antikörper erkannt wird (21), besitzen Teile der α-Untereinheit die gleiche Konformation in jedem Glycoprotein-Hormon. Daher erkennen viele Antikörper gegen die α-Untereinheit LH, FSH, hCG und TSH. Da Antikörper gegen die α-Untereinheit häufig die Aktivitäten der Hormone blockieren können (22), besitzt ein Immunogen, das eine Antwort auf die α-Untereinheit induziert, sehr wahrscheinlich unerwünschte Nebenwirkungen. Daher sind die meisten Strategien zur Entwicklung eines Impfstoffs zur Empfängnisverhütung auf die für das Hormon spezifische β-Untereinheit von hCG gerichtet.

[0015] Die β-Untereinheit von hCG ist am engsten mit der β-Untereinheit von hLH verwandt. Viele Antikörper, die gegen die intakte β-Untereinheit von hCG gerichtet sind, werden ebenfalls die β-Untereinheit von LH binden. Während die β-Untereinheiten der anderen Hormone sich deutlich von der von hCG unterscheiden, sind einige der Reste in allen β-Untereinheiten identisch und es besteht die Möglichkeit, wenn auch nur im geringen Maße, dass einige Antikörper gegen die β-Untereinheit auch mit diesen Hormonen kreuzreagieren. Die 31 Aminosäuren am Carboxy-Terminus der β-Untereinheit von hCG (CTP) sind nicht mit einem der Reste in den anderen Glycoprotein-Hormonen verwandt. Theoretisch können Antikörper gegen diese Region keine Kreuzreaktion mit den anderen Hormonen hervorrufen. Erwartungsgemäß werden Antikörper entwickelt, die nicht mit den anderen Glycoprotein-Hormonen kreuzreagieren, wenn diese Region als ein Immunogen verwendet wird. Leider binden die Antikörper, die gegen synthetische CTP-Peptide hergestellt werden, nicht mit einer hohen Affinität an hCG. Teilweise ist dies auf die Beobachtung zurückzuführen, dass diese Region von hCG vier mögliche Seringebundene Glycosylierungsstellen enthält und stark glycosyliert ist. Des weiteren ist ein großer Bereich dieser Region von hCG für die Interaktion mit den LH-Rezeptoren nicht essentiell. Daher binden die Antikörper, die gegen das CTP von hCG gerichtet sind, an hCG-Rezeptor-Komplexe und sind in erster Linie von nichtneutralisierender Art. Dementsprechend hemmen sie nicht die Wirkung von hCG, ähnlich wie Antikörper wie z.B. B101 (22), welche die Bindung von hCG an die LH-Rezeptoren hemmen.

[0016] Es wurden ebenfalls Anstrengungen unternommen, Antikörper gegen andere Teile der β-Untereinheit von hCG zu entwickeln. Eine Region, die weitgehend untersucht wurde, ist die, die sich zwischen den Cysteinresten 38 und 57 befindet. Von diesem Teil des Proteins ist bekannt, dass er eine große Schleife bildet, und Studien haben gezeigt, dass diese Schleife Steroidbiosynthese stimulieren kann (23, 24). Daher konnte man erwarten, dass Antikörper gegen diese Schleife von neutralisierender Art sein würden. Tatsächlich kann B101, ein Antikörper, von dem gezeigt wurde, dass er Reste innerhalb dieser Schleife erkennt (22, 25, 26), die Aktivität von hCG neutralisieren. Das Problem bei der Verwendung dieser Schleifenstruktur ist, dass die Antikörper, die hergestellt werden, häufig eine niedrige Affinität aufweisen. Außerdem, da hCG und hLH in dieser Region des Moleküls ähnlich sind (das heißt, nur drei der Aminosäuren sind unterschiedlich), wird erwartet, dass die Immunisierung mit dieser Schleife die Herstellung von Antikörpern gegen hLH hervorruft. Tatsächlich besitzt B101, ein Antikörper, der an diese Region des Moleküls bindet, eine unzumutbar hohe Affinität für hLH.

[0017] Neueste Bemühungen zur Identifizierung der Tertiärstruktur der Glycoprotein-Hormone beruhen auf der Charakterisierung der Bindungsstellen von Reihen von monoclonalen Antikörpern (26). Es wurden Antikörper identifiziert, welche die biologische Aktivität von hCG verhindern oder seine biologische Aktivität nur teilweise neutralisieren. Wie in Beispiel 7 der vorliegenden Beschreibung dargestellt wird, können diese und ähn-

liche Antikörper verwendet werden, um Immunogene zu entwickeln, die das Potential besitzen, hCG nicht aber hLH zu neutralisieren, wobei das Verfahren zur positiven und negativen Selektion verwendet wird, das in den nachfolgenden Beispielen 6 und 7 skizziert wird. Obwohl das Hormon kristallisiert wurde und eine Kristallstruktur für die Bestimmung von Immunogenarten, die einen hohen Spiegel der Immunantwort auf bestimmte Teile des Moleküls geben würden, wertvoll wäre, haben Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Kristallstruktur diesen Ansatz ausgeschlossen. Bei dem derzeitigen Wissensstand zur hCG-Struktur gibt es daher kein gutes Verfahren, das verwendet werde könnte, um vorherzusagen, welche Art Immunogen am wirksamsten wäre.

[0018] Ein anderes nützliches Verfahren zur Steigerung der Fruchtbarkeit besteht darin, die Spiegel der FSH-Aktivität zu erhöhen. Ein Weg, dies zu erreichen, besteht darin, kleine Dosen von über einen langen Zeitraum wirkenden Follitropinen zu verabreichen. Dies kann durch die Bindung von Molekülen mit einer Follitropinaktivität an Moleküle mit langen Halbwertzeiten im Plasma (das heißt Immunglobuline) oder durch die Herstellung von Einzelketten-Gonadotropin-Analoga, die Follitropinaktivität besitzen (Tabelle 1 und 2), erreicht werden. Einzeln oder in Kombination mit Antikörpern gegen LH und/oder LH-Antagonisten erleichtern diese Hormone die Follikelentwicklung bei Frauen mit einem polyzystischen Ovarsyndrom.

[0019] Die passive Immunisierung gegen LH hat das Potential, eine Superovulation bei Haustierarten zu induzieren, jedoch blockiert bei höheren Antikörper-Konzentrationen sowohl die passive als auch die aktive Immunisierung gegen LH den Eisprung (66).

[0020] Fig. 1 ist ein Graph, der den Einfluss von Antikörpern und Antiseren auf die Bindung des radioaktiv markierten hLH an die LH-Rezeptoren darstellt.

[0021] Fig. 2 ist ein Graph, der den Einfluss von Antikörpern und Antiseren auf die Fähigkeit von hLH, Steroidbiosynthese in vitro zu induzieren, darstellt.

[0022] Fig. 3 ist ein Graph, der den Einfluss von Antikörpern und Antiseren auf die Fähigkeit von hLH, Steroidbiosynthese in vivo zu induzieren, darstellt.

[0023] Fig. 4 zeigt Vektoren, die in Strategien zur Matrize/Ausschlussselektion verwendet werden können.

[0024] Fig. 5 zeigt Arten von Immunogenen, die eine erhöhte Antigenizität zur Verwendung bei der aktiven Immunisierung gegen LH, hCG oder FSH besitzen.

[0025] Fig. 6 stellt die codierende Sequenz für das Analogon #1 des Einzelketten-Gonadotropins und die Primer (unterstrichen) dar.

[0026] Fig. 7 stellt die codierende Sequenz für das Analogon #2 des Einzelketten-Gonadotropins und die Primer (unterstrichen) dar.

[0027] Fig. 8 stellt die codierende Sequenz für das Analogon #3 des Einzelketten-Gonadotropins und die Primer (unterstrichen) dar.

[0028] Fig. 9 stellt die Herstellung der codierenden Region einer alpha-Untereinheit dar, der die Oligosaccharid-Signalsequenzen fehlen.

[0029] Fig. 10 stellt die Herstellung der codierenden Region einer beta-Untereinheit dar, der die asn-gebundenen Oligosaccharid-Signalsequenzen fehlen.

[0030] Fig. 11 stellt die codierende Sequenz für das Analogon #1a des Einzelketten-Gonadotropins dar.

[0031] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines nichtneutralisierenden Antikörpers, der die β-Untereinheit des luteinisierenden Hormons bindet und die Aktivität von Glycoprotein-Hormonen auf den luteinisierenden Hormon-Rezeptor reduziert, aber nicht ausschaltet, selbst bei einer Konzentration, die alles vorhandene Glycoprotein-Hormon bindet, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Stimulierung der Fertilität in weiblichen Säugern durch Stimulierung der Produktion des follikelstimulierenden Hormons.

[0032] Die vorliegenden Anmeldung offenbart die Verwendung nichtneutralisierender Antikörper, die die β-Untereinheit des luteinisierenden Hormons binden, zur Steigerung der Fruchtbarkeit durch Verminderung aber nicht Ausschluss der Aktivitäten von zirkulierenden Glycoprotein-Hormonen, die Lutropin (LH)-Aktivität

besitzen. Da Moleküle mit einer Lutropin-Aktivität für die Fruchtbarkeit essentiell sind, würde man erwarten, dass die Blockierung ihrer Aktivitäten die Fruchtbarkeit eher vermindert als erhöht. Man findet im Allgemeinen aber, dass Lutropine die Herstellung von Steroiden erhöhen, welche die Sekretion von Follitropinen (FSH) vermindern, Hormonen, die eine wichtige Rolle bei der Fruchtbarkeit spielen. Dementsprechend führt die Reduktion der Aktivitäten von Lutropinen zu erhöhten Follitropin-Spiegeln und/oder Follitropin/Lutropin-Verhältnissen. Wenn die LH-Aktivität vermindert, aber nicht vollständig unterdrückt ist, führt der Anstieg der FSH-Aktivität und/oder des Verhältnisses von FSH/LH zu einer verstärkten Herstellung von Gameten und erhöhter Fruchtbarkeit bei Menschen und Tieren. Die vorliegende Anmeldung offenbart ebenfalls neue Verfahren zur Entwicklung und/oder zur Selektion von Antikörpern gegen spezifische Teile von Proteinen einschließlich LH und humanem Choriogonadotropin (hCG), welche es erlauben, deren biologische Aktivitäten auf das gewünschte Maß zu vermindern. Es werden hierin Beispiele vorgestellt, die zeigen, wie Antikörper und Immunogene gegen spezifische Teile von ausgewählten Gonadotropinen entwickelt werden können, einschließlich solcher Antikörper und Immunogene, die in der Struktur sehr ähnlich sind. Die Antikörper und Immunogene werden zur Steigerung der Fruchtbarkeit Verwendung finden.

[0033] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Herstellung von Molekülen, die an LH- und FSH-Rezeptoren binden können und die in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt, an dem sie verabreicht werden, entweder die Fruchtbarkeit erhöhende oder die Fruchtbarkeit hemmende Wirkungen besitzen. Einige von diesen sind Moleküle, die an die LH-Rezeptoren binden und die Wirkung von LH blockieren. Wenn diese in der follikulären Phase verabreicht werden, unterdrücken sie die LH-Aktivität und somit die Sekretion von Androgen und Östrogen. Dementsprechend werden die FSH-Spiegel steigen und die Fruchtbarkeit erhöht. Wenn sie nach dem Eisprung während der Lutealphase des Menstruationszyklus gegeben werden, unterdrücken sie die Aktivität von hCG und führen dazu, dass die Schwangerschaft beendet wird. Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung von Molekülen, die in der Lage sind, die Wirkungen von FSH und sowohl von FSH als auch LH zu hemmen. Diese Moleküle werden für die Behandlung von Frauen nützlich sein, die ein hyperaktives Eierstockgewebe besitzen, häufig als Folge einer Gonadotropin-Therapie. Die Hyperstimulierung der Eierstöcke ist möglicherweise fatal und diese Analoga binden an FSH-Rezeptoren oder sowohl an FSH- als auch an LH-Rezeptoren, um eine weitere Entwicklung der Eierstöcke zu unterdrücken.

[0034] Gemäß der vorliegenden Anmeldung werden Verwendungsmöglichkeiten zur Verfügung gestellt, um die Fruchtbarkeit bei Menschen und Tieren durch das neue Verfahren der Hemmung der Aktivität von Lutropin zu verbessern, wobei eine passive oder eine aktive Immunisierung verwendet wird. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Blockierung der Wirkungen von LH zu einer Hemmung der Fruchtbarkeit führt. Hier wird gezeigt, dass geeignete LH-Antikörper verwendet werden können, um die Fruchtbarkeit wiederherzustellen oder zu stimulieren. Dieser Ansatz sollte das Risiko der Hyperstimulierung vermindern und eine normalere Regulierung der Fruchtbarkeit bei geringerer Überwachung erlauben. Es werden verschiedene Verfahren zur Herstellung und zum Test der Antikörper oder der Antiseren, die zur Förderung der Fruchtbarkeit benötigt werden, zur Verfügung gestellt.

[0035] Andere Verfahren sind erhältlich, um das Verhältnis von FSH/LH zu verändern, einschließlich Verfahren zur Verabreichung von FSH oder von Antiöstrogenen. Das hierin beschriebene Verfahren, das auf die Verwendung von anti-LH basiert, besitzt jedoch wichtige Vorteile gegenüber diesen anderen Verfahren. Der Grad der maximalen Hemmung kann für jeden Antikörper durch einen in vitro Test sorgfältig bestimmt werden. Unabhängig von der Menge des verabreichten Antikörpers kann daher durch geeignete Wahl des Antikörpers verhindert werden, dass die Aktivität von LH unter einem zuvor bestimmten Spiegel inhibiert wird. Zum Beispiel würde B105 die wirksamen hLH-Spiegel um einen Faktor von etwa 4 vermindern, während B110 die wirksamen hLH-Spiegel um einem Faktor von etwa 2 vermindern wird. Durch Verminderung der LH-Spiegel können die FSH-Spiegel steigen. Wenn die FSH-Spiegel steigen, werden sie die Follikelentwicklung und die Herstellung von Östrogenen hervorrufen. Wenn diese Spiegel die physiologischen Konzentrationen, die kennzeichnend für eine geeignete Follikelentwicklung sind, erreicht haben, werden sie die Sekretion von mehr FSH negativ hemmen. Daher behält die hierin beschriebene Behandlung die wertvollen Aspekte der Selbstregulation, die bei den existierenden Verfahren fehlen, die zur Stimulierung der Fruchtbarkeit von der Verabreichung von FSH oder Antiöstrogenen abhängig sind. Des weiteren benötigt das auf Anti-LH basierende Verfahren, im Gegensatz zur Induktion der Ovulation durch GnRH (gonadotropin releasing hormone) oder GnRH-Analoga, nicht die pulsatilen Infusionen eines Hormons oder eines Hormon-Analogons. Diese Behandlung bietet den möglichen Vorteil einer einzelnen oder höchstens einiger weniger Behandlungen über mehrere Tage. Dies ist besonders wichtig bei der Regulierung der Ovulation bei Menschen oder Tieren. Bei Menschen sollte dieses Verfahren am geeignetsten für die Behandlung des polyzystischen Ovarsyndroms sein, das häufig durch unangemessen hohe Spiegel von LH gekennzeichnet ist. Weil die LH-Spiegel vermindert werden, steigen die FSH-Spiegel und es findet eine Follikelentwicklung statt. Wenn die Follikelentwicklung stattfindet, wird jedoch

die Sekretion von zusätzlichem FSH durch die steigenden Östrogenspiegel blockiert. Die Tendenz, die Entwicklung von zu vielen Follikeln zu fördern, mit potentiell gefährlichen Konsequenzen, wird dadurch minimiert.

[0036] Es werden ebenfalls Verfahren zur Herstellung eines spezifischen Immunogens beschrieben, welches auf der Verwendung von Matrizen- und Ausschlussantikörpern basiert. Die Verwendung dieser Antikörper ermöglicht die Entwicklung einer spezifischen Immunantwort auf bestimmte Domänen des Proteins. Dieses Verfahren kann zur Induzierung oder Hemmung der Fruchtbarkeit verwendet werden, wie hierin gezeigt wurde. Da die Antikörper gegen hCG Tumorwachstum hemmen können, sollte dieses Verfahren ebenfalls für die Entwicklung von Impfstoffen, die benötigt werden, um die Entwicklung oder die Progression von hCG-sezernierenden Tumoren zu hemmen, nützlich sein. Dieses Verfahren sollte ebenfalls in jedem System, in dem ein spezifisches Immunogen benötigt wird, verwendet werden können.

[0037] Mit Bezug auf die Struktur der Antikörper ist nichts einzigartig, was sie nützlich für die Induzierung der Fruchtbarkeit macht, mit Ausnahme der Tatsache, dass sie hLH oder anderes LH binden. Daher würde man vermuten, dass Teile der Antikörper, welche die Fähigkeit behalten, LH zu binden, ebenfalls eine ähnliche Aktivität besitzen. Zu diesen gehören Fab-Fragmente, $(Fab')_2$-Fragmente oder Einzelketten-Antikörper. Das Fab-Fragment ist ein Teil eines Antikörpers, der die Antigen-Bindungsstelle enthält und der durch Spaltung mit Papain hergestellt wird. Das $(Fab')_2$-Fragment ist ein Teil eines Antikörpers, der zwei Antigen-Bindungsstellen enthält und der durch Spaltung mit Pepsin hergestellt wird.

[0038] Vorzugsweise wird die Verabreichung der Arzneimittelzusammensetzung zur Erhöhung der Fruchtbarkeit während der follikulären Phase des Säugers durchgeführt und stärker bevorzugt während der follikulären Phase des Menstruationszyklus.

[0039] Das Glycoprotein-Hormon, das gemäß der vorliegenden Erfindung reguliert werden soll, ist ein Reaktionspartner in einer Reaktion zwischen bindenden Gegenstücken. Die bindenden Gegenstücke sind Proteine, die eine spezifische Bindungsaktivität füreinander besitzen. Eines der bindenden Gegenstücke ist ein Mittel, das gebunden werden kann, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Antigen und einem Hapten. Das bevorzugte Mittel, das gebunden werden kann, ist ein Antigen. Das andere bindende Gegenstück ist ein Mittel, das gebunden werden kann, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Antikörper und einem spezifisch bindenden Protein. Das bevorzugte Bindemittel ist ein Antikörper.

[0040] Antigene sind Substanzen, die unter geeigneten Bedingungen die Bildung von Antikörpern induzieren und in nachweisbarer Weise mit den so induzierten Antikörpern spezifisch reagieren können. Antigene können lösliche Substanzen wie z.B. Toxine und fremde Proteine oder partikuläre Substanzen wie z.B. Bakterien oder Gewebezellen sein. Im Allgemeinen sind Antigene Substanzen mit hohem Molekulargewicht wie z.B. einfache oder konjugierte Proteine oder Kohlenhydrate.

[0041] Antikörper sind Immunglobulinmoleküle, die eine spezifische Aminosäuresequenz besitzen, die es erlaubt, nur mit dem Antigen zu interagieren, das seine Synthese im lymphatischen Gewebe induziert, oder mit einem Antigen, das eng mit diesem Antigen verwandt ist. Immunglobuline sind Proteine, die aus zwei leichten Ketten und zwei schweren Ketten aufgebaut sind.

[0042] Die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten nichtneutralisierenden Antikörper können Säugern, z.B. Tieren oder Menschen, in Mengen verabreicht werden, die wirksam sind, um die erwünschte Aktivität zu liefern. Da die Aktivität der Verbindungen und der Grad des gewünschten therapeutischen Effekts variiert, wird der Dosierungsspiegel der verwendeten Verbindung ebenfalls variieren. Die tatsächlich verabreichte Dosis wird ebenfalls durch solche im Allgemeinen anerkannten Faktoren wie z.B. Körpergewicht des Patienten und die individuelle Hypersensitivität des bestimmten Patienten bestimmt werden. Daher kann die Dosierungseinheit für einen bestimmten Patienten (Mann) von einem niedrigen Wert wie etwa 0,1 µg pro kg Körpergewicht ausgehend variieren, welcher durch den praktizierenden Arzt bis zu der gewünschten Wirkung titriert werden kann. Eine bevorzugte minimale Dosis für die Titration ist 1 µg/kg Körpergewicht.

[0043] Die vorliegende Erfindung wird weiter durch die nachfolgenden Beispiele dargestellt, diese sollen jedoch nicht den Schutzbereich der Ansprüche einengen. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich alle Anteile und Prozentangaben in den Beispielen und innerhalb der Beschreibung und der Ansprüche auf das Gewicht der endgültigen Zusammensetzung.

[0044] Obwohl Impfverfahren und Verfahren zur Entwicklung eines Impfstoffs zur Stimulierung der Fruchtbarkeit bei Säugern von der vorliegenden Erfindung nicht umfasst werden, werden Beispiele beibehalten, die sich

auf die Entwicklung von Antigenen beziehen, welche Antikörper gegen LH hervorrufen, sowie Beispiele, die sich auf Analoga beziehen, welche sich als Ausgangsverbindung für ein Impfstoff-Design eignen, da eine solche Offenbarung das Design von Immunogenen veranschaulicht, die für die vorliegende Erfindung geeignete Antikörper induzieren.

[0045] Bindende Agenzien, welche die biologischen Aktivitäten des luteinisierenden Hormons und des menschlichen Choriogonadotropins vermindern, um deren biologische Aktivitäten auf das gewünschte Maße zu reduzieren.

Beispiel 1

Verwendung von Anti-LH-Antikörpern zur Induktion der Fruchtbarkeit

[0046] Weil einige Anti-Hormon-Antikörper die biologische Aktivität der Hormone hemmen, entweder weil sie die Bindung des Hormons an Rezeptoren verhindern oder durch die Erhöhung seines Metabolismus, sind sie nützlich, um den Spiegel der aktiven Hormone im Kreislauf zu vermindern. Antikörper gegen LH können das Verhältnis des biologisch aktiven FSH zu LH im Kreislauf erhöhen. Teilweise liegt dies daran, dass sie die Aktivität von LH vermindern. Da LH ein Hormon ist, das die Synthese von Steroidsubstraten, die in Östrogene umgewandelt werden können (4), stimuliert, wird die Verminderung der LH-Aktivität zusätzlich durch eine Verminderung der Östrogene begleitet. Die Verminderung der Östrogenspiegel führt zu einer Hemmung der Sekretion von FSH und zu einer Erhöhung der FSH-Spiegel. Als eine Konsequenz wird bei der Frau die Follikelentwicklung verstärkt. Beim Mann wird die Spermatogenese gesteigert. Nicht alle Antikörper besitzen die Fähigkeit, die LH-Spiegel in einer nichtneutralisierenden Weise zu reduzieren. Antikörper, welche die Wirkungen von LH vollständig neutralisieren, setzen die Fruchtbarkeit herab, außer sie werden in einer begrenzenden Weise verabreicht (das heißt, die Gesamtmenge des verabreichten Antikörpers ist geringer als die Gesamtmenge des zirkulierenden LH); sie fallen daher nicht in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung. Nichtneutralisierende Antikörper werden für die Erhöhung der Fruchtbarkeit bevorzugt, da sie im Überschuss zu der Gesamtmenge von LH verabreicht werden können. Daher wird, sogar wenn das meiste LH an die Antikörper gebunden werden kann, die LH-Aktivität vermindert, aber nicht neutralisiert. Weil mehr als ausreichend LH zur Follikelentwicklung vorhanden ist, verhindert die teilweise Verminderung der LH-Aktivität nicht die Follikelentwicklung. Zusätzlich werden die gesteigerten Mengen an Östrogenen, die hergestellt werden, wenn der Follikel seine Entwicklung verstärkt, die normale Feedback-Kontrolle der Sekretion von FSH nachahmen, und so eine Hyperstimulierung der Ovarien verhindern. Die Verabreichung von 10 µg-10 mg Antikörper mit hoher Affinität (das heißt, $Ka > 5 \times 10^7\ M^{-1}$) reicht aus, um bei Frauen mit einem polyzystischen Ovarsyndrom Fruchtbarkeit zu induzieren. Die Identifizierung und Charakterisierung von geeigneten Antikörpern wird in Beispiel 2 dargestellt.

