

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 333772

(P2001 - 333772A)

(43)公開日 平成13年12月4日 (2001.12.4)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 P 5/10	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		C 0 7 K 14/59	4 B 0 2 4
38/24		16/26	4 B 0 6 4
A 6 1 P 5/10		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/59		1/19	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 46数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 128521(P2000 - 128521)

(22)出願日 平成12年4月27日(2000.4.27)

(31)優先権主張番号 09/558,033

(32)優先日 平成12年4月25日(2000.4.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

特許法第30条第 1 項適用申請有り

(71)出願人 592105745

ワシントン ユニバーシティ

WASHINGTON UNIVERS

ITY

アメリカ合衆国 ミズーリ 63130, セント

ルイス, ワン ブルッキングズ ドライブ(

番地なし)

(72)発明者 アービング ボイム

アメリカ合衆国 ミズーリ 63141, セン

ト ルイス, オーク パーク ドライブ

27

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 可変性の活性を有する単鎖稔性ホルモン

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 卵胞刺激ホルモン (F S H) 活性と比較しての比が変化する黄体形成ホルモン (L H) 活性を共に有する、単鎖型稔性誘導ホルモンを提供すること。

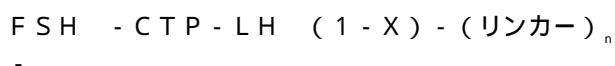
【解決手段】 次の式で表わされるグリコシル蛋白質、または非グリコシル蛋白質は、ホルモンのヘテロダイマー型の代用物として、不妊症の治療の補助などに有用である。

式 = F S H - C T P - L H (1 - X) - (リンカー) n - 。

ここで F S H は卵胞刺激ホルモン サブユニット。 C T P はヒト絨毛性性線刺激ホルモン、 L H (1 - X) は黄体ホルモンの 1 ~ X 位を含む サブユニット、リンカーは 1 - 1 0 0 アミノ酸残基よりなる親水性のアミノ酸配列で好ましくは上記に規定する C T P であり、 は脊椎動物の糖蛋白質の サブユニットである。以上に記したサブユニット及びアミノ酸配列はいずれも改変体を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下式の、FSHに関してアゴニスト活性を有し、かつLHに関してより弱いアゴニスト活性を有する、グリコシル化タンパク質または非グリコシル化タンパク質であって：



ここでFSHは、脊椎動物卵胞刺激ホルモンサブユニットまたはその改変体であり；CTPとは、ヒト絨毛性腺刺激ホルモンサブユニットまたはその改変体の112位～118位から145位のアミノ酸配列をいい；LH(1-X)とは、1～X位を含む脊椎動物黄体形成ホルモンのサブユニットまたはその改変体をいい、ここでXは114～121の整数であり；「リンカー」とは、1～100アミノ酸残基を含む親水性の、可動性のアミノ酸配列であり；nは0または1であり；そしては脊椎動物糖タンパク質ホルモンのサブユニットまたはその改変体であり、但し、nが1でありかつリンカーが完全なCTPである場合、Xは114であり得ない、タンパク質。

【請求項2】 nが1である、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 リンカーが、少なくとも1つのグリコシル化部位を含む完全CTPまたは部分CTP、あるいはその改変体である、請求項2に記載のタンパク質。

【請求項4】 Xが119～121である、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項5】 FSHがヒトFSHであり、LHがヒトLHであり、そしてがヒトのサブユニットである、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項6】 請求項1に記載のタンパク質であって、FSH-CTP-LH(1-121)-CTP-またはFSH-CTP-LH(1-114)-CTP-またはFSH-CTP-LH(1-121)-またはFSH-CTP-LH(1-114)-またはFSH-CTP-CG-である、タンパク質。

【請求項7】 適切な薬学的賦形剤と混合された請求項1に記載のタンパク質を含む、薬学的組成物。

【請求項8】 固体支持体に結合された、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項9】 請求項1に記載のタンパク質に対して免疫特異的な、抗体。

【請求項10】 請求項1に記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、DNA分子またはRNA分子。

【請求項11】 FSHおよびLHのアゴニストの産生のための発現系であって、該発現系は、請求項1に記載のタンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列を、該第1のヌクレオチド配列の発現に影響する制御配列と*