Beispiel 2

Identifizierung und Auswahl der besten LH-Antikörper

[0047] Nicht alle Antikörper, welche die LH-Aktivität hemmen, sind gleichermaßen nützlich zur Behandlung von Unfruchtbarkeit. Zum Beispiel können hohe Überschusskonzentrationen von Antikörpern wie B101, die an hCG und LH (wenn auch mit einer geringeren Affinität) binden, die Bindung der Hormone an die LH-Rezeptoren verhindern (22). Wenn sie im Überschuss vorhanden sind, „neutralisieren" die Antikörper, welche die Bindung von LH oder hCG an ihre Rezeptoren verhindern, die biologische Aktivität des Hormons. Während die Neutralisierung von LH von einem Abfallen der Androgen- und Östrogenspiegel und einem Ansteigen der FSH-Spiegel gefolgt würde, würde die Verminderung der LH-Aktivität unter den minimalen Spiegel, der für die Fruchtbarkeit benötigt wird, die Fruchtbarkeit so lange verhindern, wie ein Überschuss des Antikörpers vorhanden wäre, da LH für die Fruchtbarkeit benötigt wird. Tatsächlich wurde gezeigt, dass neutralisierende Antikörper oder Antigene, welche die Herstellung von neutralisierenden Antikörpern hervorrufen, die Fruchtbarkeit in Tieren hemmen (10). Es wäre möglich, begrenzte Mengen neutralisierender Antikörper zu verabreichen, um die Konzentrationen von LH auf einen zuvor bestimmten Spiegel zu vermindern, oder die hemmende Wirkung eines neutralisierenden Antikörpers durch Verabreichung eines anti-idiotypischen Antikörpers umzukehren. Aufgrund der Variationen zwischen Individuen wäre es jedoch schwierig zu bestimmen, wie viel Antikörper nötig sein würde, um die gewünschte Wirkung zu erzielen außer eine fast vollständige Hemmung der LH-Aktiviät wäre erwünscht oder Messungen von FSH und/oder der Gonadenfunktion (z.B. die Bestimmung der Steroidspiegel im Plasma) würden durchgeführt. Obwohl dies möglich wäre, vermindert die Notwendigkeit, solche Messungen durchzuführen, die Attraktivität der Verwendung von Antikörpern, die vollständig die Aktivität von LH neutralisieren, zur Steigerung der Fruchtbarkeit. Neutralisierende Antikörper könnten ebenfalls verabreicht

werden, um die Wirkung von LH so lange zu verhindern, bis die FSH-Spiegel gestiegen sind. Anschließend könnte man den im Überschuss vorliegenden, neutralisierenden Antikörper durch Verabreichen eines anti-idiotypischen Antikörpers zur Neutralisierung von anti-LH-Antikörpern entfernen, und so die Fruchtbarkeit wiederherstellen oder durch Überwinden der Wirkung des Antikörpers durch Verwendung von LH oder CG oder einer Menge des Antikörpers, die ausreichend herabgesetzt wäre, um die Wirkung des LH-Anstiegs in der Mitte des Zyklus zu erlauben. Dieser Ansatz ist jedoch komplexer als die nachfolgend dargestellte Verwendung von nichtneutralisierenden Antikörpern.

[0048] Die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Antikörper hemmen die Aktivität von LH, aber sie können nicht vollständig seine Wirkung blockieren, sogar wenn sie in Konzentrationen verabreicht werden, die ausreichen, um das gesamte LH, das im Kreislauf vorhanden ist, zu binden. Diese Antikörper können im Allgemeinen die freien Hormone sowie die Hormon-Rezeptor-Komplexe binden. Sie hemmen die Wirkung des Hormons durch Herabsetzung der Affinität des Hormons für seinen Rezeptor, Verminderung der Aktivität der gebundenen Hormone und/oder Steigerung der Clearance-Rate des Hormons. Beispiele für solche Antikörper schließen B105 und B110 ein. Diese Antikörper vermindern die biologischen Aktivitäten der Hormone in verschiedenem Ausmaß (17) und können von der Columbia University, New York, NY oder von UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ bezogen werden. Andere kommerziell erhältliche Antikörper schließen 518B7 (erhältlich von Dr. Janet Roser, University of California in Davis, Davis, CA) und ZMCG7 (erhältlich von Pierce Chemical Co., 3747 North Meridian Road, Rockford, IL) ein. Weil Komplexe dieser Antikörper mit hCG die Rezeptoren binden können, ist der Grad der Hemmung begrenzt, auch wenn der Antikörper in einem sehr hohen Überschuss vorliegt. Das Ausmaß der Hemmung kann einfach durch in vitro-Analysen vor ihrer Verwendung in vivo bestimmt werden. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass ein sehr großer Überschuss von B110 die Aktivität von hCG nur um etwa die Hälfte vermindert, während ein sehr hoher Überschuss an B105 die Aktivität von hCG um etwa drei Viertel vermindert. Jeder dieser Antikörper bindet an hLH und man würde erwarten, dass er den gleichen Einfluss auf die LH-Aktivität ausübt.

[0049] Die Identifizierung von geeigneten Antikörpern aus einer Gruppe von monoclonalen Antikörpern, die gegen hLH hergestellt wurden, kann wie folgt erfolgen. Diese Antikörper können durch Standardverfahren (22, 27-32), durch Immunisierung von Mäusen mit hLH, hCG oder LH von anderen Arten, LH- oder hCG-Fragmenten, teilweise oder vollständig deglycosyliertem LH oder hCG oder LH- oder hCG-Analoga, die eine Immunantwort auf die gewünschten Arten von LH hervorrufen können, erhalten werden. Diese Antikörper können ebenfalls durch die Auswahl von künstlich hergestellten Antikörpern erhalten werden (33-36). Diese gleiche Strategie könnte verwendet werden, um Antikörper gegen LH von fast jeder anderen Art zu identifizieren. Sie könnte ebenfalls verwendet werden, um Antiseren zu identifizieren, die ähnliche Eigenschaften besitzen. Diese Antiseren könnten als Antwort auf LH- oder hCG-Analoga hergestellt werden oder sie könnten durch Immunadsorption oder durch Entfernung von unerwünschten Antikörperkomponenten erhalten werden.

[0050] Die Antikörper, welche die gewünschten hemmenden Eigenschaften besitzen, können durch Messen ihrer Fähigkeit, die Bindung von LH an die LH-Rezeptoren zu hemmen, identifiziert werden. Diese Art der Untersuchung kann durch einen Fachmann auf dem Gebiet der Messung der Rezeptorbindung durchgeführt werden und das nachfolgende Beispiel bezieht sich darauf, wie man Antikörper gegen hLH auswählen könnte. Selbstverständlich ist dies ebenfalls anwendbar auf jede Art von LH, für die Antikörper erhältlich sind. Da hLH gut an LH-Rezeptoren von Nagetieren bindet, ist es nicht notwendig, dass menschliche LH-Rezeptoren in der Untersuchung verwendet werden, obwohl menschliche LH-Rezeptoren ebenfalls funktionieren würden. Ein einfacher erster Schritt ist, den Einfluss des Antikörpers auf die Bindung von radioaktiv markiertem hLH an Luteal-LH-Rezeptoren von Ovarien von Ratten zu messen. Das radioaktiv markierte hLH kann durch Inkubation von 10 µg hLH mit 500 µCi $Na^{125}I$ für 30 Sekunden bei 4°C in einem kleinen Glassröhrchen, das mit 1,5 µg Iodo-Gen® (Pierce Chemical Co.) beschichtet wurde, hergestellt werden. Das ^{125}I-hLH und das nicht umgesetzte ^{125}I werden durch Gelfiltration getrennt. Die Rezeptoren können durch die Verabreichung von 50 IE Serum-Gonadotropin von schwangeren Stuten, auch bekannt als PMSG oder Pferde-CG (erhältlich von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), an weibliche Sprague-Dawley-Ratten, die 23-26 Tage alt sind, hergestellt werden. Das PMSG stimuliert die Follikelentwicklung. Nach etwa 56-65 Stunden werden den Tieren 25 IE hCG (ebenfalls erhältlich von Sigma Chemicals Co.) verabreicht, um die Erzeugung der Corpora Lutea hervorzurufen. Die hoch luteinisierenden Ovarien werden eine Woche später entfernt und in einem Puffer, der 40 mM Tris (pH-Wert 7,4) und 5 mM $MgCl_2$ enthält, homogenisiert. Eine rohe Fraktion von nuklearen und Membranproteinen des Homogenats wird durch die Zentrifugation des Homogenats bei 1000 × g für 20 Minuten bei 4°C gewonnen. Diese wird einmal durch Resuspension in dem Tris-$MgCl_2$-Puffer und erneute Sedimentierung bei 1000 × g für 20 Minuten bei 4°C gewaschen. Das endgültige Pellet (welches das „Ovar-Homogenat-Pellet" genannt wird) wird in dem Tris-$MgCl_2$-Puffer resuspendiert, wobei ein Volumen von 2 ml für jeden Eierstock, der zu Beginn der Homogenisierung vorhanden war, verwendet wird. Eine Menge des Ovar-Homogenat-Pellets,

das ungefähr 1/20 eines Eierstocks entspricht (das heißt, etwa 5 mg des Materials in 100 µl Puffer) wird in Reaktionsgefäße, die etwa 1-2 ng mit radioaktivem Iod markiertes hLH (das heißt, etwa 100.000 cpm) und verschiedene Mengen des Antikörpers (das heißt, in einem Bereich von 1 pg bis 10 µg oder mehr) enthalten, gegeben. Nachdem die Reaktionsgefäße für einen ausreichenden Zeitraum inkubiert wurden, um zu ermöglichen, dass das radioaktiv markierte LH an die Rezeptoren binden kann (das heißt, 30-60 min bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur), werden die Rezeptor-gebundenen und die freien, radioaktiv markierten Proteine durch Verdünnung des Reaktionsgemisches auf 2 ml mit einer 0,9% NaCl-Lösung, Zentrifugation des Gemisches und Verwerfen des Überstandes getrennt. Die Menge des radioaktiv markierten hLH, das an die LH-Rezeptoren von Ovarien von Ratten gebunden ist, wird durch Untersuchung des Pellets in einem Gamma-Zähler bestimmt. Man würde vermuten, dass die Arten der Hemmung, die in Fig. 1 gezeigt werden, zu beobachten sind. Einige Antikörper werden die Bindung des radioaktiv markierten hLH in dem gleichen Ausmaß wie ein sehr großer Überschuss an nichtmarkiertem hLH oder hCG vollständig hemmen, während andere die Bindung nicht hemmen werden oder sogar die Bindung verstärken können, wenn sie in einem großen molaren Überschuss relativ zu dem radioaktiv markierten hLH vorhanden sind. Diese beiden Arten von Antikörpern sind weniger wünschenswert als solche Antikörper, welche die Bindung von hLH auf ein mittleres Niveau senken (vergleiche Fig. 1). Die nützlichsten Antikörper werden daher die Bindung des radioaktiv markierten LH nicht in dem gleichen Ausmaß wie ein sehr großer Überschuss an nichtmarkiertem LH hemmen. Antikörper, welche die Bindung des radioaktiv markierten LH in dem gleichen Ausmaß wie ein sehr großer Überschuss an nichtmarkiertem LH hemmen, werden ebenfalls nützlich sein, aber es wird eine größere Sorgfalt notwendig sein, um sicherzustellen, dass der Antikörper, wenn er in vivo verwendet wird, die Aktivität von LH nicht zu stark unterdrückt. Wenn zu viel der LH-Aktivität durch den LH-Anstieg neutralisiert wird, führt dies zu Unfruchtbarkeit.

[0051] Ein anderes nützliches Verfahren, um Antikörper zu identifizieren, welche die gewünschte Fähigkeit besitzen, die LH-Aktivität zu vermindern, besteht darin, einen in-vitro-Test durchzuführen, um zu bestimmen, ob die Antikörper die Wirkung von hLH auf die Biosynthese von Steroiden hemmen. In dieser Untersuchung kann man die Hoden von männlichen Nagetieren verwenden. Ein typisches Beispiel, in dem hLH verwendet wird, ist in Fig. 2 dargestellt. Eine rohe Leydig-Zellsuspension von Ratten wird unter Verwendung von Collagenase hergestellt, wie beschrieben wurde (37), und die Zellen werden mit verschiedenen Mengen von LH und den zu testenden Antikörpern inkubiert. Nach etwa 2-4 Stunden bei 37°C wird der Testosterongehalt in den Reaktionsgefäßen mittels einer Radioimmunanalyse gemessen. Wenn steigende Konzentrationen von hLH mit den Leydig-Zellen inkubiert werden, rufen sie eine verstärkte Produktion von Testosteron hervor und verursachen eine typische Dosis-Reaktions-Kurve, in der hLH-Konzentrationen von 1-10 pM ausreichen, um die Steroidproduktion um etwa 50% des maximalen Spiegels zu erhöhen (vergl. Fig. 2, Kurve A). Die nützlichsten Antikörper werden durch ihre Fähigkeit, die LH-induzierte Steroidbiosynthese zu hemmen, identifiziert. Wenn verschiedene monoclonale Antikörper zu LH gegeben werden, bevor das Hormon zu den Zellen gegeben wird, wird sich herausstellen, dass einige davon die Fähigkeit von LH, die Erzeugung von Testosteron zu stimulieren, vermindern. Die nützlichsten hemmenden Antikörper werden die Dosis-Reaktions-Kurve zu weniger sensitiven Werten verschieben (vergl. Fig. 2, Kurven B und C). Während der Grad der Verschiebung anfänglich von der Konzentration des Antikörpers abhängig ist, verhindert ein sehr hoher Überschuss des Antikörpers (das heißt, mehr als 100fach größer als die maximal verwendete Menge von hLH) die LH-induzierte Bildung von Testosteron nicht. Die am wenigsten nützlichen Antikörper verhindern die Stimulation der Bildung von Testosteron, wenn der Antikörper in einem 100fachen molaren Überschuss vorliegt (vergl. Fig. 2, Kurve D). Diese Art von Untersuchung wird Antikörper nachweisen, welche die LH-Aktivität durch Verminderung seiner Bindung an LH-Rezeptoren hemmen und sie wird ebenfalls Antikörper nachweisen, welche die Aktivität von gebundenem LH hemmen. Beispiele für nützliche Antikörper schließen B105, B110, 518B7 und ZMCG7 ein, wie vorstehend beschrieben wurde. Es wird notwendig sein, diese zu modifizieren, wie nachfolgend beschrieben wird, bevor sie wiederholt in Frauen verwendet werden können.

[0052] Wenn Antikörper oder Antiseren ausgewählt wurden und bestätigt wurde, dass sie die vorstehend beschriebenen und in Fig. 1 und Fig. 2 dargestellten Kriterien erfüllen, sollte ihre Fähigkeit, die Wirkungen von LH in vivo zu hemmen, getestet werden. Ein großer Überschuss des Antikörpers (das heißt 100 µg oder mehr) wurde männlichen Ratten verabreicht. Zwanzig Minuten später wurden einige der Ratten nur mit dem Vehikel behandelt (Kontrolle) und anderen wurde hLH oder LH verabreicht, das in der Struktur dem des Tieres, für das der Antikörper verwendet werden soll, ähnlich oder gleich ist. Eine Stunde später werden die Testosteronspiegel des Plasmas durch einen Radioimmuntest gemessen. Ein typisches Beispiel wird in Fig. 3 dargestellt. Die Antikörper oder Antiseren, die gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich sind, werden die Wirksamkeit von hLH vermindern, nicht aber seine Aktivität verhindern, sogar wenn sie im Überschuss zu der Gesamtmenge des verabreichten LH vorliegen. Der Test wird Antikörper nachweisen, welche die Hormonaktivität durch Hemmung der Bindung von LH an die Rezeptoren, durch Hemmung der Aktivität von gebundenem LH und/oder Steigerung der Clearance-Rate von LH senken. Unabhängig von dem Grund der Hemmung in vivo werden die

Antikörper oder Antiseren, die gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich sind, nicht die Aktivität von hohen Spiegeln von LH verhindern, sogar wenn sie im Überschuss zum zirkulierenden LH vorliegen. Dies kann, nach Verabreichung des Antikörpers, durch Messung der Fähigkeit des Serums, mit radioaktivem Iod markiertes hLH zu binden, überwacht werden. Eine Serumprobe (0,01-1 µl) wurde auf 25 µl mit einer Lösung, die 0,9% NaCl, 1 mg/ml Rinderserumalbumin und 0,02 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,2) enthält, verdünnt. Dazu werden 25 µl mit radioaktivem Iod markiertes LH (etwa 50 nCi, das etwa 1 ng enthält) gegeben. Die so erhaltene Lösung wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Eine Lösung von Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin G (IgG) (erhältlich von Cappel, Organon Teknia Corp., West Chester, PA), die 2 µg IgG in 50 µl der vorstehend beschriebenen NaCl-Albumin-Lösung enthält, wurde zugegeben und die so erhaltene Lösung wurde 90 Minuten bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Zu dieser Lösung wurden 100 µl 1% IgGsorb (erhältlich von The Enzyme Center, Inc., 36 Franklin St., Malden, MA), das in Wasser rekonstituiert wurde, gegeben. Diese Suspension wurde 30 Minuten bei 22°C gemischt und anschließend durch Zugabe von 3 ml eiskalter NaCl-Albumin-Lösung verdünnt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 2000 × g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Radioaktivität im Pellet mit einem Gamma-Zähler gemessen. Als eine Negativkontrolle verwendet man ein Serum von einem Tier, das nicht aktiv oder passiv immunisiert wurde. Als eine Positivkontrolle verwendet man 0,1-1 ng des Antikörpers, der ursprünglich dem Tier injiziert wurde. Die Radioaktivität, die in dem Pellet von der Negativkontrolle gemessen wurde, wird von der in der Positivkontrolle und von der in Pellets der Serumproben, die getestet wurden, abgezogen. Beim Vergleich der Werte für die Positivkontrolle und die Serumproben wird das Serum, das den Antikörper im Überschuss zu LH enthält, zur Immunpräzipitation von mindestens 1%-10% des mit radioaktivem Iod markierten LH als Positivkontrolle in der Lage sein.

[0053] Die Verabreichung von Antikörpern gegen hLH bei Menschen wird die wirksamen Konzentrationen des zirkulierenden LH vermindern. Der maximale Umfang der Verminderung ist von der Lage der Bindungsstelle des Antikörpers an LH abhängig. Die Verminderung der LH-Aktivität vermindert die Sekretion von Hormonen der Ovarien und der Hoden und vermindert somit die Feedback-Hemmung von FSH. Daher steigen die FSH-Spiegel und die Fruchtbarkeit wird erhöht. Antikörper gegen hLH, die mit LH von anderen Arten kreuzreagieren, oder Antikörper, die wegen ihrer Fähigkeit ausgewählt wurden, LH von anderen Arten zu binden und die Hormonaktivität zu vermindern, nicht aber aufzuheben, werden ähnliche Wirkungen in den anderen Arten haben. Die geeignetsten Antikörper zur Verwendung bei Menschen werden jene sein, die ein Gerüst und konstante Regionen besitzen, die den menschlichen Immunglobulinen ähnlich sind, und die ihrerseits nicht antigen oder nur schwach antigen sind, wenn sie Menschen injiziert werden. Geeignete Antikörper können durch die „Humanisierung" von Mausmonoclonalen Antikörpern (das heißt Austauschen des Gerüsts und der konstanten Regionen der Maus durch ähnliche Sequenzen, die in menschlichen Immunglobulinen gefunden werden) hergestellt werden. Verfahren, um dies zu erreichen, sind in dem Fachgebiet gut bekannt (38-40). Andere Verfahren der Herstellung von geeigneten Antikörpern schließen die Immunisierung von Primaten wie z.B. des Cynomolgus-Affen ein (41), gefolgt von der Isolierung und der Clonierung von einzelnen Lymphozyten (42). Die Immunglobuline in diesen Primaten besitzen ähnliche Gerüstregionen wie menschliche Immunglobuline. Monoclonale Antikörper, die von diesen Tieren hergestellt wurden, sollten als ein guter Ausgangspunkt für Antikörper dienen, die in Menschen verwendet werden können.

Beispiel 3

Alternative Verfahren zum Erhalt und zur Auswahl der gewünschten Antikörper

[0054] Viele Antikörper, welche die hLH-Aktivität teilweise hemmen können, besitzen eine Neigung, an hLH oder an andere LH-Moleküle, die an Plastik oder an anderen Oberflächen adsorbiert sind, zu binden. Das Screenen auf gewünschte Antikörper wird daher häufig durch Überwachung der Fähigkeiten der Antikörper zur Bindung an hLH oder an anderes LH, das an Plastikmikrotiterplatten adsorbiert ist, oder an LH, das an LH-Rezeptor-Komplexe gebunden ist, erleichtert. Das Screenen auf Antikörper, die an hLH binden, das an einer Plastikoberfläche gebunden ist, kann wie nachfolgend beschrieben erreicht werden. Die Vertiefungen einer Plastikmikrotiterplatte wurden mit 50 µl einer Lösung beschichtet, die 0 oder 1 µg hLH in 0,9% NaCl-0,02 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,2) enthält. Dies ermöglicht dem hLH, an der Oberfläche der Mikrotiterplatte adsorbiert zu werden. Nach 1 Stunde bei 37°C wurden die Lösungen entfernt und mit 200 µl 0,9% NaCl-0,02 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,2), der 200 µg Rinderserumalbumin enthält, für länger als 1 Stunde bei 37°C ersetzt. Dieses füllt die meisten der verbleibenden Adsorptionsstellen. Die Albuminlösung wurde entfernt und durch 50 µl 0,9% NaCl-0,02 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,2), der 50.000-100.000 dpm des monoclonalen Test-Antikörpers enthält, der mit ^{125}I markiert ist, ersetzt. Die Markierung des monoclonalen Antikörpers wird unter Verwendung von Iodo-Gen oder anderen Oxidationsmitteln durchgeführt (22, 43), wie vorstehend für LH beschrieben wurde, wobei 10 µg Antikörper und 500 µCi $Na^{125}I$ verwendet wurden mit der Ausnahme, dass die Reaktionszeit auf 1-5 Minuten ausgedehnt wird. Nach einer Stunde bei 37°C wird die Flüssigkeit

entfernt und die Radioaktivität, die an der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden ist, in einem Gamma-Zähler gemessen. Man wird Antikörper, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Hemmung der hLH-Aktivität nützlich sind, in größeren Mengen in den mit hLH beschichteten Vertiefungen finden als in solchen Vertiefungen, die nicht mit hLH beschichtet sind. Durch diesen Test werden auch andere Arten von Antikörpern nachgewiesen und es sollte ein weiteres Screenen der positiven Antikörper durchgeführt werden, wie nachfolgend oder in Beispiel 2 dargestellt wird.

[0055] Obwohl die Bindung an LH-Rezeptor-Komplexe nicht dafür garantiert, dass ein Antikörper für die teilweise Neutralisierung der LH-Aktivität nützlich sein wird, werden viele der gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Antikörper an die LH-Rezeptor-Komplexe binden. Daher ist es möglich, zunächst nach wünschenswerten Antikörpern durch die Messung ihrer Fähigkeit, an LH-Rezeptor-Komplexe zu binden, zu suchen. Dieser Test ist im Wesentlichen der gleiche wie der Bio-IRMA, der zuvor beschrieben wurde (44), und kann hintereinander oder gleichzeitig durchgeführt werden. Bei gleichzeitigem Bio-IRMA werden 0,025 µCi-0,1 µCi des mit radioaktivem Iod markierten Test-Antikörpers (das heißt, hergestellt wie vorstehend beschrieben) zu einem Ratten-Eierstock-Homogenat (das heißt, hergestellt wie vorstehend beschrieben) und steigenden Mengen von LH, einschließlich 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 und 1000 ng, zugegeben. Nach einer Stunde bei 37°C wird der Membrananteil des Homogenats durch Zentrifugation bei 1000 × g für 10-20 Minuten in ein Pellet sedimentiert, der Überstand verworfen und die Radioaktivität im Pellet in einem Gamma-Zähler bestimmt. Antikörper, die an LH-Rezeptor-Komplexe binden, werden durch ihre gesteigerte Fähigkeit, an Membranen zu binden, die mit mindestens einer der LH-Konzentrationen über dem Test-Nullwert (das heißt, LH wird nicht zugegeben) inkubiert werden. Im sequentiellen Bio-IRMA werden die Membranen zunächst mit LH für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, durch Zentrifugation und Absaugen gewaschen, wie vorstehend beschrieben wurde, und anschließend mit 50.000-100.000 dpm der mit radioaktivem Iod markierten Antikörper inkubiert. Nach einer zusätzlichen Inkubation von 1 Stunde bei 37°C werden die gebundenen und die freien Antikörperfraktionen durch Zentrifugation und Absaugen getrennt, wie vorstehend beschrieben, und das Pellet in einem Gamma-Zähler gezählt. Die nützlichsten Antikörper werden an die LH-Rezeptor-Komplexe binden. Dieses Verfahren ist jedoch nur ein nützliches Screeningverfahren und ein schlüssigerer Test für einen Antikörper bezieht die Verwendung eines biologischen in vitro-Tests ein, wie z.B. einer, der auf der Bildung von Testosteron basiert, wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0056] Die Neigung der nützlichsten Antikörper, an Oberflächen zu binden, die LH enthalten, oder an Komplexe von LH und LH-Rezeptoren, kann ebenfalls die Isolierung von Lymphozyten erleichtern, die der Immunisierung von Affen oder Mäusen folgt, wobei ein Panning-Verfahren verwendet wird. In diesem Verfahren werden Lymphozyten zu Plastikoberflächen gegeben, die mit menschlichem Serumalbumin oder mit anderen Proteinen, die eine nichtspezifische Bindung verhindern, beschichtet sind, indem sie mit Lösungen, die 1 mg/ml menschliches Serumalbumin in 0,9% NaCl-0,02 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,2) enthalten, für länger als 1 Stunde bei 37°C in Kontakt gebracht werden. Die Lymphozyten, die nicht an diese Oberflächen binden, werden anschließend zu Oberflächen gegeben, die beschichtet wurden, indem sie mit hLH und anschließend mit menschlichem Serumalbumin in Kontakt gebracht wurden, wie vorstehend beschrieben. Die Menge von hLH, die verwendet wird, ist nicht kritisch, solange genügend Material an dem Plastik adsorbiert wurde. Dies kann unter Verwendung von 20-50 µg hLH/ml erreicht werden. Geringere und höhere Mengen werden jedoch ebenfalls funktionieren. Die Lymphozyten, die an den Oberflächen binden, die mit LH beschichtet sind, werden ausgewählt und entweder mit Myelomzellen fusioniert, um Hybridome herzustellen (30), mit dem Epstein-Barr-Virus oder einem anderen Virus transformiert, einer Clonierung im Lambda-Phagen unterzogen (36) oder einzelne Zellen werden zur Clonierung mittels der Polymerase-Kettenreaktion ausgewählt (42). Die Antikörper, die hergestellt werden, werden einem Screening unterzogen, wie in Beispiel 2 dargestellt. Diese Strategien erhöhen die Prozentzahl der Antikörper, die wünschenswert sein werden.

[0057] Viele Antikörper, welche LH teilweise hemmen können, können ebenfalls durch einen Prozess ausgewählt werden, der von ihrer Fähigkeit abhängig ist, LH zu binden, das an LH-Rezeptoren gebunden ist. Nach der Immunisierung von Mäusen oder Affen mit hLH werden die Milzzellen und andere Lymphozyten isoliert und Monoschichten eukaryontischer Zellen, die LH-Rezeptoren exprimieren, damit beschichtet. Diese Zell-Monoschichten können durch die Transfektion von Zellen mit Expressionsvektoren, die Ratten- (45), Menschen- (46), Schweine- (47) oder andere LH-Rezeptor-cDNA exprimieren können, durch Verfahren, die auf dem Fachgebiet Standard sind (48, 49), hergestellt werden. Lymphozyten, die an den Monoschichten haften, werden verworfen. Lymphozyten, die nicht an den Monoschichten haften, werden zu ähnlichen Monoschichten von Zellen gegeben, die hLH oder anderes LH enthaltende LH-Rezeptoren exprimieren. Diese können durch die Zugabe von 100 ng hLH oder anderem LH zu den Monoschichten über Nacht bei 4°C und dem Auswaschen des Hormons, das nicht gebunden wurde, hergestellt werden. Lymphozyten, die an diese Zellen binden, werden ausgewählt und entweder mit Myelomzellen fusioniert, um Hybridome herzustellen (30), mit dem Ep-

stein-Barr-Virus oder einem anderen Virus transformiert oder der Clonierung mittels Polymerase-Kettenreaktion unterworfen (42). Die Antikörper, die hergestellt werden, werden einem Screening unterzogen, wie in Beispiel 2 dargestellt. Diese Strategien werden ebenfalls die Prozentzahl der Antikörper erhöhen, die wünschenswert sind. Obwohl diese Rezeptor-basierende Strategie aufwendiger ist als eine Strategie, die auf dem Screenen von Lymphozyten basiert, die an mit LH beschichtete Plastikoberflächen binden, wird sie eine höhere prozentuale Ausbeute an nützlichen Antikörpern ergeben.

Beispiel 4

Verwendung von Antikörpern zur Behandlung des Syndroms der polyzystischen Ovarien

[0058] Das Syndrom der polyzystrischen Ovarien (PCO) ist durch eine unvollständige Follikelentwicklung und durch die Unfähigkeit einer Frau, einen normalen Eisprung zu haben, gekennzeichnet. Der Eierstock enthält viele kleine unreife Follikel, von denen sich nur wenige, wenn überhaupt, ohne klinische Intervention bis zum Punkt des Eisprungs weiterentwickeln. Diese Frauen besitzen im Vergleich zu fruchtbaren Frauen mit einem normalen Zyklus häufig erhöhte Androgenspiegel und ein hohes Verhältnis von LH/FSH. Es gibt zwei Hauptverfahren für die Induktion des Eisprungs bei Frauen mit PCO. Diese schließen die Verabreichung von FSH, um die Follikelentwicklung zu verstärken, oder von Antiöstrogenen, um die FSH-Sekretion der vorderen Hypophyse zu erleichtern, ein. Während beide Behandlungsformen einen Eisprung induzieren können, besteht bei ihnen das Risiko, multiple Eisprünge zu induzieren, da sie die normale negative Östrogen-Feedback-Schleife, die die Sekretion von FSH reguliert, umgehen. Daher werden Frauen, die mit diesen Agenzien behandelt werden, normalerweise sorgfältig überwacht, um eine Hyperstimulation, eine möglicherweise tödliche Nebenwirkung der Behandlung, zu verhindern.

[0059] Die Verabreichung von 10 µg-10 mg eines nichtneutralisierenden Antikörpers gegen LH, die eine transiente und selbstbegrenzende Erhöhung der FSH-Sekretion hervorruft, wird einen Eisprung induzieren, wobei das Risiko der Hyperstimulierung geringer ist als bei einer Behandlung mit Gonadotropin. Die Wirkung ist transient, weil der Antikörper metabolisiert oder auf andere Weise aus dem Kreislauf entfernt wird, und seine Wirkung geht innerhalb von 1-2 Wochen nach der Verabreichung verloren. Die Behandlung ist selbstbegrenzend, weil die negative Feedback-Wirkung von Östradiol auf die FSH-Sekretion nicht ausgeschaltet wird. Daher wird, wenn die FSH-Spiegel steigen und eine Follikelentwicklung stimulieren, die Sekretion von Östradiol zunehmen und weitere Steigerungen der Sekretion von FSH hemmen.

Beispiel 5

Induktion des Eisprungs durch Verabreichung einer oder zweier Dosen

[0060] Es existieren keine guten Verfahren, die verwendet werden können, um den Eisprung bei Frauen mit PCO zu induzieren, die nur eine einzelne oder eine zweifache Behandlung involvieren. Die meisten Behandlungsformen für dieses Syndrom erfordern die mehrfache Behandlung mit FSH, FSH plus LH oder hCG, hMG, Antiöstrogenen, GnRH oder verschiedenen Kombinationen dieser Agenzien. Bei einigen Ansätzen wurden auch GnRH-Antagonisten verwendet, um die zirkulierenden Spiegel von sowohl LH als auch FSH zu vermindern, so dass der Eisprung durch Behandlung mit exogenen Hormonen induziert werden konnte. Eine einzelne Verabreichung einer hohen Konzentration des Antikörpers von der Art, die hierin beschrieben und verwendet wird, kann den Eisprung induzieren. Dies liegt daran, dass der Antikörper sicher in einem sehr großen Überschuss gegeben werden kann, und, da Antikörper lange Halbwertzeiten im Plasma besitzen, dass der Antikörper über mehrere Tage hinweg für die Erhöhung der FSH-Spiegel wirksam sein wird. Wegen der natürlichen Feedback-Wirkung von Östradiol auf die FSH-Sekretion wird die Sekretion von FSH durch die Östrogene kontrolliert, die von dem Follikel hergestellt werden, während sich der Follikel entwickelt. Zu dem Zeitpunkt, an dem der dominante Follikel ausgewählt wurde und sich die Östradiol-Spiegel erhöht haben, wird viel von dem Antikörper aus dem Kreislauf entfernt worden sein. Aus einem oder mehreren verschiedenen Gründen wird der Antikörper die Wirkungen des LH-Anstiegs, der für den Eisprung benötigt wird, nicht beeinflussen. Zunächst einmal liegt die freigesetzte LH-Menge im Überschuss zu der Menge vor, die für einen Eisprung benötigt wird. Zweitens wird der Antikörper die Aktivität von LH nur vermindern, nicht aber neutralisieren. Und drittens wird zu dem Zeitpunkt des LH-Anstiegs viel von dem Antikörper aus dem Kreislauf entfernt worden sein. Daher wird auf Behandlung mit dem Antikörper die Follikelentwicklung und der Eisprung folgen.

Beispiel 6

Antigene, die geeignete hemmende Antiseren induzieren

[0061] Die Verabreichung von geeigneten Antikörpern, wie in Beispiel 1 dargestellt, kann verwendet werden, um die Fruchtbarkeit zu erhöhen. Weil dies eine „passive" Immunisierung ist, wird jedoch eine wiederholte Verabreichung von Antikörpern notwendig sein, um die Antikörper-Spiegel für mehr als einige Tage oder Wochen hoch zu halten. Die Erhöhung für einen kurzen Zeitraum (z.B. Tage) ist für die Induktion des Eisprungs bei Frauen oder für die Erhöhung der Anzahl der Eisprünge bei Tieren in einem oder in mehreren Zyklen ausreichend. Wenn es erwünscht ist, die Aktivität von LH teilweise zu unterdrücken und dadurch die Fruchtbarkeit für längere Zeiträume oder für mehrere Zyklen zu erhöhen, ist es nützlich, eine Immunantwort zu induzieren, welche die aktive Bildung von Antikörpern gegen LH hervorruft. Um diese nützlichsten Antikörper zu erhalten, ist es notwendig, ein Immunogen zu entwickeln, das eine Antwort gegen einen Teil des LH-Moleküls induzieren kann, ähnlich dem, das von B105, B110 oder von anderen Antikörpern, die Komplexe mit LH bilden und etwas von der LH-Aktivität beibehalten, erkannt wird. Geeignete Immunogene werden von der β-Untereinheit von LH abgeleitet, da diese Untereinheit einzigartig für LH ist. LH, TSH und FSH ist die α-Untereinheit gemeinsam. Ihre Konformation scheint bei den Hormonen leicht unterschiedlich zu sein (21) und daher können nützliche Antikörper gegen die α-Untereinheit ebenfalls hergestellt werden. Jedoch wird ihre Verwendung nicht von der vorliegenden Erfindung umfasst, da die Antikörper gegen die alpha-Untereinheit das Potential zur Hemmung der Wirkungen von allen drei Hormonen besitzen. Wenn die Immunantwort gegen hFSH gerichtet ist, wird möglicherweise die Fruchtbarkeit nicht erhöht und Unfruchtbarkeit die Folge sein. Wenn es wünschenswert ist, Frauen aktiv gegen hLH zu immunisieren, um die Fruchtbarkeit zu erhöhen, muss sorgsam darauf geachtet werden, dass die Induktion von Antikörpern gegen hCG vermieden wird. Antikörper gegen hCG besitzen das Potential, die Fruchtbarkeit zu senken (vergl. nachfolgend). Dies ist im Allgemeinen kein Problem bei einer passiven Immunisierung, die vorstehend beschrieben wurde, da die verabreichten Antikörper gegen LH im Allgemeinen aus dem Kreislauf vor dem Zeitpunkt, an dem das hCG für die Fruchtbarkeit benötigt wird, entfernt wurden.

[0062] Antigene, welche die Erzeugung von Antikörpern gegen einen Teil von LH induzieren, dessen Aktivität nicht neutralisiert wird (das heißt, die gewünschte Immunantwort), enthalten eine Sequenz, die von einem Teil der β-Untereinheit von LH abgeleitet wurde. Oft ist dies eine Region der beta-Untereinheit, die nach der Bindung von LH an die LH-Rezeptoren exponiert bleibt. Um stark antigen zu sein, sollten die Immunogene auch Sequenzen enthalten, die fremd gegenüber der Person oder dem Tier sind, die oder das immunisiert werden soll. Wenn die gesamte β-Untereinheit von LH für die Immunisierung verwendet wird, können Antikörper erzeugt werden, welche die LH-Aktivität vollständig hemmen. Hohe Spiegel von neutralisierenden Antikörpern können zur Unfruchtbarkeit führen oder andere negative Konsequenzen wie z.B. die Induktion einer vorzeitigen Menopause oder ein Verlust der Hodengröße oder -funktion haben. Die beste Wahl unter den Resten der beta-Untereinheit von LH, die in dem Immunogen eingeschlossen sein sollten, sind solche, die exponiert bleiben, wenn das Hormon an die LH-Rezeptoren bindet. Diese schließen den Teil des Hormons in der Nähe der Reste 74-77 ein, einer Region des Hormons, die von Antikörpern erkannt wird, die an β-Untereinheiten von hLH oder hCG und an hLH- oder hCG-Rezeptor-Komplexe binden (26,50). Regionen der β-Untereinheit, die nicht für die Immunisierung verwendet werden sollten, schließen Sequenzen in der Nähe der Reste 89-92 und 47-51 ein. Diese sind die Orte der Bindungsstellen für Antikörper, welche die Aktivität neutralisieren.

[0063] Der Entwurf eines minimalen synthetischen Antigens schließt die Reste der β-Untereinheit von hLH ein, die exponiert sind, wenn LH an LH-Rezeptoren gebunden ist. Einige von diesen schließen Pro73-Arg74-Gly75-Val76-Asp77-Pro78-Val79-Val80-Ser81 ein. Synthetische Peptide, die diese Sequenzen enthalten, können an große Trägermoleküle gebunden und zur Immunisierung verwendet werden, wobei Verfahren verwendet werden, die auf dem Fachgebiet gut bekannt sind (14-16, 51-53). Die hergestellten, nichtneutralisierenden Antikörper werden an hLH binden und seine biologische Aktivität hemmen.

[0064] Häufig ist die Fähigkeit von kleinen Peptid-Antigenen gering, einen hohen Immunantwortspiegel zu erzeugen. Nachfolgend wird dargestellt, wie ein Antigen hergestellt wird, das wirksamer bei der Erzeugung von Antikörpern gegen Regionen von hLH ist, die exponiert bleiben, wenn das Hormon an die LH-Rezeptoren bindet. Ein ähnlicher Ansatz könnte verwendet werden, um Immunogene für jedes Protein einschließlich LH von anderen Wirbeltieren zu entwerfen. Es ist allgemein bekannt, dass die besten Immunogene solche sind, die sich deutlich von den Proteinen unterscheiden, die in einem Tier gefunden werden, jedoch die tertiäre Konfiguration des Epitops oder der Epitope, für die eine Immunantwort erwünscht ist, behalten. Ein geeignetes Immunogen kann durch Modifizierung der β-Untereinheit von hLH hergestellt werden, so dass es i) die Fähigkeit behält, an B105 und/oder andere Antikörpern zu binden, welche die Wirkungen von hLH teilweise hemmen, ii)

die Fähigkeit verliert, an Antikörper zu binden, welche die Aktivität von LH neutralisieren, und iii) antigen ist. Geeignete Immunogene können ebenfalls ausgehend von einem anderen Protein als der beta-Untereinheit von LH und durch Modifikation desselben entworfen werden, um die Fähigkeit zu erhalten, an B105 und/oder andere Antikörper, die teilweise die Wirkungen von hLH hemmen, zu binden. Antikörper, die teilweise die Wirkungen von hLH hemmen, werden „Matrizen"-Antikörper genannt und sie werden verwendet, um die Beibehaltung von gewünschten Epitopen zu überprüfen und/oder dementsprechend positiv auszuwählen. Gute Beispiele für Matrizen-Antikörper sind solche, von denen nachgewiesen ist, dass sie zur Erhöhung der Fruchtbarkeit wirksam sind, wie in Beispiel 2 dargestellt wird. Andere Antikörper, die „Ausschluss"-Antikörper genannt werden, werden zur Selektion gegen Antigen-Analoga, die unerwünschte Epitope enthalten, verwendet. Beispiele für Ausschluss-Antikörper sind solche, welche die biologische Aktivität von hLH vollständig neutralisieren und/oder welche dessen Bindung an seinen Rezeptor verhindern.

[0065] Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene, „A" und „B" genannte Strategien zur Erzeugung von Antigenen, wobei eine Strategie der positiven/negativen Auswahl verwendet wird, die auf Matrizen- und Ausschluss-Antikörpern basiert. Bei Ansatz „A" beginnt man mit der β-Untereinheit von LH und verwendet die Zufallsmutagenese, um Substitutionen in Regionen des Moleküls außerhalb des Epitops, das von dem „Matrizen"-Antikörper erkannt wird, herzustellen. Die neu hergestellten Moleküle werden exprimiert (vergl. nachfolgend) und ihre Fähigkeit, den Matrizen-Antikörper zu binden, wird überwacht. Solche, die weiterhin an den Matrizen-Antikörper binden und Mutationen in den anderen Regionen des Moleküls besitzen, werden in einer zweiten Runde der Mutagenese in einem anderen Teil des Moleküls verwendet. Dieses Verfahren wird fortgeführt, bis alle Regionen des Proteins, mit Ausnahme der einen, die in der Antikörperbindungsstelle involviert ist (z.B. B105), modifiziert wurden. Die endgültigen Analoga binden an die Matrizen-Antikörper, nicht aber an die Ausschluss-Antikörper. Bei einer Variante dieses Verfahrens beginnt man mit einer Hormon-Chimäre, die an den Matrizen-Antikörper bindet. Solche Chimären können ausgehend von verschiedenen Arten von LH, von denen bekannt ist, dass sie nicht an die Matrizen-Antikörper binden oder eine neutralisierende Immunantwort auf hLH induzieren, hergestellt werden. Beispiele für diese Art von Immunogenen sind Chimären der β-Untereinheiten von menschlichem LH und Rinder-LH. Diese schließen die β-Untereinheit von Rinder-LH ein, die durch die Substitution von Prolin 74 durch Arginin, dem Rest, der an dieser Stelle in der β-Untereinheit des menschlichen LH gefunden wird, modifiziert wurde. Reste von hLH werden gegen homologe Regionen von den verschiedenen Arten von LH ausgetauscht, um die Bindungsstelle für die Matrizen-Antikörper zu erzeugen. Die homologen Regionen werden durch das Ausrichten der Sequenzen von hLH und dem anderen LH an den Positionen der hoch konservierten Cysteinreste identifiziert, wie von Pierce und Parsons (1) gezeigt wurde.

[0066] Bei Ansatz „B" verwendet man ein Gerüstmolekül, das nicht verwandt ist mit der Struktur der β-Untereinheiten von Glycoprotein-Hormonen oder dieser nur geringfügig ähnelt. Dies kann jedes Protein einschließen, das Schleifenstrukturen enthält, wie z.B. solche, die in Immunglobulinfaltungen oder zwischen den Helices in Vier-Helix-Bündel-Proteinen gefunden werden. Die Sequenz von hLH zwischen den Resten 65-85 wird gegen eine dieser Schleifen durch Verfahren der Standard-Mutagenese ausgetauscht. Wenn dieses Protein in einem geeigneten Expressionsvektor von E. coli (z.B. einem der T7-Vektoren, erhältlich von Novagen) hergestellt wird, kann es auf seine Fähigkeit getestet werden, an monoclonale Antikörper zu binden, die an hLH-Rezeptor-Komplexe binden. Da nur ein Teil der Reste, die das Epitop bilden, in dem exprimierten Protein vorhanden sein wird, wird seine Affinität für den Antikörper niedriger sein als die von hLH.

[0067] Um die Selektivität und Affinität der Proteine, die in den Ansätzen „A" oder „B" hergestellt wurden, zu verbessern, kann entweder ein bakterielles oder ein Bakteriophagen-Expressionssystem (34, 36, 55-58) verwendet werden. In beiden Fällen werden Bibliotheken von mutierten Analoga hergestellt und es wird die Mutante ausgewählt, welche die höchste Affinität für B105, B110 oder andere ähnliche Matrizen-Antikörper, die in Beispiel 2 als nützlich eingestuft wurden, besitzt. Zusätzlich kann ebenfalls negative Selektion verwendet werden, wobei neutralisierende Antikörper oder Antiseren verwendet werden, die in Beispiel 2 als nicht nützlich eingestuft wurden. Dies wird die Fähigkeit des Antigens minimieren, unerwünschte Antikörper hervorzurufen, wenn es in einem Impfstoff verwendet wird.

[0068] Die nachfolgende Beschreibung betrifft ein Selektionsverfahren, das auf Phagen-Display basiert, aber durch einen Fachmann leicht für die Herstellung und das Screenen von Genbanken für fast jedes Expressionssystem adaptiert werden könnte. Ein System, das für die Selektion zugänglich ist, basiert auf Protein-Blotting (59). Mehrere verschiedene Phagen-Display-Systeme können ebenfalls verwendet werden. Eines schließt die Verwendung eines Vektors (d.h. pX-M13gIII) ähnlich dem phGH-M13gIII (34) ein. Wenn Ansatz „A", der vorstehend diskutiert wurde, verwendet wird, enthält dieser neue Vektor, der pA-M13gIII genannt wird, entweder die β-Untereinheit von hLH oder eine hLH-LH-β-Untereinheit-Chimäre anstelle der codierenden Sequenzen des Wachstumshormons von phGH-M13gIII (**Fig. 4**). Wenn Ansatz „B", der vorstehend diskutiert wurde,

verwendet wird, werden die codierenden Sequenzen des Wachstumshormons von phGH-M13gIII durch ein Gen ersetzt, das ein Molekül codiert, das mit der β-Untereinheit von hLH nicht verwandt ist, mit Ausnahme des Einschlusses der codierenden Sequenzen der beta-Untereinheit von hLH in der Nähe des Restes 74, um einen neuen Vektor herzustellen, der pB-M13gIII genannt wird. Die codierende Sequenz der Region des Vektors, der die „B"-Sequenzen codiert, enthält ebenfalls Restriktionsstellen, welche die Kassetten- oder andere Arten der Mutagenese ermöglichen, um das Einbringen von Zufallssequenzen zu ermöglichen. Wenn Zufallssequenzen in die codierenden Regionen der Vektoren pA-M13gIII oder pB-M13gIII eingebracht werden und die Vektoren verwendet werden, um E. coli zu transformieren, wird eine Genbank von Mutanten hergestellt. Diese mutierten Proteine können auf der Oberfläche von M13-Phagemid-Partikeln als Gen III-Fusionsproteine durch Zugabe des Helfer-Phagen M13KO7 zu E. coli exprimiert werden. Diese Phagemid-Partikel werden an den Antikörper im Verhältnis zu den Affinitäten der modifizierten Proteine „A" oder „B" für den Antikörper binden. Ein geeignetes Verfahren, um Phagmid-Partikel auszuwählen, die an die Matrizen-Antikörper binden, ist die Verwendung eines Festphasen-Analysenprotokolls. In dieser Analyse wird der Matrizen-Antikörper verwendet, um eine Oberfläche zu beschichten, wie beschrieben wurde (22), und anschließend wird eine Lösung, welche die Phagemid-Partikel enthält, zugegeben. Phagemid-Partikel, die nicht an die Oberfläche binden, können verworfen werden. Solche Partikel, die an dem Antikörper auf der Oberfläche binden, können von dem Antikörper durch die Zugabe von Puffern mit einem niedrigen pH-Wert (z.B. pH-Wert 3) entfernt werden und dazu verwendet werden, um E. coli erneut zu transformieren. Wenn eine negative Selektion erwünscht wird, können die Ausschluss-Antikörper gegen die Matrizen-Antikörper auf der Oberfläche ausgetauscht werden. In diesem Fall werden die Partikel, die an die Oberfläche binden, verworfen. Dieses Verfahren wird mehrere Male wiederholt und anschließend werden die codierenden Regionen von mehreren Genen für die „A"- und „B"-Proteine einer DNA-Sequenzierung unterzogen. Auf diese Weise können Sequenzen identifiziert werden, die für die Bindung an Matrizen-Antikörper kritisch sind. Falls Ausschluss-Antikörper verwendet werden, kann zusätzlich gegen unerwünschte Epitope selektiert werden. Man kann auch Substitutionen in anderen Teilen des Moleküls identifizieren, die nur eine geringe oder keine Wirkung auf die Konformation der bindenden Region des gewünschten Antikörpers ausüben. Wenn Moleküle, die durch diese Sequenzen codiert werden, verwendet werden, um Tiere oder Menschen zu immunisieren, werden sie die Bildung von Antikörpern hervorrufen, die mit hLH kreuzreagieren. Da diese Antikörper einen Teil des Moleküls erkennen werden, von dem bekannt ist, dass er nach der Bindung von hLH an seine Rezeptoren exponiert ist, werden sie die Wirkungen von hLH hemmen, aber seine biologische Aktivität nicht vollständig verhindern können.