*作動可能に連結して含む、発現系。

【請求項12】 前記第1のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質に作動可能に連結されるシグナルペプチドをコードする、第2のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項11に記載の発現系。

【請求項13】 請求項11に記載の発現系を含むように改変された、宿主細胞。

【請求項14】 請求項12に記載の発現系を含むように改変された、宿主細胞。

【請求項15】 FSHおよびLHのアゴニストである単鎖タンパク質を産生するための方法であって、該方法は、該タンパク質が産生される条件下で請求項13に記載の細胞を培養する工程；およびその培養物から該タンパク質を回収する工程を含む、方法。

【請求項16】 FSHおよびLHのアゴニストである単鎖タンパク質を産生するための方法であって、該方法は、該タンパク質が産生される条件下で請求項14に記載の細胞を培養する工程；およびその培養物から該タンパク質を回収する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】(技術分野)本発明は、特定のクラスの単鎖稔性ホルモンに関する。これらの単鎖形態は、サブユニットの上流に2つのサブユニットを含む。本発明のホルモンは、卵胞刺激ホルモン(FSH)機能については同様の活性を有するが、黄体形成ホルモン(LH)機能については異なる活性を有する。従って、本発明の化合物は、比率が可変であるFSH活性およびLH活性を有する。

【0002】(背景技術)ヒトにおいて、重要な4つの糖タンパク質ホルモンヘテロダイマー(LH、FSH、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、および絨毛性腺刺激ホルモンCG)は、同じサブユニットおよび異なるサブユニットを有する。これらのホルモンのうち3つは、事実上他の全ての脊椎動物種にも存在し、CGは、今までには、霊長類ならびに妊娠した雌馬の胎盤および尿にしか認められていない。FSHは、稔性の調節において重要なホルモンであり、FSHは、稔性を増強するために、インビボおよびインビトロの両方で使用されてきた。LHもまた、このような処置において役割を果たすようである。

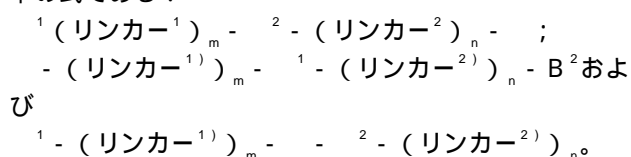
【0003】公開された2つのPCT出願は、このユニットおよびユニットが共有結合的に連結されて、以下の一般式の融合ペプチドを生じる、これら4つのホルモン(FSH、LH、TSHおよびCG)の単鎖形態を記載する：(リンカー)_n、または(リンカー)_n。

ここでnは0または1であり、そしておよびはこれらのホルモンのそれぞれのサブユニットを示す(Moyle, W. R., 1995年8月24日に公開されたPCT出願WO95/22340、および本明細書中の発

明者の出願である、1996年2月22日に公開されたWO96/05224)。これらの書類の開示は、本明細書中に参考として援用される。

【0004】シスチン架橋数が使い尽くされた、上記に記載の単鎖糖タンパク質ホルモンの形態は、1997年9月19日に出願され、そして本明細書中に参考として援用される米国特許出願第08/933,693号に開示される。

【0005】WO99/25849として公開されたPCT出願(1999年5月27日公開)は、単一のサブユニットに結合した2つのサブユニットを含む、さらなる単鎖形態を開示する。これらのタンパク質は、以下の式である：



【0006】この属は、大多数の独立したメンバーを含み、そしてこの公開は、いずれの特定のサブクラスに対しても重点をおいていない。この書類の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0007】さらに、1999年10月12日に出願され、そしてまた本明細書中に参考として援用される、PCT出願PCT/US 99/23555は、2つのサブユニットを含むホルモンのさらなる形態を開示するが、ここでこのサブユニットの1つは、単一のサブユニットおよびサブユニットを含む単鎖形態に、非共有結合的に結合されている。