[0069] In einigen Fällen kann es vorkommen, dass Matrizen- und Ausschluss-Antikörper nicht erhältlich sind. In diesen Fällen können Matrizen-Antiseren und Ausschluss-Antiseren erzeugt werden, die anstelle der Antikörper unter Verwendung der nachfolgenden Strategie verwendet werden können. Die Corpora lutea von Eierstöcken von Ratten werden durch Behandlung weiblicher Ratten mit PMSG und hCG hergestellt, wie vorstehend beschrieben wurde. Diese Corpora lutea werden mit hLH inkubiert, um dem Hormon zu ermöglichen, an die LH-Rezeptoren in den Membranen zu binden. Anschließend werden die Membranen gewaschen, um das freie hLH zu entfernen, und die Membranen werden mit den Antiseren inkubiert. Antikörper, die an das hLH gebunden werden, das an den LH-Rezeptoren der Membran gebunden ist, werden anschließend von dem Rest der Antiseren durch Waschen der Membranen getrennt. Diese Antikörper werden durch die Behandlung der Membranen bei einem pH-Wert unter 5 freigesetzt. Diese Behandlung setzt sowohl die Antikörper als auch das hLH von den Rezeptoren frei. Die Antikörper werden von hLH durch Gelfiltration oder durch andere Verfahren getrennt und können anschließend als Matrizen verwendet werden. Antikörper, die im Serum zurückbleiben, das vollständig frei von Matrizen-Antikörpern ist, können als Ausschluss-Antikörper verwendet werden.

Beispiel 7

Verstärkung der immunologischen Aktivität

[0070] Während der aktiven Immunisierung gegen LH wird eine ortsgerichtete Autoimmunantwort erzeugt. Daher ist es essentiell, Proteine zu verwenden, die hoch antigen sind. Dies kann durch die Verwendung des in Beispiel 6 beschriebenen Matrizen/Exklusions-Ansatzes zur weitestmöglichen Verfremdung des Immunogens erleichtert werden. Zusätzlich ist es wünschenswert, die Moleküle multivalent zu machen, um die Chancen zu erhöhen, dass sie mit dem Immunsystem interagieren. Ein gutes Verfahren, um das Molekül multivalent zu machen, ist Reste entweder an dem C-Ende oder an dem N-Ende anzufügen, welche die Erzeugung einer α-Helix hervorrufen, die mit anderen Molekülen eine Coiled-Coil bilden können. Die Regeln für den Entwurf von Peptidsequenzen, die Coiled-Coils bilden, sind auf dem Fachgebiet gut bekannt (60, 61). Zusätzlich ist es ebenfalls möglich, natürlich vorkommende Sequenzen von Proteinen zu verwenden, von denen bekannt ist, dass sie Coiled-Coils bilden, wie z.B. solche, die im Hemagglutinin-Protein des Grippevirus, Laminin, GCN4

oder einem beliebigen von mehreren anderen Proteinen gefunden werden. Es ist ebenfalls möglich, Reste an den C-Terminus oder an den N-Terminus anzufügen, was zur Erzeugung einer Dreifach-Helix führt, die ähnlich zu der ist, die in Kollagen gefunden wird. Diese Dreifach-Helix wird die Kombination von drei oder mehr Moleküle des Antigens ermöglichen. Andere Strategien zur Erhöhung der Antigenizität des Immunogens können ebenfalls verwendet werden, einschließlich der Bindung der Immunogene Ende-zu-Ende, um ein Polyprotein herzustellen. Wie dargestellt wurde (**Fig. 5**), ist es unter Verwendung dieser Strategie möglich, ein Protein zu entwerfen, das eine beliebige Anzahl von sich wiederholenden Einheiten besitzt.

[0071] Die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Antikörper, die zu einer nichtneutralisierenden Hemmung der LH-Aktivität führen, interagieren im Allgemeinen gut mit der freien β-Untereinheit und dem Heterodimer. Bei der Herstellung von Immunogenen, die die Bildung dieser Antikörper induzieren sollen, ist es daher im Allgemeinen zweckmäßig, mit der freien β-Untereinheit anzufangen. Viele bevorzugte Antikörper, die eine neutralisierende Hemmung der hCG-Aktivität ergeben, binden dagegen an das α,β-Heterodimer besser als an die freie β-Untereinheit von hCG. Um die Bildung dieser Antikörper hervorzurufen, ist es häufig nützlich, mit einem Immunogen zu beginnen, das ein Fusionsprotein ist, das durch Bindung des C-Terminus des Peptids, das die Reste 1-114 der β-Untereinheit von hCH umfasst, an den N-Terminus eines flexiblen Proteinlinkers, der aus sechs sich wiederholenden Einheiten von Glycin und Serin aufgebaut ist, hergestellt wird. Der C-Terminus des Fusionsproteins wird anschließend an den N-Terminus der Reste 1-96 der Rinder-α-Untereinheit gebunden. Dies stellt ein einzelnes Polypeptid zur Verfügung, das die Gesamtkonformation der Reste der β-Untereinheit besitzt, die in hCG gefunden werden, und das direkt zur Immunisierung verwendet werden kann oder das als Ausgangsverbindung in Beispiel 6 verwendet werden kann. Die Verabreichung des Antigens kann in jeder Weise durchgeführt werden, die auf dem Fachgebiet gut bekannt ist. Dies schließt die Injektion, die Injektion in Hilfssubstanzen und die Bindung des Antigens an ein Virus ein.

Beispiel 8

Details des Testansatzes für hCG gemäß der vorliegenden Erfindung

1. Neutralisierende Antikörper werden entweder durch die Herstellung von monoclonalen Antikörpern oder durch ihren Erwerb erhalten. Es ist außerdem möglich, neutralisierende Antikörper zu erhalten, indem man Kaninchen oder andere Tiere gegen hCG immunisiert. Es wird ebenfalls nützlich sein, Antikörper oder Antiseren gegen hLH zu erhalten.
2. Diese Antikörper oder Antiseren werden als positive oder negative Matrizen verwendet, um Genbanken von Mutanten der β-Untereinheit von hCG abzusuchen. Diese Genbanken können durch Zufallsmutagenese der β-Untereinheit von hCG in bestimmten Regionen des Moleküls hergestellt werden. Es sollte darauf geachtet werden, dass vorzugsweise eine β-Untereinheit von hCG verwendet wird, der der C-Terminus fehlt oder die eine andere Sequenz für diesen Teil des Moleküls besitzt, um zu vermeiden, dass Immunogene ausgewählt werden, die nichtneutralisierend sind. Ein geeignetes Verfahren umfasst die Verwendung von Phagen-Display-Techniken, die ebenfalls nachfolgend aufgelistet sind. Ein Phagen-Display ist jedoch nicht essentiell, damit die Technik funktioniert.
3. Man lässt die Mutanten zuerst an die negativen Selektions-Antikörper binden. In dem vorliegenden Beispiel, nämlich der Entwicklung eines hCG-Impfstoffs, würde dies die Bindung an die Antikörper gegen LH oder an die Antiseren gegen LH umfassen, um Mutanten zu entfernen, die strukturell identisch mit LH sind.
4. Man lässt anschließend die Mutanten, die nicht an die negativen Selektions-Antikörper binden, an positive Selektions-Antikörper binden, nämlich solche, die durch die Immunisierung mit hCG hergestellt wurden. Während des positiven Selektionsverfahrens werden freie β-Untereinheiten von hCG ebenfalls zugegeben, um Antikörper zu eliminieren, welche die freie Untereinheit binden, und somit den Selektionsprozess auf solche Antikörper zu begrenzen, die dimerspezifisch sind. Die Mutanten, die nicht an die positiven Selektions-Antikörper binden, werden verworfen. Im Fall der durch Phagen exprimierten Proteine werden die Phagen von den positiven Selektions-Antikörpern eluiert und dazu verwendet, E. coli zu infizieren.
5. Dieses Verfahren wird mehrere Runden wiederholt, um mögliche Immunogene zu entfernen, die an die hLH-Antikörper binden können, und um weiterhin solche auszuschließen, die eine geringe Affinität für hCG-Antikörper besitzen. Die DNA-Sequenzen, welche die Immunogene codieren, werden sequenziert. Immunogene, die sich am stärksten von hCG unterscheiden, aber die Fähigkeit behalten, an hCG-spezifische Antikörper oder Antiseren mit hoher Affinität zu binden, werden weiter verwendet.
6. Falls es notwendig ist, wird eine zweite Runde der Mutagenese durchgeführt, um die Anzahl der Unterschiede zwischen dem möglichen Immunogen und hCG zu erhöhen. Das Ziel ist, ein Immunogen herzustellen, das sich von hLH und so stark wie möglich von hCG unterscheidet, aber die Schlüsselaspekte der hCG-Struktur behält, die es ermöglichen, einen hohen Titer von neutralisierenden Antikörpern zu erzeugen. Zu diesen gehören die Regionen der β-Untereinheit mit Ausnahme des C-Terminus, die sich am stärksten

von der β-Untereinheit von hLH unterscheiden.
7. Wenn die einzelnen antigenen Hauptdeterminanten ausgewählt wurden, wird das Immunogen multivalent gemacht. Es existieren verschiedene Verfahren, um dies zu erreichen. Eines besteht darin, die Determinante an ein Protein zu fusionieren, das selber multivalent ist oder das Multimere bildet (z.B. Immunglobuline). Ein anderes Verfahren besteht darin, Reste an ein Protein zu fusionieren, die Coiled-Coils erzeugen und die eine Assoziation fördern werden. Wenn es möglich ist, werden diese von natürlichen Proteinen abgeleitet, von denen bekannt ist, dass sie eine Immunantwort hervorrufen (z.B. Grippe).
8.A. Wenn es erwünscht ist, dass die Fruchtbarkeit verhindert wird, ist es essentiell, hohe Titer gegen das intakte hCG-Molekül zu erhalten. Dies kann erfordern, dass hCG mit einem Molekül kombiniert wird, das einer α-Untereinheit ähnlich ist. Die α-Untereinheit von anderen Säuger-Glykoproteinen ist als Ausgangsmaterial geeignet.
8.B. Ebenfalls ein geeigneter Ausgangspunkt ist ein Molekül, das die gewünschten Eigenschaften besitzt, ein einzelnes Polypeptid zu sein und die Struktur des Heterodimers beizubehalten. In diesem Fall ist es wünschenswert, Mutationen auch in dem Teil des Moleküls zu erzeugen, der von der α-Untereinheit abgeleitet ist.
8.C. Die Immunogene können mittels jedes geeigneten Verfahrens, wie z.B. Expression in E. coli, Hefe oder Säugerzellen, hergestellt werden. Es ist nicht notwendig, dass die Immunogene glycosyliert sind. Die Immunogene können ebenfalls DNA oder RNA sein. Sie können ebenfalls in der Virenhülle integriert sein.
8.D. Es ist ebenfalls nicht notwendig, mit der β-Untereinheit von hCG zu beginnen. Es kann mit jedem Protein begonnen werden. Der Schlüssel ist, die Matrizen-Strategie zu verwenden, um die Proteine auszuwählen, die man möchte. Zum Beispiel kann man mit einem vierfachen Helix-Bündel beginnen und die Aminosäuresequenzen von Teilen der β-Untereinheit von hCG einfügen, die in der Nähe der Reste 38-57 und 91-92 liegen. Man kann ebenfalls mit einem Immunglobulin beginnen, einschließlich einem, das ein antiidiotypischer monoclonaler Antikörper gegen einen hCG-spezifischen Antikörper ist.

[0072] Fig. 1 ist ein Diagramm, das den Einfluss von Antikörpern und Antiseren auf die Bindung von radioaktiv markiertem hLH an LH-Rezeptoren darstellt. Fig. 1 stellt den Einfluss von drei verschiedenen Arten von Antikörpern oder Antiseren auf die Bindung von hLH an die LH-Rezeptoren dar. Antikörper „A" besitzt nur eine geringe oder keine Wirkung auf die Bindung des Hormons an Rezeptoren. Sein hauptsächlicher möglicher hemmender Einfluss in vivo würde sich auf den Metabolismus des Hormons beziehen. Antikörper „B" besitzt die Fähigkeit, die Bindung von hLH an LH-Rezeptoren teilweise zu blockieren. Obwohl der Antikörper in vivo hemmend sein würde, wäre auch ein sehr großer Überschuss dieses Antikörpers gegenüber LH nicht in der Lage, dessen Aktivität auf unter 40% zu vermindern, wie hier gezeigt wird. Es sollte beachtet werden, dass verschiedene Antikörper hergestellt werden können, die unterschiedliche Fähigkeiten besitzen, die Aktivitäten von LH zu blockieren (z.B. B105 und B110). Antikörper „B" ist ein Beispiel der allgemeinen Art des Antikörpers, der in vivo am nützlichsten ist. Antikörper „C" ist ein neutralisierender Antikörper, da er in hoher Konzentration die Aktivität von hLH verhindern kann. Aufgrund seines Potentials, die LH-Aktivität zu verhindern, würde ein Überschuss dieses Antikörpers die Fruchtbarkeit hemmen.

[0073] Fig. 2 ist ein Diagramm, das den Einfluss von Antikörpern und Antiseren auf die Fähigkeit von hLH, in vitro Steroidbiosynthese zu induzieren, darstellt. Fig. 2 stellt die Wirkungen von drei Antikörpern auf die Fähigkeit von LH dar, die Synthese von Testosteron (das heißt Steroidgenese) von Leydig-Zellsuspensionen von Rattenhoden zu induzieren. Kurve „A" stellt die Fähigkeit von hLH dar, die Steroidgenese bei Abwesenheit von Antikörpern zu induzieren. Kurve „B" stellt die Fähigkeit von hLH dar, die Steroidgenese in Gegenwart eines sehr großen Überschusses an Antikörper, der die hLH-Aktivität auf etwa ein Drittel senken kann, zu induzieren. Kurve „C" stellt die Fähigkeit von hLH dar, die Steroidgenese in Gegenwart eines sehr großen Überschusses an Antikörper, der die hLH-Aktivität auf etwa ein Zwanzigstel senken kann, zu induzieren. Kurve „D" stellt die Fähigkeit von hLH dar, die Steroidgenese in Gegenwart eines sehr großen Überschusses an Antikörper, der die hLH-Aktivität neutralisieren kann, zu induzieren. Die Entscheidung, Antikörper „B" und/oder „C" in vivo zu verwenden, wird von dem Verhältnis von LH/FSH und dem gewünschten Ausmaß der Unterdrückung der LH-Aktivität abhängen. Wenn die hLH-Spiegel hoch sind und es notwendig ist, sie stark zu vermindern, würde Antikörper „C" bevorzugt werden. Wenn die hLH/hFSH-Verhältnisse nur leicht erhöht sind, würde Antikörper „B" bevorzugt werden. Die Verwendung einer sehr hohen Dosis des Antikörpers „D" würde zu Unfruchtbarkeit führen. Es wird erwartet, dass viele nützliche Antikörper gefunden werden, welche die Fähigkeit besitzen, sowohl in den Zellen des Eierstocks als auch in den Hodenzellen die Aktivität von hLH oder von anderem LH zu vermindern.

[0074] Fig. 3 ist ein Diagramm, das den Einfluss von Antikörpern und Antiseren auf die Fähigkeit von hLH, Steroidbiosynthese in vivo zu synthetisieren, darstellt. Fig. 3 stellt die Wirkungen von drei verschiedenen Antikörpern auf die Erzeugung von Testosteron bei Männern dar, wenn sehr große Mengen des Antikörpers in-

travenös vor den verschiedenen Mengen von hLH, das ebenfalls intravenös verabreicht wird, verabreicht werden. In allen dargestellten Beispielen, war die Menge des verabreichten Antikörpers wesentlich höher als die von hLH auf einer molaren Basis. Man würde erwarten, dass die Antikörper ähnliche Wirkungen auf die Steroidgenese bei Frauen zeigen. Kurve „A" zeigt die Wirkung von hLH auf die Steroidgenese in Abwesenheit von Antikörpern. Kurve „B" zeigt die Wirkung einer sehr großen Menge eines Antikörper, der die Aktivität von hLH höchstens um 40% hemmen kann. Kurve „C" stellt den Einfluss einer sehr großen Menge eines Antikörper dar, der die Aktivität von hLH höchstens um 95% hemmen kann. Kurve „D" stellt die Wirkungen einer sehr großen Menge eines neutralisierenden Antikörpers dar.

[0075] Fig. 4 zeigt Vektoren, die in Matrizen/Ausschluss-Selektions-Strategien verwendet werden können. Diese Vektoren sind im Entwurf denen ähnlich, die von Bass et al. (34) beschrieben wurden, und die durch den Austausch der codierenden Sequenzen des menschlichen Wachstumshormons mit solchen einer hLH-Chimäre hergestellt werden, wobei Polymerase-Ketten-Reaktions-Mutageneseverfahren verwendet werden, die auf dem Fachgebiet Standard sind, wie z.B. das SOEing-Verfahren, das von Ho et al. beschrieben wurde (63). In dieser Figur stellt das „lac p" den lac-Promotor dar, stII stellt die Leader-Sequenz dar, „hLH beta" stellt die codierende Sequenz von Codon 1 bis Codon 114 der beta-Untereinheit des menschlichen LH dar, „M13 gene III" stellt die codierende Sequenz der Codons 198-410 des M13-Gen-Proteins im gleichen Leserahmen wie die Codons von stII und menschlichem LH-beta dar. „Amp Resistenz" ist das Gen von dem pBR322, das das β-Lactamase-Enzym codiert, „322 ori" ist der Replikationsursprung von pBR322, und „f1 ori" ist der Ursprung der Replikation von M13. Mutationen würden in dem „hLH-beta"-Teil dieses Vektors eingeführt.

[0076] Fig. 5 zeigt die Arten von Immunogenen, die eine erhöhte Antigenizität für die Verwendung bei der aktiven Immunisierung gegen LH besitzen. Einige von ihnen besitzen das Heptad-Repeat, von dem bekannt ist, dass es eine Coiled-Coil erzeugt (Bild A). Andere besitzen ein Repeat, von dem bekannt ist, dass es eine Tripel-Helix erzeugt (Bild B). Diese ergeben eine erhöhte Antigenizität, weil sie polymer sind. Andere Verfahren der Herstellung von polymeren Immunogenen schließen die Herstellung von Fusionsproteinen mit entweder dem C-Terminus (Bild C) oder dem N-Terminus des Immunglobulins (Bild D) ein. Ein Einzelketten-Immunogen, das ein Fusionsprotein der Rinder-α-Untereinheit und der β-Untereinheiten von hCG und hFSH umfasst, würde eine erhöhte Antigenizität im Menschen hervorrufen.

[0077] Abbildung A: Die Codons für zwei oder mehr Heptad-Repeats werden im Leserahmen zwischen dem Codon 114 und dem Terminationscodon des LH oder der analogen β-Untereinheit eingebracht. Die Konstruktion des Heptad-Repeats ist ähnlich zu der, die in der Referenz 60 beschrieben wurde. Jedes Repeat enthält 7 Aminosäuren, die in der Reihenfolge „A, B, C, D, E, F, G" markiert sind, welche die nachfolgenden Eigenschaften besitzen. Aminosäuren a und d sind hydrophob und sind Leucin, Isoleucin oder Valin. Aminosäuren E und G sind geladene Aminosäuren. Aminosäure E sollte die entgegengesetzte Ladung wie Aminosäure G besitzen, um Homodimere zu erzeugen. Wenn E ein Glutamat ist, dann sollte G daher ein Lysin sein. Aminosäuren „B, C, F" können von fast jeder Art sein, welche die Helix-Erzeugung begünstigt. Daher sollten sie wenige Proline oder Glycine enthalten, wenn überhaupt.

[0078] Abbildung B: Die Codons für 6 oder mehr Triplett-Aminosäuren-Repeats werden im Leserahmen zwischen Codon 114 und dem Terminationscodon der β-Einheit eingebracht. Diese Tripletts codieren die Aminosäuren Glycin, X, Y, wobei X und Y jede Aminosäure sein können, von der bekannt ist, dass sie ein Teil der Kollagensequenz ist, welche eine Triple-Helix bildet.

[0079] Abbildung C: Die Codons für die schwere Kette von IgG werden direkt am 5'-Ende von Codon 1 der β-Untereinheit eingebracht. Wenn diese Gene mit der lambda- oder kappa IgG-leichten Kette coexprimiert werden, werden sie die Produktion eines IgG hervorrufen, das zwei β-Untereinheiten an seinem C-Terminus enthält.

[0080] Abbildung D: Die Codons für die Region der schweren Kette von IgG, der die variable und die erste konstante Region fehlt, werden im Leserahmen zwischen Codon 114 und dem Terminationscodon der β-Untereinheit eingebracht.

[0081] Abbildung E: Codons für eine Glycin-Serin-Repeat-Sequenz (das heißt GS-Repeat) wie z.B. die Sequenz Serin-Glycin-Serin-Glycin-Serin-Glycin-Serin-Glycin-Serin-Glycin-Serin-Glycin werden im Leserahmen zwischen Codon 114 und dem Terminationscodon eines Analogons der β-Untereinheit eingebracht. Das letzte Codon dieses Analogons wird 126. Dann werden die Codons 1-96 der Rinder- oder einer anderen α-Untereinheit oder die Codons 1-92 der menschlichen α-Untereinheit im Leserahmen zwischen dem Codon 126 und dem Terminations-codon des Konstrukts der β-Untereinheit, das den Poly-Glycin-Serin-Schwanz enthält, ein-

gebracht. Dieses erzeugt eine einzelne Untereinheit von Gonadotropin, welche die Struktur des Heterodimers des Glycoprotein-Hormons vermittelt.

[0082] Abbildung F: Die Codons der α-Untereinheit von Mensch, Rind oder anderen Wirbeltieren oder eine analoge Sequenz werden zwischen dem letzten Codon und dem Terminationscodon eines Gens eingebracht, das ein Heptad-Repeat codiert, das nur positiv geladene Aminosäuren in den Positionen E und G in dem Heptad-Repeat enthält (das heißt Heptad-Repeat #1), wobei Verfahren verwendet werden, die jedem Fachmann für rekombinante DNA-Standardtechniken zur Herstellung und Expression von Genen bekannt sind. Wenn dieses Gen in Bakterien oder in Hefe oder in eukaryontischen Zellen oder Organismen exprimiert wird, wird es ein Protein herstellen, das den positiv geladenen Heptad-Repeat an seinem Amino-Terminus und eine α-Untereinheit oder ein α-Untereinheit-Analogon an seinem Carboxy-Terminus besitzt. Die Codons für ein Heptad-Repeat, das negativ geladene Aminosäuren in den Positionen E und G codiert (das heißt Heptad-Repeat #2), werden zwischen dem letzten Codon und dem Terminationscodon für ein Analogon der β-Untereinheit eingebracht. Wenn dieses Gen in Bakterien oder in Hefe oder in anderen eukaryontischen Zellen oder Organismen exprimiert wird, wird es ein Protein herstellen, das eine β-Untereinheit oder ein Analogon an seinem Amino-Terminus und den negativ geladenen Heptad-Repeat an seinem Carboxy-Terminus besitzt.

[0083] Abbildung G: Dies zeigt das Heterodimer, das erzeugt wird, wenn die Proteine, welche die Form besitzen, die in der Erklärung F beschrieben wird, gemischt werden. Die Sequenzen des Heptad-Repeats #1 und des Heptad-Repeats #2 werden gewählt, um die Erzeugung von Heterodimeren zu fördern und die Erzeugung von Homodimeren zu vermindern.

[0084] Abbildung H: Multimere werden gebildet, wenn die Verbindungen in den Abbildung F und G gemischt werden, was auf die Kombination der α- und β-Untereinheiten und der Heptad-Repeats zurückzuführen ist. In den Abbildung A – H bezieht sich das „N-„ und das „C-„ auf den Amino-Terminus und den Carboxy-Terminus der Proteine. Das „i" bezieht sich auf eine einzelne Einheit, die mehrere Male wiederholt werden kann. Es sollte beachtet werden, dass, auch wenn die Heptad-Repeats, die hierin erklärt werden, identisch sind, die Verwendung von identischen Repeats nicht wesentlich ist. Es existiert eine hohe Anzahl von Proteinen, die nicht-identische Heptad-Repeats enthalten, die in der Lage sind, Homodimere oder Heterodimere zu erzeugen (60).

Einzelketten-Gonadotropine mit Lutropin-Aktivität

Beispiel 9

Herstellung und Verwendung des Analogons #1 (vergleiche Tabelle 1), einem Einzelketten-Gonadotropin mit Lutropin-Aktivität (vergleiche **Fig. 6**).

[0085] Die codierenden Sequenzen für Analogon #1, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, können synthetisiert werden, indem der beschriebene Blockierungs-Ligierungsansatz verwendet wird (54), oder sie können hergestellt werden, indem mit den codierenden Sequenzen für die β-Untereinheit von hCG und für die menschliche α-Untereinheit begonnen wird. Diese können von einer menschlichen Plazenta-cDNA-Genbank cloniert werden. Die Sequenzen, die das Signalpeptid der menschlichen α-Untereinheit codieren, werden deletiert und die codierenden Sequenzen der Proteine werden zusammengespleißt, wobei die SOEing-Technik (63) wie nachfolgend verwendet wird: Primer #1 (100 ng), der die Sequenz 5'-ATGAAATCGACGGAATCAGACTCGAGC-CAAG- GATGGAGATGTTCCAGGG GCTGCT-3' besitzt, und Primer #2 (100 ng), der die Sequenz 3'-GGGAG-CCTGTGGGGCTAG-GAGGGGGTTCCTAGGCCATCGCCTAGACCAT CG-5' besitzt, werden mit der cDNA der β-Untereinheit von hCG (1 µg), die als eine Matrize dient, gemischt und die PCR wird für 25 Temperaturzyklen von 94°C (30 Sekunden), 50°C (60 Sekunden), 72°C (60 Sekunden) durchgeführt, wobei die Pfu-DNA-Polymerase, gekauft von Stratagene, La Jolla, CA, und Desoxynucleotidtriphosphate und der PCR-Puffer verwendet werden, wie in (63) beschrieben. Primer #3 (100 ng), der die Sequenz 5'-GGATCCGG-TAGCGGATCTGGTAGCGCTC- CTGATGTGCAGGATTGCCCA-3' besitzt, und Primer #4 (100 ng), der die Sequenz 3'-ACGTCATGAAGAATAATAGTGTT-TAGAATTCCATGGCCTAGGTAGAGTTC GATTAGGCCT 5' besitzt, werden mit der cDNA der menschlichen α-Untereinheit (1 µg), die als eine Matrize dient, gemischt und die PCR wird für 25 Temperaturzyklen von 94°C (30 Sekunden), 50°C (60 Sekunden), 72°C (60 Sekunden) durchgeführt, wobei die Pfu-DNA-Polymerase und Desoxynucleotidtriphosphate und der PCR-Puffer verwendet werden, wie in (63) beschrieben. Diese zwei PCR-Reaktionen ergeben Produkte, die als Zwischenmatrizen in einer dritten (endgültigen) PCR-Reaktion dienen, welche die gewünschten Konstrukte in einer Form, die für das Clonieren geeignet ist, ergibt. Die endgültige PCR-Reaktion wird durch das Mischen von 1 µl der Produkte von den ersten beiden PCR-Reaktionen zusammen mit dem Primer #5, der die Sequenz 5'-ATGAAATC-GACGGAATCAGACTC- GAGCCAAGG-3' besitzt, und dem Primer #6, der die Sequenz 3'-ATTCCATGG-

CCTAGGTAGAGTTCGATTAGGGCT-5' besitzt, für 25 Temperaturzyklen von 94°C (30 Sekunden), 50°C (60 Sekunden), 72°C (60 Sekunden) durchgeführt, wobei die Pfu-DNA-Polymerase, zusätzliche Desoxynucleotidtriphosphate und PCR-Puffer verwendet werden. Das endgültige PCR-Produkt wird mit den Restriktionsenzymen XhoI und BglII gespalten und in pSVL (einem Expressionsvektor, der von Pharmacia, Piscataway, NJ erhalten wurde), das mit XhoI und BamHI gespalten wurde, ligiert, um einen Vektor herzustellen, der die Synthese von Analogon 1 steuern wird. Die XhoI-Stelle des PCR-Produkts wird in die XhoI-Stelle von pSVL ligiert und die BglII-Stelle des PCR-Produkts wird in die BamHI-Stelle von pSVL ligiert. Die XhoI-Stelle wird wieder hergestellt und die BglII- und die BamHI-Stellen werden entfernt. Die Sequenzen der codierenden Regionen (das heißt, zwischen der XbaI-Stelle und der KpnI-Stelle, vergleiche **Fig. 6**) von mehreren Konstrukten werden bestimmt, bis eine gefunden wird, die ein Protein codiert, das die gewünschte, in **Fig. 6** dargestellte Aminosäuresequenz besitzt. Dies wird durchgeführt, um mögliche Fehler auszuschließen, die als ein Ergebnis der PCR oder einer anderen Manipulation der DNA hervorgerufen werden könnten, und ist eine Standardvorsichtsmaßnahme, um sicherzustellen, dass die gewünschte Sequenz erhalten wird. Es wird erwartet, dass dem exprimierten Protein die Aminosäurereste MEMFQGLLLLLLLSMGGTWA fehlen, die der Teil der Signalsequenz sind, die in der β-Untereinheit von hCG gefunden wird und die von der Zelle während der Proteinsynthese entfernt wird. Dieser Vektor wird in COS-7-Zellen exprimiert, wie beschrieben wurde (64), und das Protein, das in das Medium entlassen wird, wird auf seine Fähigkeit getestet, die Bindung des mit radioaktivem Iod markierten hCG an die monoclonalen Antikörper oder an die Antiseren, die gegen hCG hergestellt wurden, zu hemmen. Das Protein, das von den COS-7-Zellen hergestellt wird, wird mit dem radioaktiven Iod markierten hCG um die Bindung an einen oder mehrere der nachfolgenden Antikörper konkurrieren: B101 (erhalten von der Columbia University), B105 (erhalten von der Columbia University), B107 (erhalten von der Columbia University), B109 (erhalten von der Columbia University), A201 (erhalten von der Columbia University), HCU061 (erhalten von Hybritech), HCZ107 (erhalten von Hybritech) oder HCO514 (erhalten von Hybritech), ZMCG18 (erhalten von Pierce), ZMCG13 (erhalten von Pierce) oder ZMCG7 (erhalten von Pierce) oder 518B7 (erhalten von Dr. Janet Roser, University of California in Davis). Das Protein, das in das Medium entlassen wird, wird mit dem radioaktiv markierten hCG um die Bindung an die Rezeptoren der Corpora lutea konkurrieren, wie von Campbell, Dean-Emig und Moyle beschrieben wurde (64). Es wird erwartet, dass die Erzeugung von Testosteron in einer Leydig-Zellanalyse, die ähnlich zu der durchgeführt wird, die von Moyle et al. (37) beschrieben wurde, stimuliert wird und dass die Ovulation in weiblichen Tieren stimuliert wird und dass die Erzeugung von Testosteron in männlichen Säugern stimuliert wird. Es wird ebenfalls erwartet, dass dieses Analogon ein guter Ausgangspunkt für die Verwendung in einem Impfstoff zur Empfängnisverhütung ist, wobei der in Beispiel 8 dargestellte Matrizen-Ansatz verwendet wird. Dieses Analogon wird in Tabelle 1 als Analogon #1 gezeigt und enthält eine Linker-Sequenz GSGSGSGS. Dieser Linker kann modifiziert werden durch Spaltung des Expressionsvektors mit den Endonuclease-Restriktionsenzymen ApaI und Eco47III, dem Verwerfen des kurzen Fragments, der Ligierung einer Kassette einer synthetischen doppelsträngigen DNA mit den gewünschten Aminosäure-Codons, die eine beliebige Anzahl von Glycin- oder Serin-Codons oder Codons anderer Aminosäuren enthalten, in die ApaI/Eco47III-Stelle durch Standardverfahren, der Sequenzierung der Region zwischen ApaI/Eco47III, um zu bestätigen, dass die gewünschten Mutationen erzeugt wurden, und der Expression des Proteins in COS-7-Zellen. Dies kann durchgeführt werden, um die Aktivität des Einzelketten-Gonadotropins zu optimieren. Es wird erwartet, dass das Protein als ein Monomer funktioniert oder dass es sich zusammenlagert, um aktive Homodimere zu erzeugen. Zusätzlich wird erwartet, dass mehrere Kopien des Proteins sich zusammenlagern, um Multimere zu erzeugen.

Beispiel 10

Herstellung und Verwendung von Analogon #2, einem Einzelketten-Gonadotropin mit Lutropin-Aktivität (vergleiche **Fig. 7**).

[0086] Die codierenden Sequenzen für Analogon #2, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, können synthetisiert werden, indem der Blockierungs-Ligierungs-Ansatz verwendet wird (54), oder sie können durch PCR hergestellt werden, indem die Primer #1 und #7 und das in Beispiel 9 und **Fig. 7** als Matrize beschriebene Expressionskonstrukt verwendet werden. Die Sequenz von Primer #7 ist 3'-TGGTGGGGAACTGGAGACTACT-GGGCGCGGGTAGGGCATGG-5', Das endgültige PCR-Produkt wird mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI gespalten und mit dem großen DNA-Fragment ligiert, das durch Spaltung mit XhoI und BamHI des in Beispiel 9 beschriebenen Expressionskonstrukts erhalten wird. Die Sequenzen der codierenden Regionen zwischen der XhoI-Stelle und der BamHI-Stelle von mehreren Konstrukten werden bestimmt, bis eine gefunden wird, die ein Protein codiert, das die in **Fig. 7** beschriebene Aminosäuresequenz besitzt. Dies wird sicherstellen, dass keine Klonierungsartefakte in der Region, die verändert wurde, vorhanden sind. Es wird erwartet, dass dem exprimierten Protein die Aminosäurereste MEMFQGLLLLLLLSMGGTWA fehlen, die der Teil der Signalsequenz sind, der in der β-Untereinheit von hCG gefunden wird, und die von der Zelle während der Pro-

teinsynthese entfernt werden. Der Vektor wird in COS-7-Zellen exprimiert und das Protein, das in das Medium entlassen wird, wird auf seine Fähigkeit getestet, die Bindung des mit radioaktivem Iod markierten hCG an die monoclonalen Antikörper oder an die Antiseren, die gegen hCG hergestellt wurden, zu hemmen. Das Protein, das von den COS-7-Zellen hergestellt wird, wird mit dem mit radioaktiven Iod markierten hCG um die Bindung an einen oder mehrere der nachfolgenden Antikörper konkurrieren: B101 (erhalten von der Columbia University), B105 (erhalten von der Columbia University), B107 (erhalten von der Columbia University), B109 (erhalten von der Columbia University), A201 (erhalten von der Columbia University), HCU061 (erhalten von Hybritech) oder HCO514 (erhalten von Hybritech), ZMCG18 (erhalten von Pierce), ZMCG13 (erhalten von Pierce) oder ZMCG7 (erhalten von Pierce) oder 518B7 (erhalten von Dr. Janet Roser, University of California in Davis). Das Protein, das in das Medium entlassen wird, wird mit dem radioaktiv markierten hCG um die Bindung an die Rezeptoren der Corpora lutea konkurrieren, wie von Campbell, Dean-Emig und Moyle beschrieben wurde (64). Es wird erwartet, dass die Erzeugung von Testosteron in einer Leydig-Zellanalyse, die ähnlich zu der durchgeführt wird, die von Moyle et al. (37) beschrieben wurde, stimuliert wird und dass die Ovulation in weiblichen Tieren stimuliert wird und dass die Erzeugung von Testosteron in männlichen Säugern stimuliert wird. Es wird ebenfalls erwartet, dass dieses Analogon ein guter Ausgangspunkt für die Verwendung in einem Impfstoff zur Empfängnisverhütung ist, wobei der Matrizen-Ansatz verwendet wird, der in Beispiel 8 dargestellt wird. Dieses Analogon wird in Tabelle 1 als Analogon #2 gezeigt und enthält eine Linker-Sequenz GSGSGSGS. Dieser Linker kann modifiziert werden durch Spaltung des Expressionsvektors mit den Endonuclease-Restriktionsenzymen SstII und Eco47III, Verwerfen des kurzen Fragments, Ligierung einer Kassette einer synthetischen doppelsträngigen DNA mit den gewünschten Aminosäure-Codons, die eine beliebige Anzahl von Glycin- oder Serin-Codons oder Codons anderer Aminosäuren enthalten, in die SstII/Eco47III-Stelle durch Standardverfahren, Sequenzierung der Region zwischen SstII/Eco47III, um zu bestätigen, dass die gewünschten Mutationen erzeugt wurden, und Expression des Proteins in COS-7-Zellen. Dies kann durchgeführt werden, um die Aktivität des Einzelketten-Gonadotropins zu optimieren. Es wird erwartet, dass das Protein als ein Monomer funktioniert oder dass es sich zusammenlagert, um aktive Homodimere zu erzeugen. Zusätzlich wird erwartet, dass mehrere Kopien des Proteins sich zusammenlagern, um Multimere zu erzeugen.

Beispiel 11

Herstellung und Verwendung von Analogon #3, einem Einzelketten-Gonadotropin mit Lutropin-Aktivität (vergleiche **Fig. 8**).

[0087] Die codierenden Sequenzen für Analogon #3, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, können synthetisiert werden, indem der beschriebene Blockierungs-Ligierungs-Ansatz verwendet wird (54), oder sie können in der Weise hergestellt werden, die für Analogon #2 in Beispiel 10 beschrieben wird, mit der Ausnahme, dass die Primer #1 und #7 durch die Primer #8 und #9 ersetzt werden und dass die cDNA der β-Untereinheit von hLH als eine Matrize anstelle der cDNA der β-Untereinheit von hCG verwendet wird. Die cDNA der β-Untereinheit von hLH kann durch Sreening einer menschlichen hypophysären Genbank erhalten werden. Die Sequenz des Primers #8 lautet 5'-ATGAAATCGACGGAATCAGACTCGAGCCAAGGAATGGAGATGCTCCAGG GGCTGCT-3' und die Sequenz des Primers #9 lautet 3'-GTGGGGAACTGGACACTGGTGGGGGTTCCTAGGCCATGGCCTAGACCATC G-5' Das endgültige PCR-Produkt wird mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI gespalten und in die XhoI/BamHI-Stellen des Expressionsvektors subkloniert, der wie in Beispiel 9 beschrieben hergestellt wird. Die Sequenzen der codierenden Regionen zwischen der XhoI-Stelle und der BamHI-Stelle von mehreren Konstrukten werden bestimmt, bis eine gefunden wird, die ein Protein codiert, das die Aminosäuresequenz besitzt, die in **Fig. 8** beschrieben wird. Es wird erwartet, dass dem exprimierten Protein die Aminosäurereste MEMLQGLLLLLLLSM- GGAWA fehlen, die der Teil der Signalsequenz sind, der in der β-Untereinheit von hLH gefunden wird, und die von der Zelle während der Proteinsynthese entfernt werden. Der Vektor wird in COS-7-Zellen exprimiert und das Protein, das in das Medium entlassen wird, wird auf seine Fähigkeit getestet, die Bindung des mit radioaktivem Iod markierten hCG an die monoclonalen Antikörper oder an die Antiseren, die gegen hCG hergestellt wurden, zu hemmen. Das Protein, das von den COS-7-Zellen hergestellt wird, wird mit dem mit radioaktiven Iod markierten hCG um die Bindung an einen oder mehrere der nachfolgenden Antikörper konkurrieren: B101 (erhalten von der Columbia University), B105 (erhalten von der Columbia University), A201 (erhalten von der Columbia University), HCU061 (erhalten von Hybritech), ZMCG7 (erhalten von Pierce) oder 518B7 (erhalten von Dr. Janet Roser, University of California in Davis). Das Protein, das in das Medium entlassen wurde, wird mit dem radioaktiv markierten hCG um die Bindung an die Rezeptoren der Corpora lutea konkurrieren, wie von Campbell, Dean-Emig und Moyle beschrieben wurde (64). Es wird erwartet, dass die Erzeugung von Testosteron in einer Leydig-Zellanalyse, die ähnlich zu der durchgeführt wird, die von Moyle et al. (37) beschrieben wurde, stimuliert wird und dass die Ovulation in weiblichen Tieren stimuliert wird und dass die Erzeugung von Testosteron in männlichen Säugern stimuliert wird. Es wird ebenfalls erwartet, dass dieses Analogon ein guter Ausgangspunkt für die Verwendung bei der Entwicklung von Impfstof-

fen zur Verstärkung oder Hemmung der Fruchtbarkeit ist, wobei das vorstehend beschriebene Matrizen-Verfahren verwendet wird. Dieses Analogon wird in Tabelle 1 als Analogon #3 gezeigt und enthält eine Linker-Sequenz GSGSGSGS. Dieser Linker kann modifiziert werden durch Spaltung des Expressionsvektors mit den Endonuclease-Restriktionsenzymen BamHI und Eco47III, Verwerfen des kurzen Fragments, Ligierung einer Kassette einer synthetischen doppelsträngigen DNA mit den gewünschten Aminosäure-Codons, die eine beliebige Anzahl von Glycin- oder Serin-Codons oder Codons anderer Aminosäuren enthalten, in die BamHI/Eco47III-Stelle durch Standardverfahren, Sequenzierung der Region zwischen BamHI/Eco47III, um zu bestätigen, dass die gewünschten Mutationen durchgeführt wurden, und Expression des Proteins in COS-7-Zellen. Dies kann durchgeführt werden, um die Aktivität des Einzelketten-Gonadotropins zu optimieren. Es wird erwartet, dass das Protein als ein Monomer funktioniert oder dass es sich zusammenlagert, um aktive Homodimere zu erzeugen. Zusätzlich wird erwartet, dass mehrere Kopien des Proteins sich zusammenlagern, um Multimere zu erzeugen.

Beispiel 12

Herstellung eines Analogons der α-Untereinheit, dem die Glycosylierungsstellen fehlen (vergleiche **Fig. 9**)

[0088] Es wird erwartet, dass die Analoga 1 bis 3 4 Asparagin-gebundene Oligosaccharide enthalten, da sie 4 Gruppen von Codons für die Sequenz Asparagin-X-Threonin/Serin enthalten, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann. Es wurde gezeigt, dass die Entfernung der Asparagin-gebundenen Oligosaccharide, besonders solche der α-Untereinheit, die Wirkung des Hormons vermindert. Die Asparagin- gebundenen Glycosylierungssignale können von dem Teil der α-Untereinheit des Einzelketten-Gonadotropins unter Verwendung der PCR entfernt werden, wie hierin beschrieben wird. Der PCR-Primer 16, der die Sequenz:
5'-TGCTTCTCTAGAGCATATCCCACTG-CACTAAGGTCCAAGAAGACGATGTT GGTCCAAAAGCAAGT-CACCT-3' besitzt, und der PCR-Primer 17, der die Sequenz:
3'-CAAAGTTTCACCTCGTTGTGTGCCGCACGGTGACGTCATGAACAATAATA GTGTTTAGAATTCCATGG-CCATG-5' besitzt, werden in einer PCR-Reaktion mit einem Vektor, der die Expression von Analogon 1 lenken kann und der in Beispiel 9 und **Fig. 6** beschrieben wurde, verwendet. Nach 25 Zyklen unter den Bedingungen, die in Beispiel 9 beschrieben werden, werden das PCR-Produkt und der Expressionsvektor mit XbaI und KpnI gespalten. Das kleine Fragment, das durch die Spaltung des Vektors hergestellt wird, wird verworfen, und das gespaltenen PCR-Produkt wird an seine Stelle in den Vektor ligiert. Dies stellt einen Expressionsvektor her, der Analogon 11 codiert, ein Analogon, das nur zwei Asn-gebundene Glycosylierungssignale enthält, von dem aber erwartet wird, dass es seine Affinität für Antikörper und Antiseren behält, die an hCG binden. Es wird ebenfalls erwartet, dass es seine Affinität für LH-Rezeptoren behält, wie durch seine Fähigkeit gezeigt wird, mit hCG um die Bindung an Membranen der Corpora lutea von Ratten zu konkurrieren. Es wird jedoch erwartet, dass es eine verminderte Fähigkeit besitzt, eine Signaltransduktion zu induzieren, besonders wenn seine Fähigkeit, die Akkumulation von zyklischem AMP hervorzurufen, getestet wird (37). Es ist möglich, ähnliche Derivate der Analoga 2 und 3 zu erzeugen, in denen die Oligosaccharide von dem Teil des Proteins entfernt werden, der von der α-Untereinheit durch Spaltung jedes der Expressionsvektoren mit BamHI und KpnI, Verwerfen des kleineren Fragments und Ligierung des kleinen, durch Spaltung von Analogon 11 erhaltenen BamHI/KpnI-Fragments abgeleitet wird. Daher würde Analogon 2 zu Analogon 12 und Analogon 3 zu Analogon 13. Es sollte beachtet werden, dass es ebenfalls möglich ist, nur eine der zwei Glycosylierungssignale von dem Teil des Einzelketten-Gonadotropins zu entfernen, der von der α-Untereinheit abgeleitet ist, indem einfach die Sequenzen der Primer 16 und 17 während ihrer Synthese ausgetauscht werden und das Protokoll befolgt wird, das hierin beschrieben wird. Jedes dieser Analoga würde die gleiche Antikörper- und Rezeptor-Bindung wie sein Vorläufer zeigen. Sie würden eine verminderte Wirkung besitzen und als eine Konsequenz würden sie die Signaltransduktion hemmen. Analoga 11, 12 und 13 würden die Aktivität von LH vermindern und die Fruchtbarkeit stimulieren, wenn sie zu einem frühen Zeitpunkt der follikulären Phase des Menstruationszyklus verabreicht werden. Sie würden die Aktivität von hCG vermindern und Fruchtbarkeit verhindern, wenn sie in zeitlicher Nähe der erwarteten Menstruation verabreicht werden.

Beispiel 13

Herstellung des Analogons 1a, dem Asparagin-gebundene Oligosaccharide fehlen (vergleiche **Fig. 10** und **Fig. 11**).