【0008】ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのカルボキシ末端ペプチド(CTP)またはその改変体を使用して、一般に医薬品を、および特にこれらのホルモンを改変する刊行物が、本発明にさらに関連する。従って、PCT出願公開番号WO90/09800(1990年9月7日公開され、そして本明細書中に参考として援用される)は、これらのホルモンの種々の改変型(CTPによるサブユニットのC末端伸長またはその改変体を含む)を記載する。これらのホルモンの他のムテインもまた、記載される。「CTP」は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのサブユニットの112位~118位の任意の1つから145位にわたるアミノ酸の配列である。さらに、PCT出願公開番号WO94/24148(1994年10月27日公開され、そして本明細書中に参考として援用される)は、C末端以外の位置でのCTPの伸長による、あるいは挿入による、および112位~118位から145位にわたる配列より短いCTPフラグメントを用いる、これらのホルモンおよび他の化合物の改変を記載している。

【0009】FSHのCTP伸長サブユニットもまた、本明細書中の出願人による2つの報文に記載されている：LaPolt, P. S.ら、Endocrinology

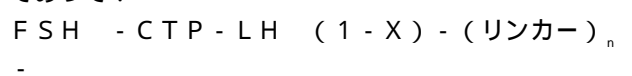
logy(1992)131:2514-2520、およびFares, F. A.ら、Proc Natl Acad Sci USA(1992)89:4304-4308。これらの両報文は、本明細書中に参考として援用されている。単鎖化合物(FSH-CG)の活性を記載する本明細書中の発明者による論文(Masatoshi Kandaら、Molecular Endocrinology(1999)13:1873~1881)もまた、参考として援用される。

【0010】ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのヘテロダイマー形態の結晶構造は、ほぼ同時期の論文に公開され；1つは、Lapthorn, A. J.ら、Nature(1994)369:455-461であり、もう一方は、Wu, H.ら、Structure(1994)2:545-558である。これらの論文の結果は、Patel, D. J. Nature(1994)369:438-439に要約されている。

【0011】1991年11月14日に公開されたPCT出願WO91/16922は、多くのキメラ形態およびさもなければ改変形態の、ヘテロダイマー糖タンパク質ホルモンを記載している。概して、この開示は、それぞれ種々の鎖部分あるいは鎖部分を含有する、サブユニットあるいはサブユニットのキメラを重点的に取り扱っている。WO91/16922に単に掲載されているだけで他には記載されていない1つの構築物は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンの鎖の実質的に全体をサブユニットプレタンパク質(すなわち、このサブユニットの分泌シグナル配列を含有する)に融合する。

【0012】上記に参照されたPCT公開WO99/25849に開示される、生物機能的な単鎖化合物の属の特定のサブセットが、インビトロおよびインビボで稔性の増強のためのプロトコルにおいて使用される場合に、特に有利な特性を有することが、現在見出されている。このサブセットにおいて、FSH活性は、ネイティブのホルモンのFSH活性に匹敵するレベルで維持されるが、LH活性は、ネイティブLHのLH活性よりも一般的に低い範囲にわたり変化される。

【0013】(発明の開示)本発明は以下を提供する：1. 下式の、FSHに関してアゴニスト活性を有し、かつLHに関してより弱いアゴニスト活性を有する、グリコシル化タンパク質または非グリコシル化タンパク質であって：



ここでFSHは、脊椎動物卵胞刺激ホルモンサブユニットまたはその改変体であり；CTPとは、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンサブユニットまたはその改変体の112位~118位から145位のアミノ酸配列をいい；LH(1-X)とは、1~X位を含む脊椎動物黄体形成ホルモンのサブユニットまたはその改変体をい

い、ここでXは114~121の整数であり、「リンカー」とは、1~100アミノ酸残基を含む親水性の、可動性のアミノ酸配列であり；nは0または1であり；そしては脊椎動物糖タンパク質ホルモンのサブユニットまたはその改変体であり、但し、nが1でありかつリンカーが完全なCTPである場合、Xは114であり得ない、タンパク質。

2. nが1である、項1に記載のタンパク質。

3. リンカーが、少なくとも1つのグリコシル化部位を含む完全CTPまたは部分CTP、あるいはその改変体 10 である、項2に記載のタンパク質。

4. Xが119~121である、項1に記載のタンパク質。

5. FSH がヒトFSH であり、LH がヒトLH であり、そして がヒトの サブユニットである、項1に記載のタンパク質。

6. 項1に記載のタンパク質であって、FSH - CTP - LH (1 - 121) - CTP - またはFSH - CTP - LH (1 - 114) - CTP - またはFSH - CTP - LH (1 - 121) - またはFSH - CTP - LH (1 - 114) - またはFSH - CTP - CG - である、タンパク質。 20

7. 適切な薬学的賦形剤と混合された項1に記載のタンパク質を含む、薬学的組成物。

8. 固体支持体に結合された、項1に記載のタンパク質。

9. 項1に記載のタンパク質に対して免疫特異的な、抗体。

10. 項1に記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、DNA分子またはRNA分子。 30

11. FSHおよびLHのアゴニストの産生のための発現系であって、この発現系は、項1に記載のタンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列を、この第1のヌクレオチド配列の発現に影響する制御配列と作動可能に連結して含む、発現系。

12. 上記第1のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質に作動可能に連結されるシグナルペプチドをコードする、第2のヌクレオチド配列をさらに含む、項11に記載の発現系。

13. 項11に記載の発現系を含むように改変された、 40 宿主細胞。

14. 項12に記載の発現系を含むように改変された、宿主細胞。

15. FSHおよびLHのアゴニストである単鎖タンパク質を産生するための方法であって、この方法は、上記のタンパク質が産生される条件下で項13に記載の細胞を培養する工程；およびその培養物から上記タンパク質を回収する工程を含む、方法。

16. FSHおよびLHのアゴニストである単鎖タンパク質を産生するための方法であって、この方法は、上記 50

タンパク質が産生される条件下で項14に記載の細胞を培養する工程；およびその培養物から上記タンパク質を回収する工程を含む、方法。

【0014】本発明は、FSH活性と比較しての比が変化するLH活性を有する、稔性誘導ホルモンの単鎖形態を提供する。一般に、単鎖形態は、等量のネイティブのFSHにより示される活性に匹敵するFSHアゴニスト活性を有するが、このクラスの種々の実施態様のうちで変化し得るLHアゴニスト活性を有する。一般に、この化合物は、種々の程度のLHアゴニスト活性を有するが、代表的に、そのネイティブのホルモンと関連するLH活性に劣る。本発明の単鎖形態は、グリコシル化されるか、部分的にグリコシル化されるか、またはグリコシル化されないかのいずれかであり得、そしてFSHは、CTPを介してLHに連結される。サブユニットは両方の下流である。

【0015】従って、1つの局面において、本発明は、以下の式：

$$\text{FSH} - \text{CTP} - \text{LH} (1 - X) - (\text{リンカー}) -$$

のグリコシル化タンパク質または非グリコシル化タンパク質に関し、ここで「」は糖タンパク質ホルモンの共通サブユニットまたはその改変体を表し、FSHは卵胞刺激ホルモンのサブユニットをいい、CTPは、本明細書中以下にさらに規定される絨毛性性腺刺激ホルモンサブユニットのカルボキシ末端ペプチドをいい、LH(1-X)は、必要に応じて上記のカルボキシ末端から7つまでのアミノ酸の欠失を含む、黄体形成ホルモンサブユニットをいい、「リンカー」は、可動性および親水性であるアミノ酸配列であり、そしてCTP'(すなわち、完全なCTPまたは部分CTP)であり得る。nは0または1である。しかし、n=1およびリンカー=CTPの場合、Xは114であり得ない。

【0016】その他の局面では、本発明は、本発明のタンパク質を生産するための組換え材料および方法、本発明のタンパク質を含有する薬学的組成物、本発明のタンパク質に特異的な抗体、および本発明のタンパク質の使用方法に関する。

【0017】(発明の実施の形態)ヒトの4つの「糖タンパク質」ホルモンは、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、および甲状腺刺激ホルモン(TSH)を含むファミリーを提供する。これらのホルモンは全て、所定の種について、グループ間でアミノ酸配列が同じであるサブユニット、およびファミリーの各メンバーに従って異なるサブユニットから構成されたヘテロダイマーである。従って、通常これらの糖タンパク質ホルモンは、非共有結合で会合しているサブユニットおよびサブユニットから構成されたヘテロダイマーとして存在する。ほとんどの脊椎動物は、FSH、TSH、