[0089] Die Wirkung der Gonadotropine ist proportional zu ihrem Gehalt an Kohlenhydraten und während die Analoga 11, 12 und 13 eine niedrige Wirkung besitzen, ist es möglich, ihre Wirkung weiter zu vermindern, indem alle Oligosaccharidketten entfernt werden. Die Asparagin-gebundenen Oligosaccharidketten können von Analogon 11 durch PCR-SOEing (63) entfernt werden, wobei die Primer 1 und 18 in einer Reaktion und die

Primer 2 und 19 in einer zweiten Reaktion verwendet werden. Der Expressionsvektor für das Analogon 11 dient als eine Matrize in beiden Reaktionen. Die Sequenz des Primers #18 lautet 5'-CGGGGTAGGTTCGGTGG-GAC- CGAGACCTCTTCCTCCCGACGGGG-3' und die Sequenz des Primers 19 lautet 3'-GTGGAGAAG-GAGGGCTGGCCCGT-GTGCATCACCGTCAACACCACCATC-5'. Nach 25 Temperaturzyklen bei 94°C (30 Sek.), 55°C (60 Sek.) und 72°C (60 Sek.) wird 1 µl jeder PCR-Reaktion mit dem Primer #5 und zusätzlich mit dem Primer #2, neuem Puffer, Enzym und Desoxynucleotidtriphosphaten gemischt. Nach 25 zusätzlichen Zyklen wird das Reaktionsprodukt mit XhoI und BamHI gespalten und anstelle der ursprünglichen DNA, die zwischen den XhoI/BamHI-Stellen des das Analogon 11 codierenden Vektors gefunden wird, eingefügt. Dies wird dadurch erreicht, dass der Vektor mit XhoI und BamHI gespalten wird, das kleine Fragment verworfen wird und anschließend das große Fragment mit dem XhoI/BamHI gespaltenen PCR-Produkt ligiert wird. Mehrere Klone werden einer DNA-Sequenzierung unterzogen, bis einer erhalten wird, der das Analogon codiert, das in **Fig. 11** dargestellt wird und das Analogon 1a genannt wird. Wenn dieses in COS-7-Zellen exprimiert wird, wird das Protein, das hergestellt wird, von den gleichen Antikörpern und Antiseren wie Analogon 1 erkannt werden. Analogon 1a wird ebenfalls an Lutropin-Rezeptoren binden, aber es wird eine geringere Wirkung als hCG besitzen. Daher wird es nützlich zur Verminderung der Funktion von LH oder hCG sein. Wenn es früh in der follikulären Phase des Menstruationszyklus verabreicht wird, wird Analogon 1a die Androgen-Synthese vermindern. Als eine Folge davon wird die Östradiol-Synthese sinken, die FSH-Spiegel werden steigen und Fruchtbarkeit wird stimuliert. Analogon 1a wird ebenfalls nützlich zur Hemmung der vorzeitigen Luteinsierung des Follikels sein. Wenn es in der Luteal-Phase etwa zu dem Zeitpunkt der erwarteten Menstruation verabreicht wird, wird das Analogon die Wirkung von hCG blockieren und als ein Induktor der Menstruation und ein Inhibitor der Fruchtbarkeit dienen. Analogon 1a wird ebenfalls als eine gute Ausgangsverbindung dienen, um Impfstoffe zu entwerfen, wobei die Matrizen-Strategie verwendet wird, die vorstehend beschrieben wurde.

Beispiel 14

Herstellung anderer Gonadotropine, denen Asparagin-gebundene Oligosaccharide fehlen

[0090] Der codierende Vektor für Analogon 2a wird leicht von dem Analogon 1a und dem Analogon 12 hergestellt. Analogon 1a wird mit KpnI und MstII gespalten und das kleine Fragment wird verworfen. Das große Fragment wird getrennt von dem kleinen Fragment, das durch Spaltung mit KpnI und MstII des codierenden Vektors für Analogon 12. hergestellt wird, ligiert. Analogon 2a wird die gleichen Antikörper und Rezeptoren binden wie Analogon 2. Ihre Fähigkeit, Signaltransduktion zu erzeugen, wird jedoch vermindert sein. Daher werden sie als Inhibitoren dienen. Analogon 2a wird hauptsächlich bei der Blockierung der Bindung der Hormone an LH-Rezeptoren wirksam sein. In Abhängigkeit von dem Zeitpunkt, an dem es verabreicht wird, wird Analogon 2a die Fruchtbarkeit steigern (das heißt, wenn es früh in dem Menstruationszyklus gegeben wird) oder die Fruchtbarkeit hemmen (das heißt, wenn es zeitnah zur Implantation oder der erwarteten Menstruation gegeben wird). In dieser Hinsicht werden die Analoga 1a und 2a ähnliche Aktivitäten besitzen.

[0091] Der codierende Vektor für Analogon 3a kann durch die SOEing-PCR (63) hergestellt werden, in der Analogon 13 als Matrize dient. Die Strategie für den Entwurf der Primer ist ähnlich zu der, die für die Herstellung der Primer beschrieben wurde, die verwendet werden, um den Expressionsvektor für Analogon 1a zu modifizieren. Wenn Analogon 3a in COS-7-Zellen exprimiert wird, werden die Proteine, die hergestellt werden, von den gleichen Antikörpern und Antiseren erkannt werden wie Analogon 3. Analogon 3a wird für die Hemmung der Aktivität der Hormone, die an LH-Rezeptoren binden, nützlich sein. Daher wird es die Fruchtbarkeit stimulieren, wenn es früh in der follikulären Phase gegeben wird. Analogon 3a wird als ein Ausgangsmolekül für die Entwicklung des Impfstoffes nützlich sein, der verwendet werden soll, um die Fruchtbarkeit zu erhöhen, wobei die Matrizen-Strategie und Antikörper verwendet werden, die in der Lage sind, die Aktivität von LH teilweise zu neutralisieren. Analogon 3a wird außerdem als ein Startmolekül für die Entwicklung eines Impfstoffes zur Verhinderung der Fruchtbarkeit nützlich sein, wobei die Matrizen-Strategie und Antikörper verwendet werden, die in der Lage sind, die LH-Aktivität zu neutralisieren.

Beispiel 15

Typisches Verfahren zum Einbringen einer Glycosylierungsstelle in ein Gonadotropin

[0092] Aufgrund des positiven Einflusses der Oligosaccharidreste auf die Stabilität der Hormone im Kreislauf, ist es häufig nützlich, an die Proteine zusätzliche Oligosaccharidketten anzuheften. Die Zugabe der Oligosaccharide kann ebenfalls verwendet werden, um unerwünschte Interaktionen mit Antikörpern oder Rezeptoren zu verhindern. Die Oberflächen des Proteins, die nicht mit Rezeptoren interagieren, sind nützliche Stellen, um Oligosaccharidketten einzufügen, die dazu verwendet werden sollen, die Hormonfunktion zu stimulieren. Dies

kann eine wertvolle Wirkung bei der Modulation der Aktivitäten von Einzelketten-Glycoprotein-Hormonen oder bei der Modulation der Aktivitäten der α,β-heterodimeren Glycoprotein-Hormone haben. Zum Beispiel wird das Einfügen eines Glycosylierungssignals an den Resten 71-73 der β-Untereinheit von FSH, um ein Asparagin gebundenes Oligosaccharid am Rest 71 zu erzeugen, zu einem Hormon führen, das eine höhere Aktivität besitzt. Umgekehrt wird das Einbringen eines Glycosylierungsrests in dieser Region des Proteins, nachdem die anderen Glycosylierungen entfernt wurden, seine hemmende Aktivität steigern. Verfahren zum Ausführen der Mutagenese sind auf dem Fachgebiet Standard und variieren von der vollständigen Synthese der codierenden Sequenzen durch Blockierungs-Ligierung von synthetischen Oligonucleotiden (54) bis zur SOEing-PCR (63). Mehrere Beispiele der Mutagenese mittels der SOEing-PCR wurden bereits gegeben.

Beispiel 16

Verwendung von anderen Sequenzen als solchen, die von menschlichen Untereinheiten abgeleitet wurden

[0093] Die Analoga 1-3 und insbesondere die Analoga 1a-3a werden als nützliche Ausgangsverbindungen für eine Matrizen-gerichtete Impfstoffentwicklung dienen. Für die Entwicklung von Hormon-spezifischen Impfstoffen zur Verwendung am Menschen ist es nützlich, Analoga herzustellen, die ähnlich zu denen sind, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, mit einer nichtmenschlichen α-Untereinheit anstelle der menschlichen α-Untereinheit. Dies ist so, weil die Rinder-α-Untereinheit die Proteine unähnlicher zu den menschlichen Hormonen macht als die Analoga, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. Der Ansatz zum Entwerfen von Einzelketten-Glycoprotein-Hormonen ist ähnlich zu dem in den Beispielen 12-21 aufgelisteten mit der Ausnahme, das die codierenden Sequenzen für die nichtmenschlichen α-Untereinheiten die dargestellten Sequenzen der menschlichen α-Untereinheiten ersetzen. Die Glycosylierungssignale können auf ähnliche Weise durch Verändern der Codons für Asparagin oder Serin oder Threonin oder durch Einfügen eines Prolins zwischen dem Asparagin und Serin oder Threonin entfernt werden.

[0094] Wenn die Matrizen-Strategie verwendet wird, um Immunogene zu entwerten, ist es häufig wünschenswert, zusätzlich mit einem nichtmenschlichen Molekül zu starten, das nur wenig oder keine Affinität für die Matrize besitzt, die bei der positiven Selektion verwendet wird, und Reste einzufügen, die zu einer Selektion führen werden. Diese Analoga können durch Ersetzen der Sequenzen der β-Untereinheit von FSH, LH oder TSH von nichtmenschlichen Quellen für die Sequenz des menschlichen CG, die in den Beispielen 9-15 und in Tabelle 1 dargestellt wurde, hergestellt werden.

Tabelle 1

Strukturen der Einzelketten-Gonadotropine

Analogon	Zusammensetzung
1	n-hCGβ(1-145)-Linker-humanα(1-92)-c
2	n-hCGβ(1-114)-Linker-humanα(1-92)-c
3	n-hLHβ(1-114)-Linker-humanα(1-92)-c
1a	n-hCGβ(1-145)[N13X,N30X]-Linker-humanα(1-92)[N52X,N78X]-c
2a	n-hCGβ(1-114)[N13X,N30X]-Linker-humanα(1-92)[N52X,N78X]-c
3a	n-hLHβ(1-114)[N30X]-Linker-humanα(1-92)[N52X,N78X]-c

Definitionen der Buchstaben und Sequenzen in Tabelle 1

„n-" bezieht sich auf das N-Ende des Proteins
„-c" bezieht sich auf das C-Ende des Proteins
„hCGβ(1-145)" bezieht sich auf die Reste 1-145 der Aminosäuresequenz der β-Untereinheit von hCG:

SKEPLRPRCRPINATLAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCPTMTRVLQGVLPALP
QVVCNYRDVRFESIRLPGCPRGVNPVVSYAVALSCQCALCRRSTTDCGGPK
DHPLTCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

"CGβ(1-114)" bezieht sich auf die Reste 1-114 der Aminosauresequenz der β-Untereinheit von hCG:

SKEPLRPRCRPINATLAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCPTMTRVLQGVLPALP
QVVCNYRDVRFESIRLPGCPRGVNPVVSYAVALSCQCALCRRSTTDCGGPK
DHPLTCDDPR

Definitionen der Buchstaben und Sequenzen in Tabelle 1 (Fortsetzung)

"hLHβ(1-114)"bezieht sich auf die Reste 1-114 der Aminosäuresequenz der β-Untereinheit von hLH:

SREPLRPWCHPINAILAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCPTMMRVLQAVLPPLP
QVVCTYRDVRFESIRLPGCPRGVDPVVSFPVALSCRCGPCRRSTSDCGGPKD
HPLTCDHPQ

„N13X" bezieht sich auf die Substitution von Glutamin oder von einer anderen Aminosäure für den Rest Asparagin 13 der β-Untereinheit und Analoga
„N30X" bezieht sich auf die Substitution von Glutamin oder von einer anderen Aminosäure für den Rest Asparagin 30 der β-Untereinheit und Analoga
„N52X" bezieht sich auf die Substitution von Glutamin oder von einer anderen Aminosäure für den Rest Asparagin 52 der menschlichen α-Untereinheit und Analoga
„N78X" bezieht sich auf die Substitution von Glutamin oder von einer anderen Aminosäure für den Rest Asparagin 78 der menschlichen α-Untereinheit und Analoga
„humanα(1-92)" bezieht sich auf die Reste 1-92 der Sequenz der menschlichen α-Untereinheit

APDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKN
VTSESTCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYYHKS

„Linker" bezieht sich auf eine Sequenz, welche die sich wiederholenden Aminosäuren Glycin und Serin wie z.B. GS, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS oder jede andere Aminosäurensequenz enthält, die den Sequenzen der β- und α-Untereinheiten von Einzelketten-Gonadotropin erlaubt, einen Komplex zu bilden, in dem die Teile der α- und β-Untereinheit die Teile der β- und α-Untereinheit des gleichen oder eines anderen Moleküls binden.

Anmerkungen zu Tabelle 1

1. Die Reihenfolge der Komponenten von links nach rechts in der Tabelle ist die Reihenfolge, in der die Komponenten in dem Protein von dem Amino-Terminus zum Carboxy-Terminus auftreten.
2. Aufgrund der hohen Konservierung der Sequenz in allen Gonadotropinen von Wirbeltieren, die durch das Alignment ihrer Cysteinreste ersichtlich ist, können Einzelketten-Gonadotropine durch die Substitution von jedem homologen Rest an die entsprechenden Stellen der β-Untereinheiten von hCG, hLH und hFSH hergestellt werden.
3. Die Sequenz der α-Untereinheiten von Gonadotropin von anderen Wirbeltieren kann das menschliche α(1-92) ersetzen. Dies schließt die Reste 1-96 der Rinder-α-Untereinheit ein, ist aber nicht darauf beschränkt.
4. Wie gezeigt wurde, liegen die Sequenzen, die von der β-Untereinheit abgeleitet wurden, in der Reihenfolge der Komponenten amino-terminal von der α-Untereinheit. Die Reihenfolge der Komponenten in der Tabelle kann so umgekehrt werden, das die Sequenzen der α-Untereinheit amino-terminal von den Sequenzen der β-Untereinheit liegen.
5. Sofern nicht anders angegeben, werden die Aminosäuresequenzen im Standard-Einzelbuchstaben-Code gezeigt.
6. Die codierenden Sequenzen für alle diese Analoga können durch Standardverfahren für rekombinante DNA hergestellt werden, die auf dem Fachgebiet gut bekannt sind. Eines der Verfahren zu ihrer Herstellung wurde von Campbell et al. (54) zur Verfügung gestellt. Sie können in eukaryontischen Zellen durch Verfahren, die auf dem Fachgebiet gut bekannt sind, exprimiert werden, wobei Vektoren verwendet werden, die für die eukaryontische Expression entworfen wurden und die von InVitrogen, San Diego, CA erhältlich sind. Solche, die keine Oligosaccharidketten enthalten, können ebenfalls in E. coli durch Verfahren, die auf dem Fachgebiet gut bekannt sind, hergestellt werden, wobei Vektoren wie z.B. pET-Vektoren, die von Novagen erhalten werden können, verwendet werden.
7. Die Glycosylierungstellen bei Asparagin 13 und/oder 30 der β-Untereinheit von hCG können durch die Substitution des Asparagins, wie gezeigt wurde, und/oder durch die Substitution der Reste 14 und/oder 31 mit einem Prolin und/oder durch die Substitution der Reste 15 und/oder 32 durch jede andere Aminosäure

außer Serin oder Threonin zerstört werden.
8. Die Glycosylierungsstelle bei Asparagin 30 der β-Untereinheit von hLH kann durch die Substitution des Asparagins, wie gezeigt wurde, und/oder durch die Substitution des Rests 31 mit einem Prolin und/oder durch die Substitution des Rests 32 durch jede andere Aminosäure außer Serin oder Threonin zerstört werden.
9. Die Glycosylierungsstellen bei Asparagin 52 und/oder 78 der menschlichen α-Untereinheit können durch die Substitution des Asparagins, wie gezeigt wurde, und/oder durch die Substitution der Reste 53 und/oder 79 mit einem Prolin und/oder durch die Substitution der Reste 54 und/oder 80 durch jede andere Aminosäure außer Serin oder Threonin zerstört werden.
10. Die Glycosylierungsstellen bei Asparagin 56 und/oder 82 der nichtmenschlichen α-Untereinheit können durch die Substitution des Asparagins mit jeder anderen Aminosäure und/oder durch die Substitution der Reste 57 und/oder 83 mit einem Prolin und/oder durch die Substitution der Reste 58 und/oder 84 durch jede andere Aminosäure außer Serin oder Threonin zerstört werden.

Tabelle 2

Eigenschaften und Verwendungen der in Tabelle 1 dargestellten Analoga

Analogon	Aktivität	Verwendung
1	LH	Induktion des Eisprungs; Erhöhung der männlichen Fruchtbarkeit
2	LH	Induktion des Eisprungs; Erhöhung der männlichen Fruchtbarkeit
3	LH	Induktion des Eisprungs; Erhöhung der männlichen Fruchtbarkeit
1a	Anti-LH	*Erleichterung des Eisprungs; Beenden der Schwangerschaft, Verminderung der Sekretion von Androgenen
2a	Anti-LH	*Erleichterung des Eisprungs; Beenden der Schwangerschaft, Verminderung der Sekretion von Androgenen
3a	Anti-LH	*Erleichterung des Eisprungs; Beenden der Schwangerschaft, Verminderung der Sekretion von Androgenen

[0095] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können Säugern, z.B. Tieren oder Menschen, in Mengen verabreicht werden, die wirksam sind, um die gewünschte therapeutische Wirkung zur Verfügung zu stellen. Da die Aktivität der Verbindungen und der Grad der gewünschten therapeutischen Wirkung variieren, wird der Dosierungsspiegel der verwendeten Verbindung ebenfalls variieren. Die tatsächlich verabreichte Dosis wird ebenfalls durch allgemein anerkannte Faktoren wie z.B. das Körpergewicht und die individuelle Hypersensitivität des bestimmten Patienten bestimmt.

[0096] Innerhalb der Beschreibung wurden verschiedene Publikationen zitiert.

1. Pierce JG, Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. Ann Rev Biochem 50:465-495.
2. Yen SSC, Jaffe RB (1986) Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. W.B.Saunders, Philadelphia.
3. Moyle WR (1980) Biochemistry of gonadotropin receptors, In: Oxford Reviews of Reproductive Biology Bd. 2, Hrsg. Finn CA. Oxford University Press, New York, S. 123-204.
4. Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH, Jr. (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. Endocr Rev 5:76-127.
5. Hodgen GD, Itskovitz J (1988) Recognition and maintenance of pregnancy. In: The physiology of reproduction, Hrsg. Knobil E, Neill JD. Raven Press, New York, S. 1995-2021.
6. DiZerega GS, Hodgen GD (1981) Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. Endocr Rev 2:27-49.
7. Vaishnav MY, Moudgal NR (1991) Effect of specific FSH or LH deprivation on testicular function of the adult rat. Indian J Biochem Biophys 28:513-520.
8. Aravindan GR, Ravindranath N, Moudgal NR (1991) Use of DNA Flowcytometry in assessing gonadotropin regulation of spermatogenesis in monkeys. In: Perspectives in Primate Reproductive Biology, Hrsg. Moudgal NR, Yoshinaga K, Rao AJ, Adiga PR. Wiley Eastern Limited, New Delhi, S. 189-199.
9. Steinberger E (1971) Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiol Rev 51:1-22.
10. Moudgal NR, Macdonald GJ, Greep RO (1972) Role of endogenous primate LH in maintaining corpus lu-

teum function of the monkey. J Clin Endocrinol Metab 35:113-116.
11. Moudgal NR (1976) Passive immunization with antigonadotropin antisera as a method of menstrual regulation in the primate. In: Immunization with hormones in reproduction research, Hrsg. Nieschlag E. North-Holland, Amsterdam, S. 233.
12. Moudgal NR, Sairam MR, Mahoney J (1985) On the immunogenicity of the beta subunit of ovine luteinizing hormone (oLH beta) and equine chorionic gonadotropin (eCG) in the chimpanzee (Pan troglodytes): effect of antiserum on monkey cycle and early pregnancy. Am J Reprod Immunol Microbiol 8:120-124.
13. Moudgal NR, Macdonald GJ, Greep RO (1971) Effects of HCG antiserum on ovulation and corpus lutem formation in the monkey (Macaca fascicularis). J Clin Endocrinol Metab 32:579-581.
14. Stevens VC (1990) Birth control vaccines and immunological approaches to the therapy of noninfectious diseases. Inf Dis Clin North Am 4:343-354.
15. Dunbar BS, Lo C, Powell J, Stevens VC (1989) Use of a synthetic peptide adjuvant for the immunization of baboons with denatured and deglycosylated pig zona pellucida glycoproteins. Fertil Steril 52:311-318.
16. Stevens VC (1986) Use of synthetic peptides as immunogens for developing a vaccine against human chorionic gonadotropin. Ciba Found Symp 119:200-225.
17. Moyle WR, Pressey A, Dean Emig D, Anderson DM, Demeter M, Lustbader J, Ehrlich P (1987) Detection of conformational changes in human chorionic gonadotropin upon binding to rat gonadal receptors. J Biol Chem 262:16920-16926.
18. Singh O, Rao LV, Gaur A, Sharma NC, Alam A, Talwar GP (1989) Antibody response and characteristics of antibodies in women immunized with three contraceptive vaccines inducing antibodies against human chorionic gonadotropin. Fertil Steril 52:739-744.
19. Kumar S, Talwar GP, Biswas DK (1992) Necrosis and inhibition of growth of human lung tumor by anti-α-human chorionic gonadotropin antibody. JNCI 84:42-47.
20. Gaur A, Arunan K, Singh O, Talwar GP (1990) Bypass by an alternate 'carrier' of acquired unresponsiveness to hCG upon repeated immunization with tetanus-conjugated vaccine. Int Immunol 2:151-155.
21. Hojo H, Ryan RJ (1985) Monoclonal antibodies against human follicle-stimulating hormone. Endocrinology 117:2428-2434.
22. Moyle WR, Ehrlich PH, Canfield RE (1982) Use of monoclonal antibodies to hCG subunits to examine the orientation of hCG in the hormonereceptar complex. Proc Natl Acad Sci USA 79:2245-2249.
23. Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO, Vutyavanich T (1987) Structure-function relationships of gonadotropins. Recent Prog Horm Res 43:383-429.
24. Keutmann HT, Charlesworth MC, Mason KA, Ostrea T, Johnson L, Ryan RJ (1987) A reeceptor-binding region in human choriogonadotropin/lutropin beta subunit. Proc Natl Acad Sci USA 84:2038-2042.
25. Moyle WR, Dean Emig DM, Lustbader JV, Keutmann HT (1988) Identification of an epitope on the β-subunit of human chorionic gonadotropin (hCG) near the receptor binding site. ICSU Short Rep 8:116.
26. Moyle WR, Matzuk MM, Campbell RK, Cogliani E, Dean Emig DM, Krichevsky A, Barnett RW, Boime I (1990) Localisation of residues that confer antibody binding specificity using human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone beta subunit chimeras and mutants. J Biol Chem 265:8511-8518.
27. Krichevsky A, Birken S, O'Connor J, Bikel K, Schlatterer J, Yi C, Agosto G, Canfield R (1991) Development and characterization of a new, highly specific antibody to the human chorionic gonadotropin-beta fragment. Endocrinology 128:1255-1264.
28. Ehrlich PH, Moustafa ZA, Krichevsky A, Birken S, Armstrong EG, Canfield RE (1985) Characterization and relative orientation of epitopes for monoclonal antibodies and antisera to human chorionic gonadotropin. Am J Reprod Immunol Microbiol 8:48-54.
29. Matteri RL, Roser JF, Baldwin DM, Lipovetsky V, Papkoff H (1987) Characterization of a monoclonal antibody which detects luteinizing hormones from diverse mammalian species. Domest Anim Endocrinol 4:157-165.
30. Ehrlich PH, Moyle WR, Canfield RE (1983) Monoclonal antibodies to gonadotropin subunits. Methods Enzymol 50:638-655.
31. Moyle WR, Anderson DM, Macdonald GJ, Armstrong EG (1988) Bioimmunoassay (BIA): A sandwich immunoassay scheme employing monoclonal antibodies and hormone receptors to quantify anaytes. J Receptor Res 8:419-436.
32. Fiedler R, Verbitskii MS (1990) Monoclonal antibodies to human charionic gonadotropin and certain human and animal hormones of the adenohypophysis. Biomedical Science 1:251-255.
33. Winter G, Milstein C (1991) Man-made antibodies. Nature 349:293-299.
34. Bass S, Greene R, Wells JA (1990) Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. Proteins 8:309-314.
35. Barrett RW, Cwirla SE, Ackerman MS, Olson AM, Peters EA, Dower WJ (1992) Selective enrichment and characterization of high affinity ligands from collections of random peptides on filamentous phage. Analytical Biochemistry 204:357-364.

36. Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lerner RA (1992) Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. 1989 Biotechnology 24:517-523.
37. Moyle WR, Bahl OP, Marz L (1975) Role of the carbohydrate of human choriogonadotropin in the mechanism of hormone action. J Biol Chem 250:9163-9169.
38. Lesk AM, Tramontano A (1992) Antibody structure and structural predictions useful in guiding antibody engineering. In: Antibody engineering: a practical guide, Hrsg. Borrebaeck CAK W.H.Freeman and Co., New York, S. 1-38.
39. Cheetham JC (1992) Engineering antibody affinity. In: Antibody engineering: a practical guide, Hrsg. Borrebaeck CAK. W.H.Freeman and Co., New York, S. 39-68.
40. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant regions. Proc Natl Acad Sci USA 81:6851-6855.
41. Newman R, Alberts J, Anderson D, Carner K, Heard C, Norton F, Raab R, Reff M, Shuey S, Hanna N (1992) "Primitization" of recombinant antibodies for immunotherapy of human diseases: a mccaque/human chimeric antibody against human CD4. Biotechnology 10:1455-1460.
42. Danielsson L, Borrebaeck CAK (1992) Amplification of rearranged Ig variable region DNA from single cells. In: Antibody engineering: a practical guide, Hrsg. Borrebaeck CAK. W.H.Freeman and Co., New York, S. 89-102.
43. Cruz RI, Anderson DM, Armstrong EG, Moyle WR (1987) Nonreceptor binding of human chorionic gonadotropin (hCG): detection of hCG or a related molecule bound to endometrial tissue during pregnancy using labeled monoclonal antibodies that bind to exposed epitopes on the hormone. J Clin Endocrinol Metab 64:433-440.
44. Moyle WR, Anderson DM, Macdonald GJ, Armstrong EG (1988) Bioimmunoassay (BIA): a sandwich immunoassay scheme employing monoclonal antibodies and hormone receptors to quantify analytes. J Recept Res 8:419-436.
45. McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosemblit N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH (1989) Lutropin-chriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. Science 245:494-499.
46. Jia X, Oikawa M, Bo M, Tanaka T, Ny T, Boime I, Hsueh AJW (1991) Expression of human luteinizing hormone (LH) receptor: Interaction with LH and chorionic gonadotropin from human but not equine, rat, and ovine species. Mol Endocrinol 5:759-768.
47. Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Vu Hai Luu Thi MT, Jolivet A, Guiochon Mantel A, Sar S, Jallal B, Garnier J, et al (1989) Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. Science 245:525-528.
48. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Sspring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
49. Kriegler M (1990) Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual. Stackton Press, New York.
50. Cosowsky LN, Campbell RK, Papkoff HR, Moyle WR, Macdonald GJ (1991) Use of hormone chimeras to identify the binding site for a monoclonal antibody which binds to a highly conserved site on mammalian LH and LH receptor complexes. Biol Reprod 44, Supplement #1:70.
51. Stevens VC (1990) Birth control vaccines and immunological approaches to the therapy of noninfections diseases. Infect Dis Clin North Am 4:343-354.
52. Jones WR, Bradley J, Judd SJ, Denholm EH, Ing RM, Mueller UW, Powell J, Griffin PD, Stevens VC (1988) Phase I clinical trial of a World Health Organisation birth control vaccine. Lancet 1:1295-1298.
53. Bidart JM, Bellet DH, Alberici GF, Van Besien F, Bohuon C (1987) The immune response to a synthetic peptide analogous to the 109-145 beta hCG carboxyl-terminus is directed against two major and two minor regions. Mol Immunol 24:339-345.
54. Campbell RK, Erfle H, Barnett RW, Moyle WR (1992) Assembly and expression of a synthetic gene encoding the bovine glycoprotein hormone α-subunit. Mol Cell Endocrinol 83:195-200.
55. Lowman HB, Bass SH, Simpson N, Wells JA (1991) Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. Biochemistry 30:10832-10838.
56. Hoogenboom HR, Winter G (1992) By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearraaged in vitro. J Mol Biol 227:381-388.
57. Fersht A, Winter G (1992) Protein engineering. Trends Biochem Sci 17:292-295.
58. Scott JK, Smith GP (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. Science 249:386-390.
59. Skerra A, Dreher ML, Winter G (1991) Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies: specific detection of antigen binding with a two-membrane system. Anal Biochem 196:151-155.
60. Cohen, C. and Parry, D.A.D. (1990) α-Helical coiled coils and bundles: how to design an α-helical protein. Proteins: structure, function, and genetics 7:1-15.

61. Hu, J.C., Newell, Newell, N.E., Tidor, B., and Sauer, R.T. (1993) Probing the roles of residues at the e and g positions of the GCN4 leucine zipper by combinatorial mutagenesis. Protein Science 2: 1072-1084.
62. King, R.J.B. and Whitehead M.I. (1986) Assessment of the potency or orally administered progestins in women. Fertility and Sterility 46: 1062-1066.
63. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77: 51-59.
64. Campbell RK, Dean Emig DM, Moyle WR (1991) Conversion of human choriogonadotropin into a follitropin by protein engineering. Proc Natl Acad Sci USA 88:760-764.
65. Skaf R, Macdonald GJ, Sheldon RM, Moyle WR (1985) Use of antisera to follicle-stimultulating hormone (FSH) to detect non-FSH factors human serum which modulate rat granulosa cell steroidogenesis. Endocrinology 117:106-113.
66. Reeves J.J., Chang CF., deAvila D.M., Grieger D.M., Johnson H.E. and Robers A.J. (1989) Vaccines against endogenous hormones: a possible future tool in animal production. J. Dairy Sci. 72: 3363-3371

Patentansprüche

1. Verwendung eines nichtneutralisierenden Antikörpers, der die β-Untereinheit des luteinisierenden Hormons bindet und die Aktivität von Glycoprotein-Hormonen auf den luteinisierendes Hormon-Rezeptor reduziert aber nicht ausschaltet, selbst bei einer Konzentration, die alles vorhandene Glycoprotein-Hormon bindet, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Stimulierung der Fertilität in weiblichen Säugern durch Stimulierung der Produktion des follikelstimulierenden Hormons.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Säuger ein Mensch ist und das luteinisierende Hormon menschliches luteinisierendes Hormon ist.

3. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei der Antikörper an die β-Untereinheit des luteinisierenden Hormons bindet, wenn das luteinisierende Hormon an einen Rezeptor für das luteinisierende Hormon gebunden ist.

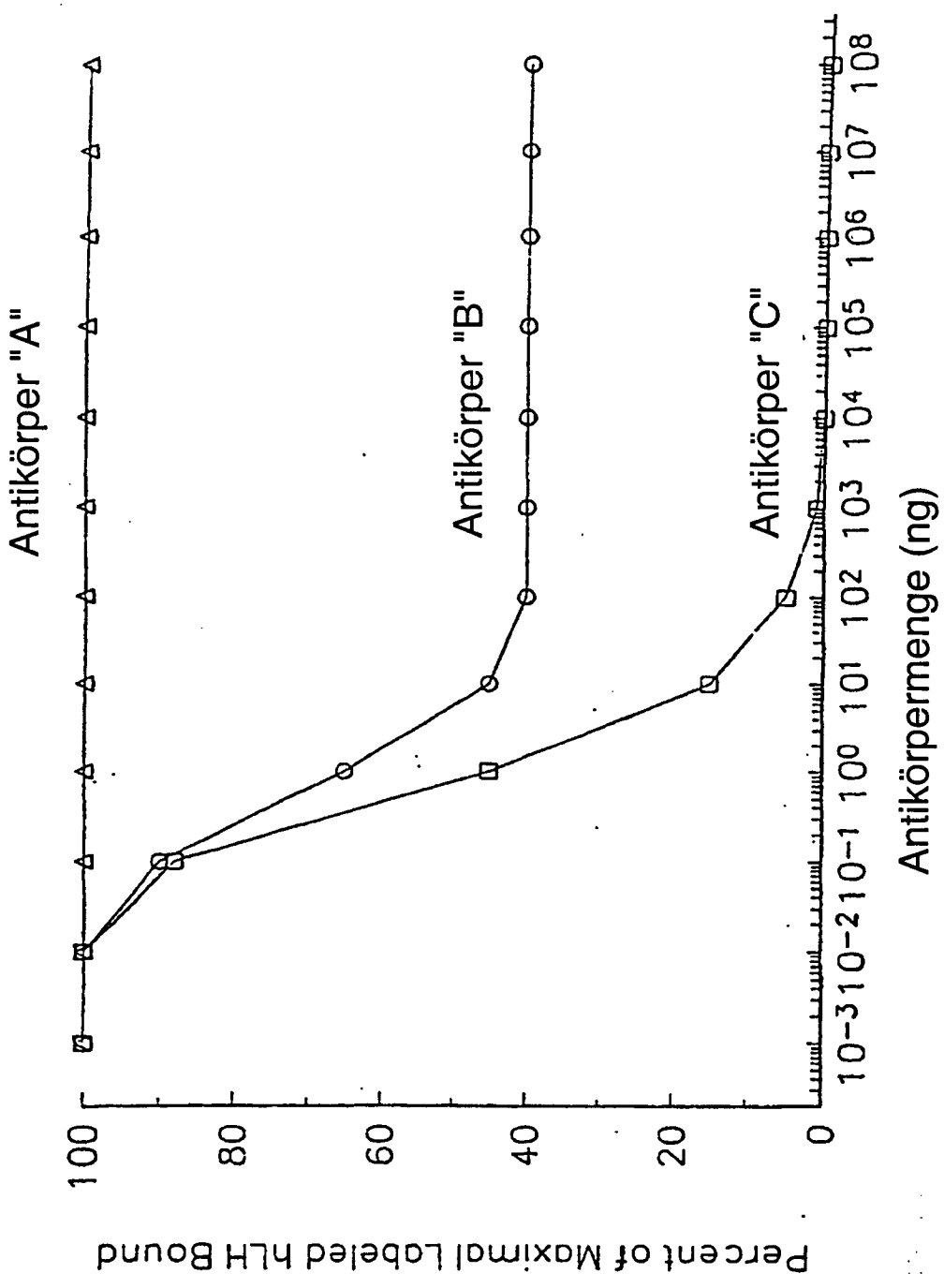
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei der Antikörper einen der Reste zwischen den Positionen 70-80 der β-Untereinheit des luteinisierenden Hormons bindet.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei der Antikörper einen der Reste zwischen den Positionen 74-77 der β-Untereinheit des luteinisierenden Hormons bindet.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Antikörper zur Regulation des Eisprungs in Frauen verwendet wird.

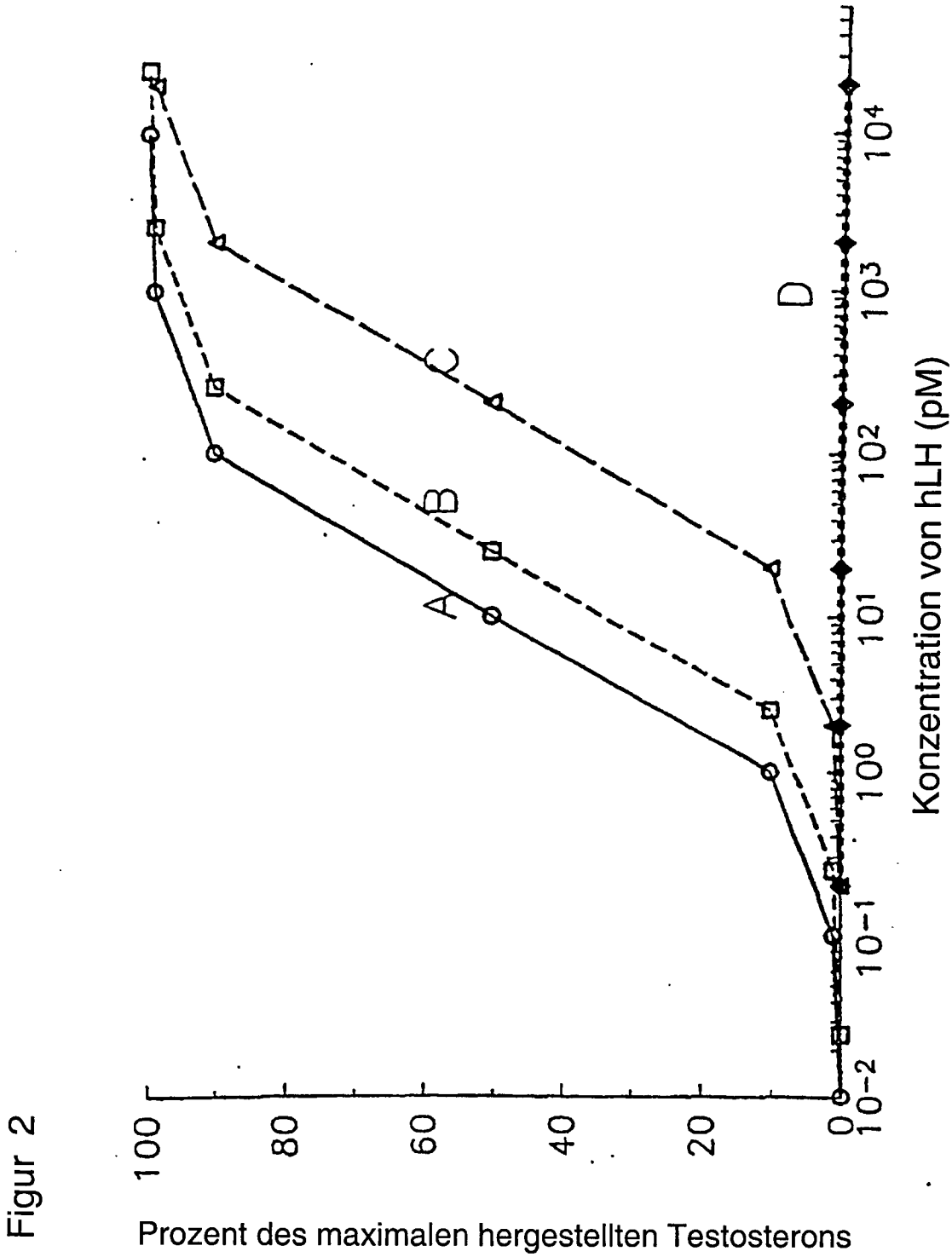
Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

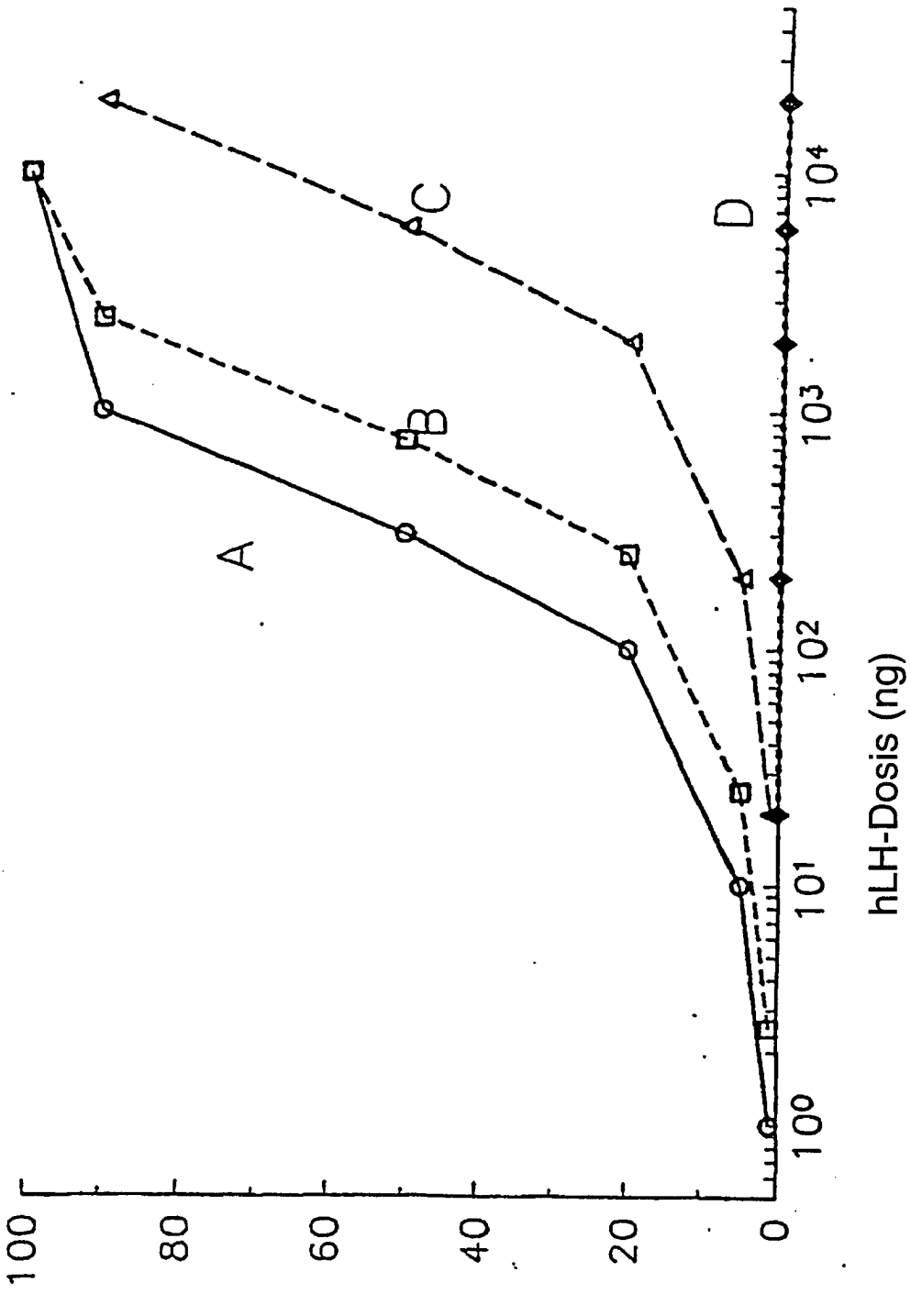


Figur 1

Prozent gebundenes, maximal markiertes hLH

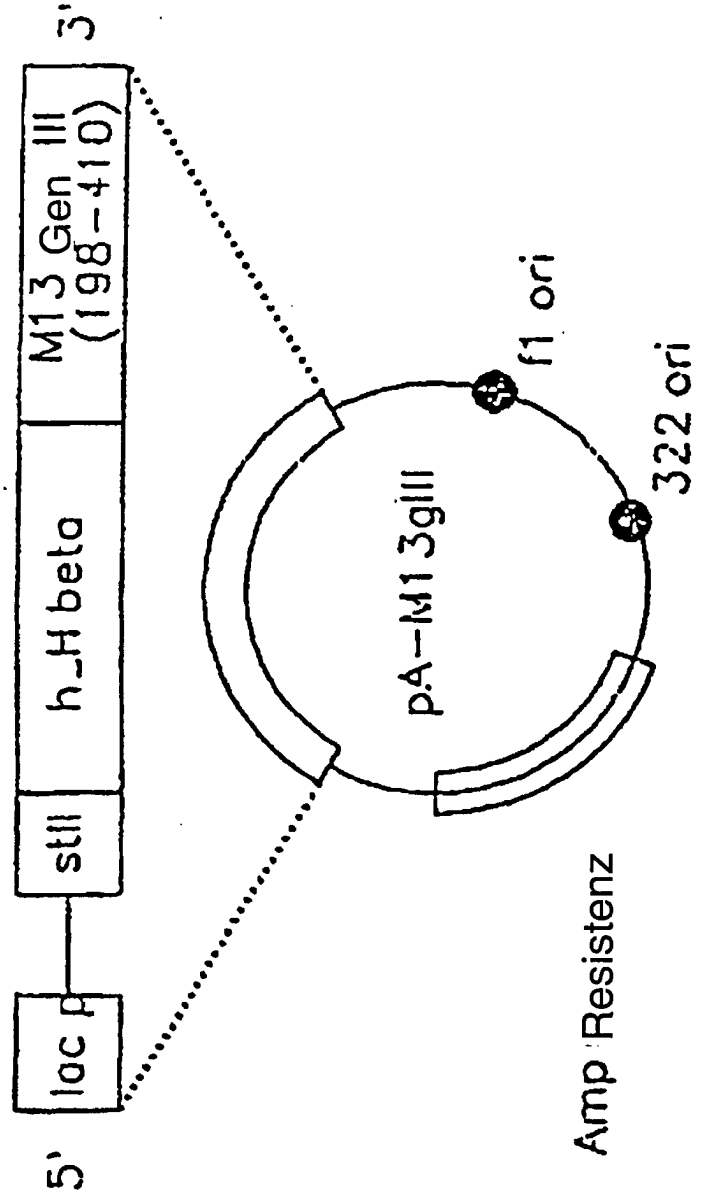

A
B
C
D
100
80
60
40
20
0
10−2
10−1
100
101
102
103
104
Konzentration von hLH (pM)
Prozent des maximalen hergestellten Testosterons

Figur 2

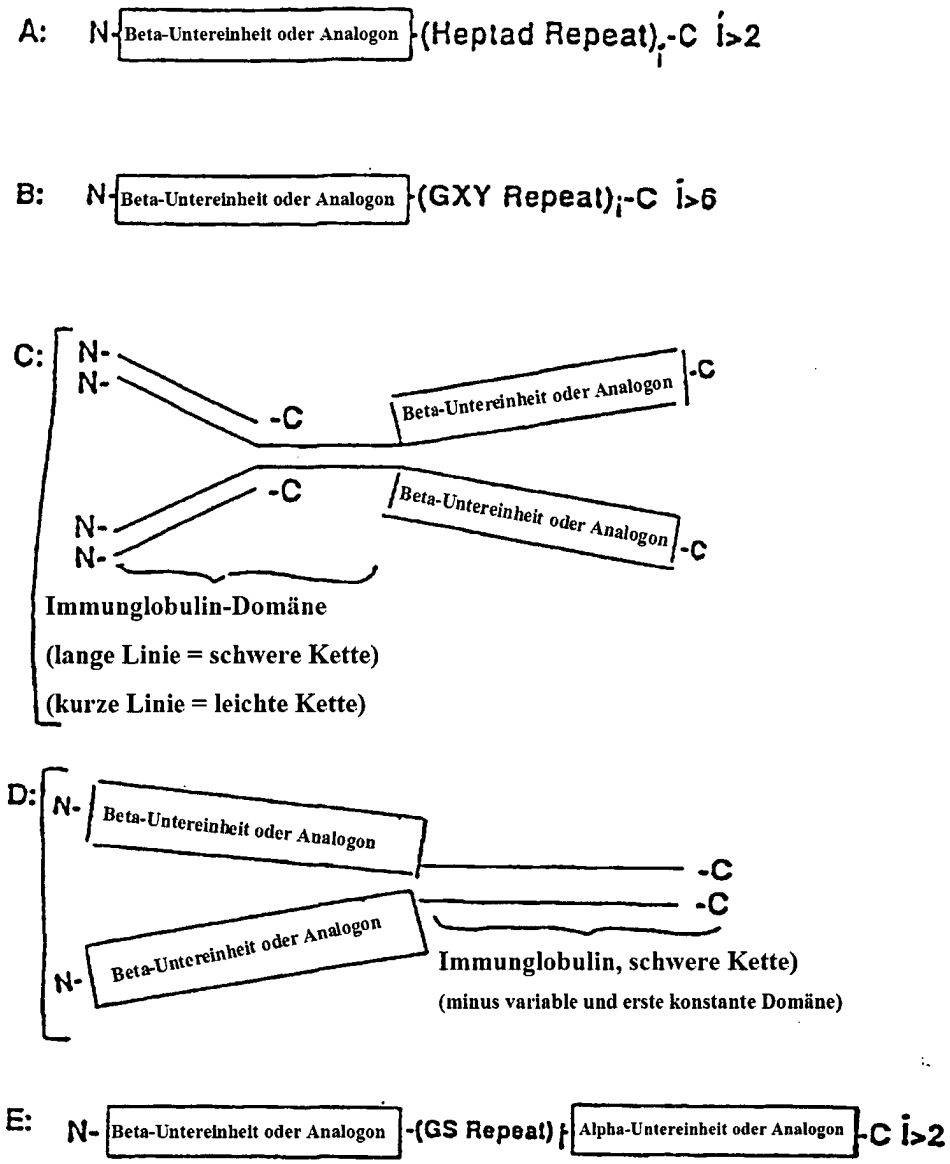

A
B
C
D
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
hLH-Dosis (ng)
Prozent des maximalen Testosterons im Serum