およびLHを産生し、絨毛性腺刺激ホルモンは、ヒトを含む霊長類、および妊娠中の雌馬にのみ見出されている。

【0018】動物において、各ホルモンのサブユニットおよびサブユニットは、異なる遺伝子によりコードされ、そして別々に合成され、次いで非共有結合性ヘテロダイマー複合体へと組み立てられる。本発明の化合物において、サブユニットは、サブユニットに共有結合的に連結されて、1次構造が本質的に線状である単鎖分子になる。2次構造および3次構造を考慮することならびにコンホーメーションのエネルギーにより与えられる3次元構造は、サブユニットに代表されるヘテロダイマーの機能性が示されることを可能にする、ヘテロダイマー形態に明らかに十分に類似している。単鎖中にサブユニットおよび2つのサブユニットを含む化合物の属の一般的特性は、上記に引用されたPCT出願公開WO99/25849に記載される。しかし、本発明の化合物(上記に引用されたPCT出願に記載される、非常に小さいサブセットの化合物を形成する)は、稔性の誘導のための薬物の設計において特に有利である。

【0019】稔性の誘導のために、インビトロかまたはインビボのいずれかで細胞を処置する際に、主要成分として卵胞刺激ホルモン(FSH)の効果を提供することが所望され得る。しかし、絨毛性腺刺激ホルモン/黄体形成ホルモンについてのレセプターに関して、典型的にはより少ない、しかしそれにも関わらず、有意な量の活性を提供することが有利である。(同じレセプターが、CGおよびLHの両方を認識する)。所望され得るLH活性の程度は、処置される特定の被験体または細胞によりいくらか変化するが、しかし、これは、代表的には、FSH活性の程度よりも実質的に低い。本発明の化合物は、FSHと実質的に同じアゴニスト活性を共有するが、代表的に、FSHアゴニスト刺激の約1%の活性から、FSHアゴニスト刺激の約100%までに及ぶLH活性の範囲を提供する、一群の生物学的活性分子を提供する。この範囲は、以下にさらに記載されるように、グリコシル化のレベルに関して、リンカーを含む(または含まない)ことおよびリンカーの長さに関して、ならびにC末端欠失に関して、LH成分を操作することにより、生じる。

【0020】(サブユニット成分)本明細書中で使用される場合、共通サブユニット、ならびにFSHサブユニット、LHサブユニット、およびCGサブユニット、ならびにヘテロダイマー形態は、その従来の定義を有し、そしてそれ自体が当該分野で公知であるアミノ酸配列を有するタンパク質か、またはその対立遺伝子改変体をいい、このことは、示されるグリコシル化パターン、またはアミノ酸側鎖の他の誘導体化に関わらない。

【0021】これらのペプチドの「ネイティブ」形態

は、関連の脊椎動物組織から単離されており、かつそれ自身これらの既知の配列を有するアミノ酸配列を有するペプチドであるか、またはそれらの対立遺伝子改変体のペプチドである。7アミノ酸以下のアミノ酸欠失に達するLHサブユニットのC末端の短縮は、この定義に含まれる。

【0022】これらタンパク質の「改変体」形態およびCTPユニット(以下を参照のこと)の「改変体」形態は、ネイティブのタンパク質のアミノ酸配列における意図的变化(短縮を含む)を有する形態であり、この変化は、例えば、部位特異的変異誘発または他の組換え操作により生成されるか、あるいは合成的に調製される。

【0023】これらの変化は、欠失、および/または挿入、および/または置換(非保存的置換に加えて、保存的アミノ酸置換を含む)を含む、1~5個、好ましくは1~3個、そしてより好ましくは1個のアミノ酸変化からなる。得られた改変体は、ネイティブのホルモンの活性を反映する活性を保持しなければならない(すなわち、得られた改変体は、アゴニストとして挙動するようにネイティブのホルモンの生物学的活性を保持しなければならない)。

【0024】「保存アナログ」は、従来の意味で、置換される残基が、置換がなされる残基と同じ一般的なアミノ酸カテゴリーにあるアナログを意味する。アミノ酸は、当該分野で理解されているように、例えば、Dayhoff, M.ら、Atlas of Protein Sequences and Structure(1972)5:89~99によって、このようなグループに分類された。一般的には、酸性アミノ酸は、1つのグループに帰属し;塩基性アミノ酸は別のグループに;中性の親水性アミノ酸は別のグループに、などに帰属する。より詳細な分類は、上記で参考として援用されるWO96/05224に記載される。

【0025】好ましい改変体の1つのセットは、もしくはサブユニットのいずれかのグリコシル化部位、またはその両方のグリコシル化部位、あるいはCTPのグリコシル化部位または部分CTPのグリコシル化部位が改変された改変体である。本明細書に記載されているホルモンカルテットのいくつかの有用な改変体は、1993年1月5日に発行された米国特許第5,177,193号に記載されており、そしてこれは本明細書に参考として援用される。グリコシル化パターンは、関連部位の破壊、1つ以上の部位の付加、あるいは代替的に、タンパク質が生産される宿主細胞の変更によって、改変される。

【0026】改変体はまた、非重要領域が改変または除去された改変体を包含する。このような欠失および変化はループ全体を含み得、その結果、10個より相当多いアミノ酸の配列が欠失または変更され得る。しかし、得られる改変体は、少なくともレセプター結合ドメインお

よびシグナル伝達に關与する領域を保持しなければならない。

【0027】糖タンパク質ホルモンの改変体についてのかなりの文献が存在し、そして、アゴニスト活性を生じる多くの可能な改変体が調製され得ることが、明白である。このような改変体は、例えば、Chen, F.ら、Molec Endocrinol (1992) 6: 914~919; Yoo, J.ら、J Biol Chem (1993) 268: 13034~13042; Yoo, J.ら、J Biol Chem (1991) 266: 17741~17743; Puett, D.ら、Glycoprotein Hormones, Lusbacher, J.W.ら編、Springer Verlag New York (1994) 122~134; Kuetmann, H.T.ら、(同書) 103~117頁; Erickson, L.D.ら、Endocrinology (1990) 126: 2555~2560; および Bielineska, M.ら、J Cell Biol (1990) 111: 330a (抄録1844) に開示されている。

【0028】他の改変体は、1つ以上のシスチン結合が、代表的には、結合に關与する一方または両方のシステインを中性アミノ酸で置換することによって、欠失される改変体を包含する。欠失され得る特に好ましいシスチン結合は、26位と110位との間、および23位と72位との間のシスチン結合である。

【0029】本明細書で使用される場合、「ペプチド」および「タンパク質」は、それらの間の長さの区別は恣意的であるので、互換的に使用される。

【0030】サブユニットおよびサブユニットの「非重要」領域は、生物学的活性に必要とされない分子領域である。一般的には、これらの領域は、結合部位、前駆体切断部位、および触媒部位から遠い。適切な折り畳みの誘導、レセプターへの結合、触媒活性などに対して重要な領域は検討されるべきである。ダイマーの場合に重要であるいくつかの領域は、この分子によって課されるコンフォメーション上の制限がこれらの領域に対する必要性を不必要にし得るので、一本鎖形態では重要でなくなることに、留意されるべきである。非重要領域であることの確認は、候補領域の欠失あるいは改変、および、所望の活性についての適切なアッセイの遂行によって、容易に完了される。改変が活性の損失を生じる領域は重要であり、改変が同じ活性あるいは同様の活性を生じる領域は非重要であると考えられる。

【0031】本明細書で使用される場合、「CTPユニット」とは、アミノ酸112位~118位からC末端の残基145位にまで広がる、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンサブユニットのカルボキシ末端に認められるアミノ酸配列をいう。従って、各「完全」CTPユニットは、CTPのN末端に依存して、28~34個のアミノ酸を

含有する。

【0032】「部分」CTPユニットによって、112位~118位から145位までの間を含めて存在するが、最も短い可能な「完全」CTPユニットから(すなわち、118位~145位から)少なくとも1つのアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列が意味される。これらの「部分」配列は、CTPに關する「改変体」の定義に含まれる。「部分」CTPユニットは、少なくとも1つのO-グリコシル化部位を含有する。このCTPユニットは、121位(部位1)、127位(部位2)、132位(部位3)、および138位(部位4)のセリン残基に、4つのグリコシル化部位を含む。アゴニストにおいて有用なCTPの部分形態は、介在する部位は削除され得るが、ネイティブのCTP配列で出現する順序で配置された、1つ以上のこれらの部位を含む。