Figur 3

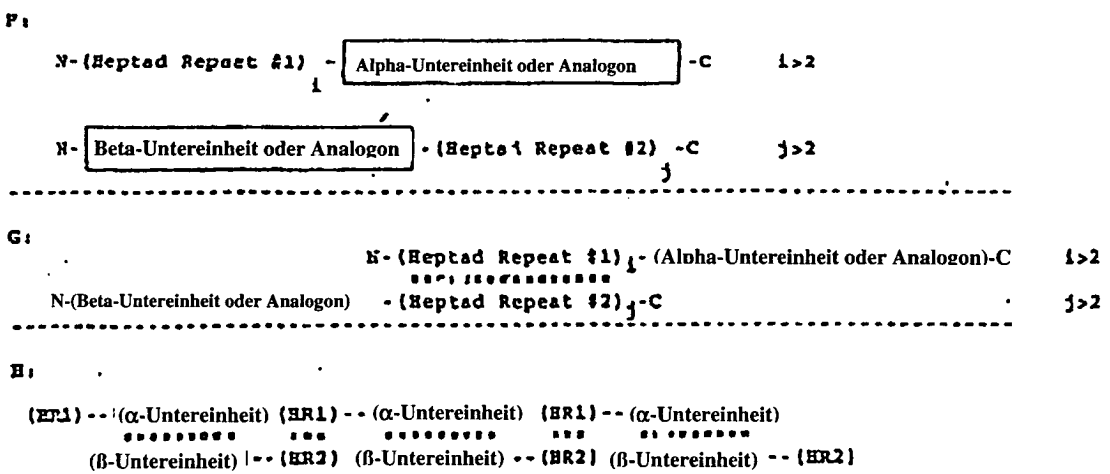
Figur 4


5'
lac P
stII
h_H beta
M13 Gen III
(198–410)
3'
pA–M13gIII
f1 ori
322 ori
Amp Resistenz

FIGUR 5

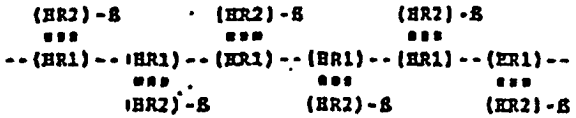

A:
N-
Beta-Untereinheit oder Analogon
-(Heptad Repeat)i-C i>2
B:
N-
Beta-Untereinheit oder Analogon
-(GXY Repeat)i-C i>6
C:
N-
N-
-C
Beta-Untereinheit oder Analogon
-C
-C
Beta-Untereinheit oder Analogon
-C
N-
N-
Immunglobulin-Domäne
(lange Linie = schwere Kette)
(kurze Linie = leichte Kette)
D:
N-
Beta-Untereinheit oder Analogon
-C
-C
Beta-Untereinheit oder Analogon
N-
Immunglobulin, schwere Kette)
(minus variable und erste konstante Domäne)
E:
N-
Beta-Untereinheit oder Analogon
-(GS Repeat)-
Alpha-Untereinheit oder Analogon
-C i>2

Figur 5 (Fortsetzung)



wobei "HR1" sich auf das Heptad-Repeat #1 bezieht, "HR"2" sich auf das Heptad-Repeat #2 bezieht, "α-Untereinheit" sich auf die Alp Untereinheit oder das Analogon bezieht und "ß-Unterheinheit" sich auf die Beta-Untereinheit oder das Analogon bezieht, wie in Erklär dargetellt wurde. Der Komplex kann jede Länge besitzen und wenn Heptad-Repeats verwendet werden, die Trimere erzeugen können, Komplex verzweigen. Das Symbol "*" stellt eine Region der nicht konvalenten Bindung dar. Die Symbole "-" und "- -" beziehen sich n Aminosäure und anderen Strukturen. Sie werden in der Erklärung verwendet, um den Text in den Diagrammen zu trennen. Die Ausdrü beziehen sich auf die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten und können variieren, wie erklärt wird.

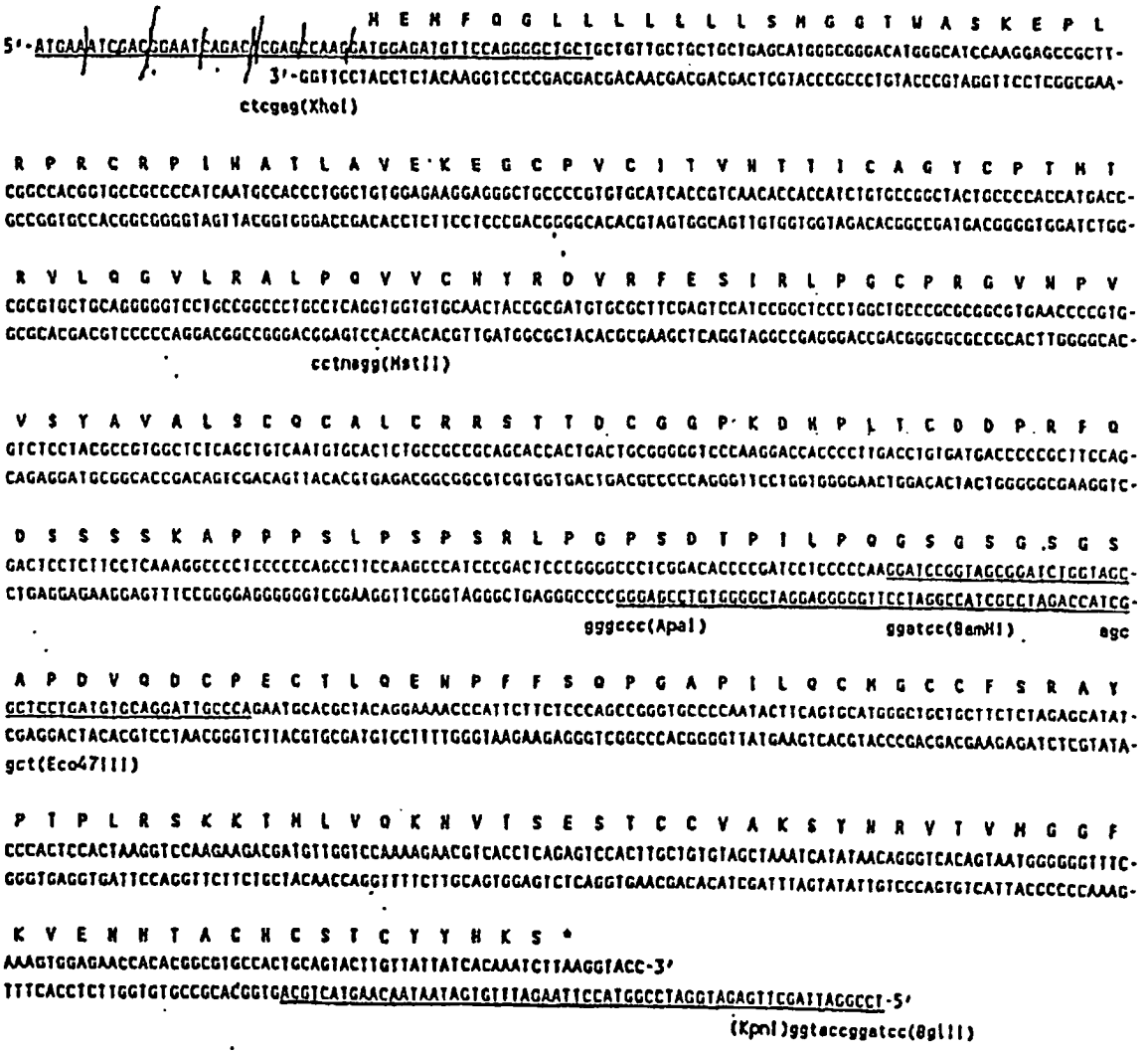
I: Die Verwendung der nachfolgenden Arten von Heptad-Repeats für Komplexe von zuvor bestimmter Länge. Das nachfolgende Beipiel zeigt die Verwendung einer sich wiederholenden Struktur, die multiple Heptad-Repeats von Typ 1 besitzt, die verwendet wird, um einen Komplex mit der ß-Untereinheit von hCG oder dem Analogon (das heißt, wie in "B" erklärt) zu erzeugen, das kovalent an ein Heptad-Repeat von Typ 2 gebunden ist. Der (HR2')-ß-Komplex kann als ein Fusionsprotein hergestellt werden oder das Heptad-Repeat kann chemisch an die ß-Untereinheit oder dem Analogon gebunden werden, wobei jedes chemische, vernetzende Reagens verwendet werden kann. Der Komplex des Heptad-Repeats Typ 1 kann unter Verwendung von Standardverfahren der rekombinanten DNA hergestellt werden, durch die chemische Polymerisierung von Heptaten, wobei Standard-Verfahren der chemischen Synthese verwendet werden, oder durch die Verwendung des Anteils von jedem nattürlich vorkommenden Proteins, von dem bekannt ist, dass es Coiled-Coil-Wechselwirkungen erzeugt. Die Heptad-Repeats können ebefalls Peptide enthalten, die bekante T-Zell-Epitope sind, oder sie können zusammen durch Peptide gebunden werden, von denen bekannt it, dass sie T-Zell-Epitope sind.



DE 695 35 260 T2 2007.08.09

Figur 6

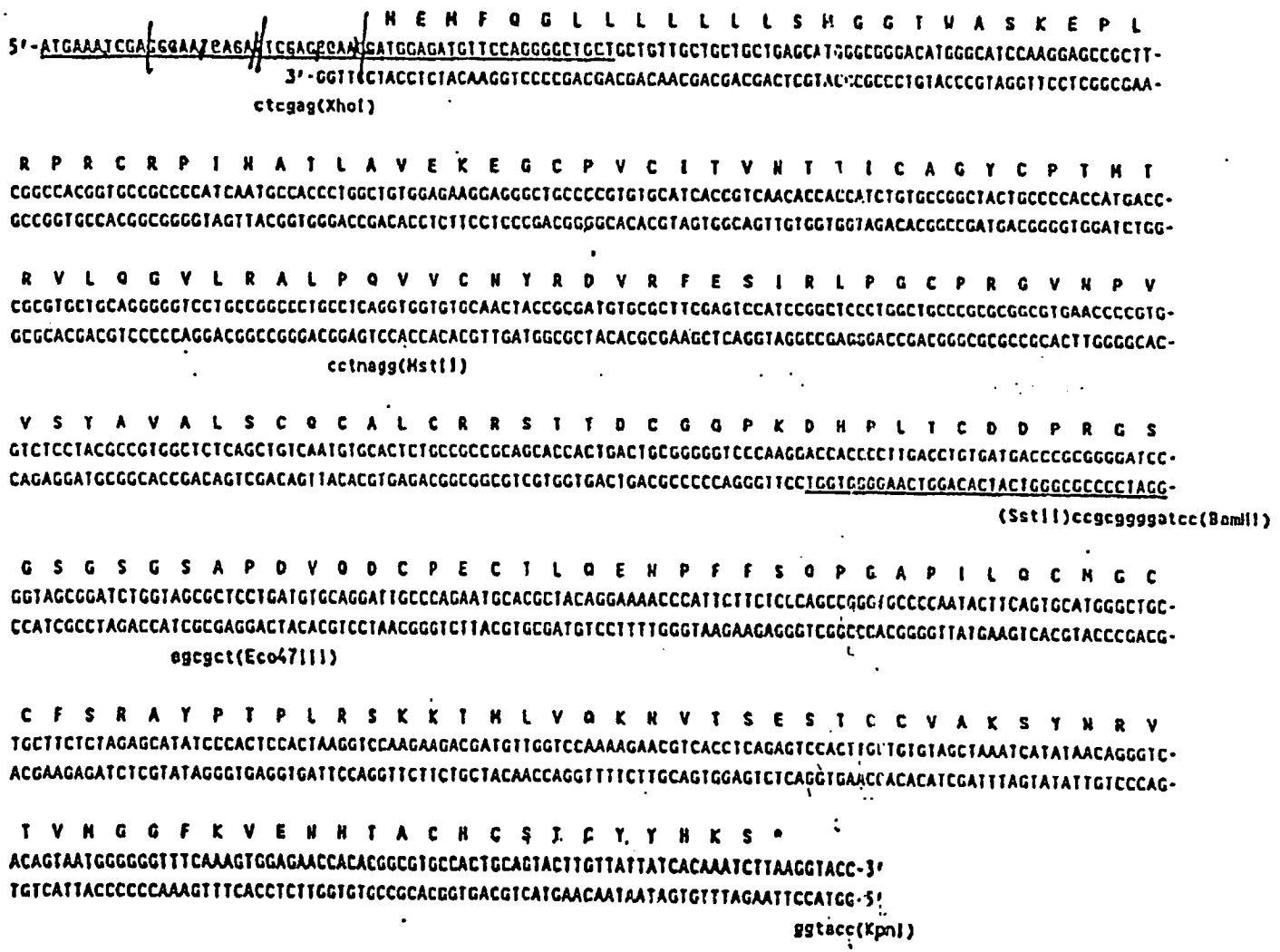
Codierende Sequenz für das Einzelketten-Gonadotropin-Analogon #1 und Primer (unterstrichen)



DE 695 35 260 T2 2007.08.09

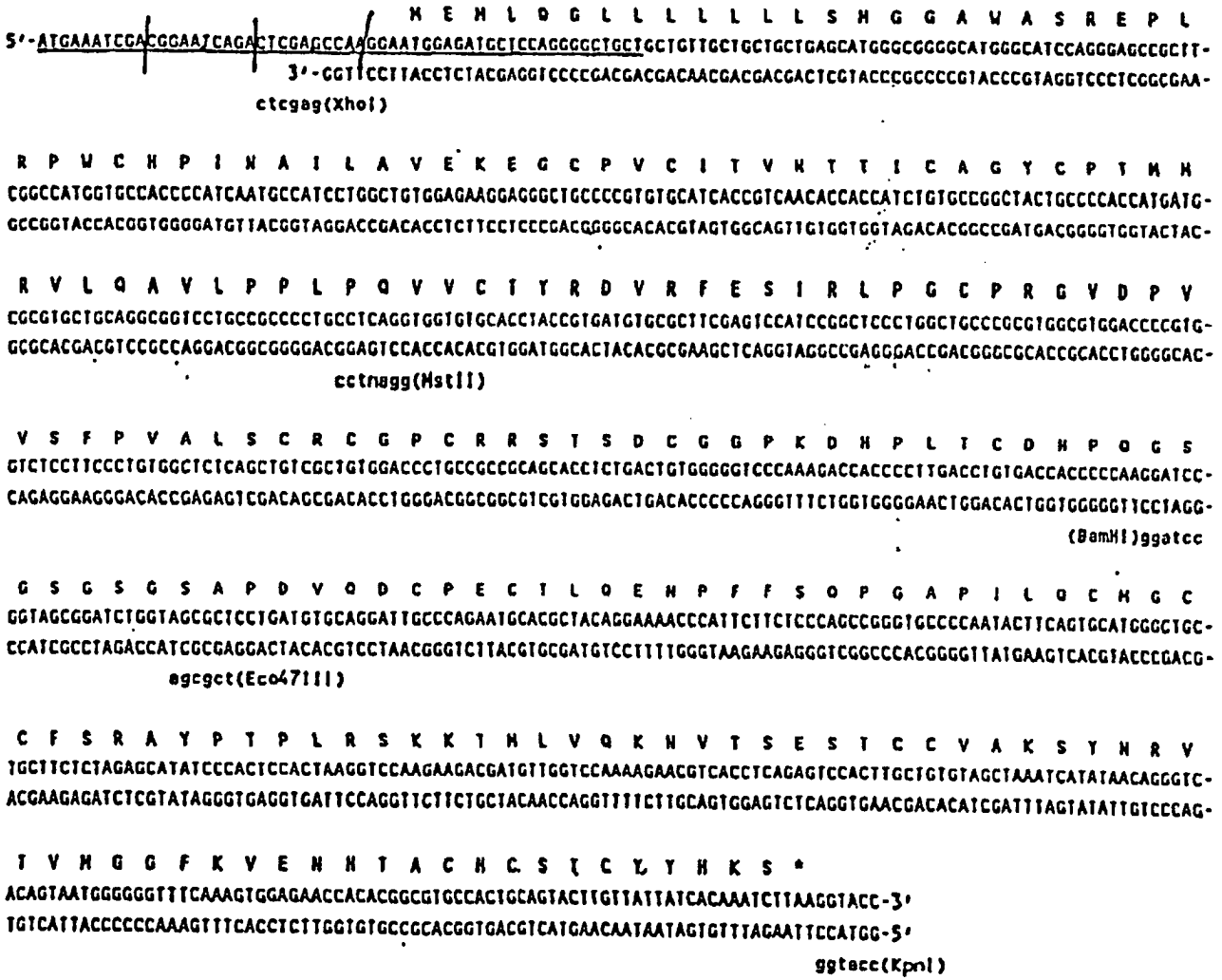
Figur 7

Codierende Sequenz für das Einzelketten-Gonadotropin-Analogon #2 und Primer (unterstrichen)



Figur 8

Codierende Sequenz für das Einzelketten-Gonadotropin-Analogon #3 und Primer (unterstrichen)



DE 695 35 260 T2 2007.08.09

Figur 9
Herstellung der codierenden Region der alpha-Untereinheit, der die Sequenzen des Oligonucleotidsgnals fehlen

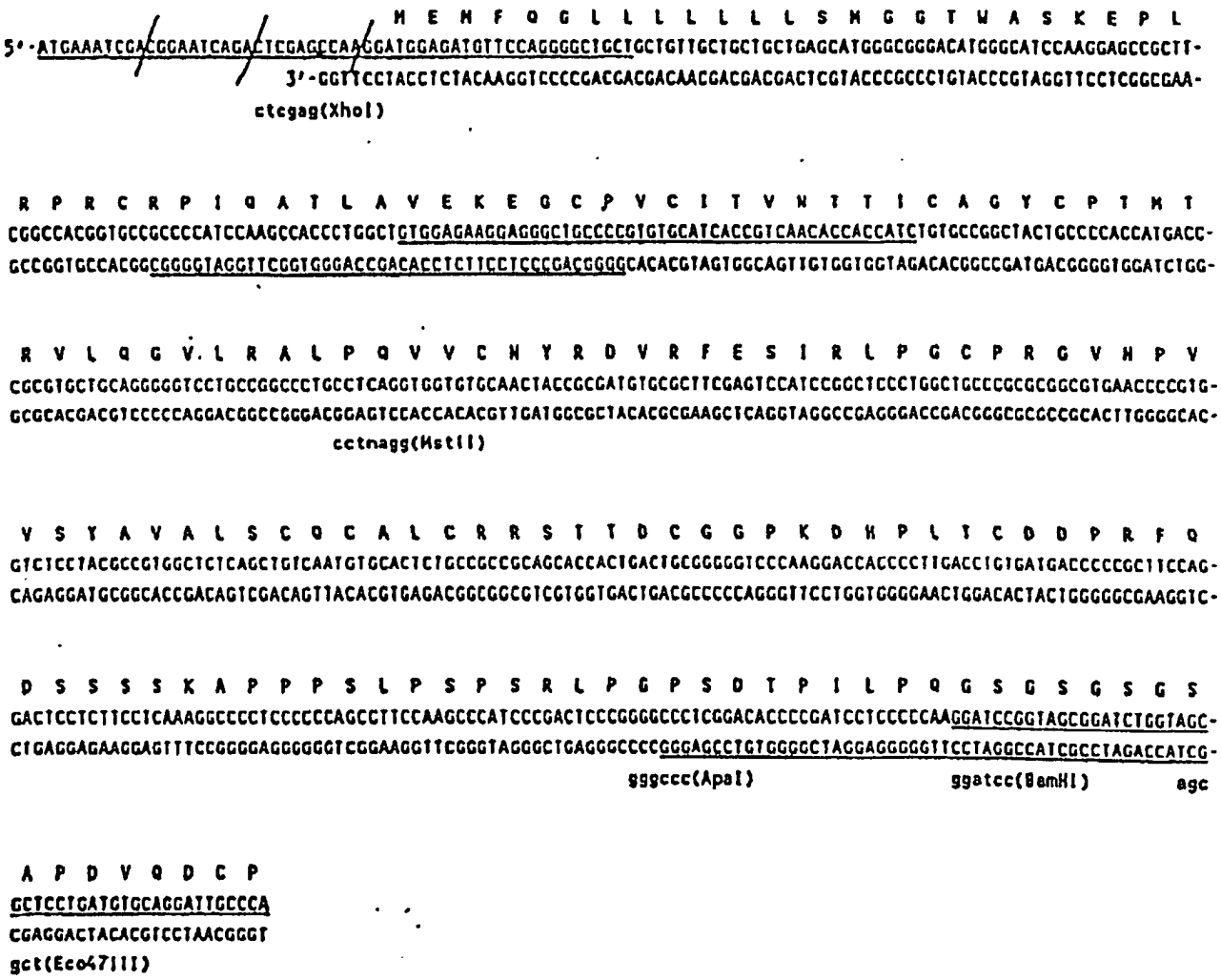
```
 C  G  S  G  S  G  S  G  S  A  P  D  V  Q  D  C  P  E  C  T  L  Q  E  N  P  F  F  S  Q  P  G  A  P  I  L  Q  C
TGCGGATCCGGTAGCGGATCTGGTAGCGCTCCTGATGTGCAGGATTGCCCAGAATGCACGCTACAGGAAAACCCATTCTTCTCCCAGCCGGGTGCCCCAATACTTCAGTGC-
ACGCCTAGGCCATCGCCTAGACCATCGCGAGGACTACACGTCCTAACGGGTCTTACGTGCGATGTCCTTTTGGGTAAGAAGAGGGTCGGCCCACGGGGTTATGAAGTCACG-
        (BamHI)ggatcc   agcgct(Eco47III)

 M  G  C  C  F  S  R  A  Y  P  T  P  L  R  S  K  K  T  M  L  V  Q  K  Q  V  T  S  E  S  T  C  C  Y  A  K  S  Y
ATGGGCTGCTGCTTCTCTAGAGCATATCCCACTCCACTAAGGTCCAAGAAGACGATGTTGGTCCAAAAGCAAGTCACCTCAGAGTCCACTTGCTGTGTAGCTAAATCATAT-
TACCCGACGACGAAGAGATCTCGTATAGGGTGAGGTGATTCCAGGTTCTTCTGCTACAACCAGGTTTTCGTGCAGTGGAGTCTCAGGTGAACGACACATCGATTTAGTATA-
                tctaga(XbaI)

 N  R  V  T  V  M  G  G  F  K  V  E  Q  H  T  A  C  H  C  S  T  C  Y  Y  H  K  S  *
AACAGGGTCACAGTAATGGGGGGTTTCAAAGTGGAGCAACACACGGCGTGCCACTGCAGTACTTGTTATTATCACAAATCTTAAGGTACC-3'
TTGTCCCAGTGTCATTACCCCCCAAAGTTTCACCTCGTTGTGTGCCGCACGGTGACGTCATGAACAATAATAGTGTTTAGAATTCCATGGCCATG-5'
                                                                                  ggtacc(KpnI)
```

Figur 10

Herstellung der codierenden Region der beta-Untereinheit, der die Sequenzen des Oligonucleotidsgnals fehlen



DE 695 35 260 T2 2007.08.09

Figur 11
Codierende Sequenz für das Einzelketten-Gonadotropin-Analog #1a