【0033】本発明の化合物において、FSHは、改変体を形成するために、任意の置換または挿入が保存的であり得るが保存的である必要はない、起こり得る1~5アミノ酸の欠失、および/または挿入、および/または置換を除いて、本質的に改変されていない形態の、適切な種由来のFSHサブユニットを表す。従って、この分子のFSH部分は、主要でない改変は許容されるが、本質的には一定の特徴である。

【0034】このFSHサブユニットは、完全CTPリンカーを介してこの分子の下流部分に連結されている。この位置におけるCTPリンカーは、委任される。このリンカーは、この位置において、アミノ酸112~118から145のCG/を含む完全なCTPリンカーである。さらに、単なる主要でない改変(すなわち、1~5アミノ酸置換、および/または挿入、および/または欠失)が含まれる。このような変化は、グリコシル化部位に影響してはならない。

【0035】この分子のLH(1-X)部分は、より変化し得る。名称1-Xは、含まれるLHのアミノ酸配列を表し; Xは114~121である。従って、LHサブユニットは、天然のヒトホルモンで生じる121位の、またはもちろん、異なる種由来のLHの対応する位置の、N末端の114個のアミノ酸のみを含み得る。従って、LHは、1~114位、1~115位、1~116位、1~121位までを含み得る。さらに、LHサブユニットは、1~5アミノ酸置換、および/または挿入、および/または欠失を含み得る。絨毛性性腺刺激ホルモンにおいて対応する位置に存在するアミノ酸の置換が、特に好ましい。従って、LH活性の変化を許容するさらなる可変が、LHサブユニットとCGサブユニットとの間の相違を乗り越える選択された変異により、含まれ得る。一般に、1~121位のLHは、対応する位置のCGよりも疎水性である。細胞内活性は、CGの方を選ぶように歪められるようである; 実際、本発明の好ましい実施態様は、「LH-リンカ

一」の代わりに、種々の短縮型（または非短縮型）形態のCGを含む。本発明の好ましい実施態様は、LH部分に存在する1つ以上のアミノ酸が、CG中のその位置にある対応するアミノ酸によって置換される実施態様を含む。

【0036】1位～114位には、LHおよびCGにおいて異なる、17残基が存在する。115位～121位の全てのアミノ酸は異なる。LHアミノ酸を、CGのアミノ酸で組織的に置換することにより、LH/CGレセプターアゴニストとしてのこの化合物の活性を変化し得る。従って、特定の置換は、本発明の化合物により包含されるLH活性の範囲内の化合物を拡張する。

【0037】LH(1-X)の下流のリンカーは、必要に応じる。このリンカーは、アミノ酸、代表的には1～100アミノ酸、好ましくは1～75アミノ酸、好ましくは1～50アミノ酸、そしてより好ましくは1～40アミノ酸の配列である。このアミノ酸配列は、可動性、かつ親水性であるべきである。このリンカーに包含されるための代表的なアミノ酸は、グリシン、セリンを含み、そして反復するグリシン/セリン配列が好ましい。特に好ましい実施態様は、CTP'であり、これは部分CTPユニットまたは完全CTPユニットである。

【0038】サブユニットおよびその改変体は、一般に、改変体について本明細書中で規定される通りである。

【0039】本発明のホルモンの特に好ましい実施態様は、以下が挙げられる(N-Cで示される): FSH-CTP-LH(1-114)-; FSH-CTP-LH(1-115)-; FSH-CTP-LH(1-116)-; FSH-CTP-LH(1-117)-; FSH-CTP-LH(1-118)-; FSH-CTP-LH(1-119)-; FSH-CTP-LH(1-120)-; FSH-CTP-LH(1-121)-; FSH-CTP-LH(1-114)CTP'-; FSH-CTP-LH(1-115)CTP'-; FSH-CTP-LH(1-116)CTP'-; FSH-CTP-LH(1-117)CTP'-; FSH-CTP-LH(1-118)CTP'-; FSH-CTP-LH(1-119)CTP'-; FSH-CTP-LH(1-120)CTP'-; およびFSH-CTP-LH(1-121)CTP'-; ここでCTP'は、完全CTPを表す。

【0040】LHサブユニットとサブユニットとの間のCTP'が部分CTPである、上記の実施態様もまた好ましい。

【0041】LHサブユニット残基の1つ以上のアミノ酸が、CGサブユニット由来の対応するアミノ酸により置換される、列挙された実施態様と類似の実施態様

もまた好ましい。従って、1～114領域の任意の関連位置にあるアミノ酸が置換され得、その結果、1～17のそのような置換がなされ得、さらに、LHサブユニットの115位～121位の任意の数のアミノ酸が、CGサブユニットにあるそれらの位置の対応するアミノ酸により置換され得る。1つの特定の好ましい実施態様において、全てのこのような置換がなされ、そしてサブユニットに対するCTPリンカーは、単に、CGサブユニット中に天然に存在するものである。さらに、CGサブユニットは、少なくともCTPの一部によりさらに伸長され得る。以下の実施態様は、例示目的のみのために、LHサブユニット残基がCGサブユニットに「変形される」型のなされ得る置換を例示する。この例示は、ヒトホルモンに関して示されるが、類似の置換が他の動物種由来のホルモンに関して生じ得る。

【0042】FSH-CTP-LH(1-114, H10R, M42T)-CTP'-FSH-CTP-LH(1-116, T8R, N71D, L115F, S116Q)-CTP'-

FSH-CTP-LH(1-114, R2K, I15T, T53N, P83A)-CTP'-

FSH-CTP-LH(1-118, W8R, P51A, F82Y, G117D)-CTP'-

FSH-CTP-CG-

【0043】上記の化合物において、標準の1文字アミノ酸コードを使用し; 数字は位置を示し、そして左側の残基はLHの残基であり、右側の残基はCG由来の残基であり; 従って、例えば、「W8R」は、8位のLHのトリプトファン残基がアルギニン残基により置換される実施態様をいう。

【0044】ヒトでの使用に関しては、ヒト型のサブユニットおよびサブユニットが望ましいが、他の脊椎動物における対応形態が獣医学的状況において有用であることに留意すべきである。ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ネコ、イヌ、および他の種由来のFSH、TSH、およびLHのサブユニットは、これらの種に影響を与える指標に適切である。

【0045】いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、出願人は、分子のLH活性がLH成分のC末端を伸長することにより増強されると考える。従って、活性のスペクトルは、LHが1位～114位として存在し、そしてCTPが含まれない(最も低い活性を有する)化合物から、LHサブユニットが完全に含まれ、そしてCTPによりさらに伸長され(最も高い活性の分子を提供する)実施態様までの範囲にわたる。この関係は、もちろん完全ではなく、そしてこの成分のアミノ酸配列における任意の改変に影響される。それにも関わらず、上記は、本発明の化合物において望ましい活性の範囲を構築する際の、いくつかの一般的な指針を提供する; LHアゴニスト活性は、一般に、その分子のLH

サブユニット部分のC末端配列を伸長することにより増強し得、そしてLHアゴニスト活性は、この伸長の長さを減少することにより減衰し得る。

【0046】(他の改変)本発明の単鎖タンパク質は、リン酸化、グリコシル化(N結合型およびC結合型の両方)、通常グリコシル化された形態の脱グリコシル化、アシル化、アミノ酸側鎖の改変(例えば、プロリンのヒドロキシプロリンへの転換)、および、一般的に生じることが認められている翻訳後の事象に類似した同様の改変のような、アミノ酸配列を改変すると一般的に理解され

10 ている方法で、さらに結合体化または誘導体化され得る。
【0047】本発明のホルモンのグリコシル化状態は、特に重要である。ホルモンは、原核生物宿主中で産生すること、またはサブユニットおよび/もしくは存在し得る任意のCTPユニットに通常存在するグリコシル化部位を変異させることのいずれかによって、非グリコシル化形態で調製され得る。非グリコシル化形態のホルモンおよび部分的にグリコシル化された形態のホルモンの両方

20 は、グリコシル化部位を操作することによって調製され得る。通常は、もちろん、グリコシル化形態もまた、本発明の範囲内に包含される。
【0048】当該分野で一般に公知のように、本発明の単鎖タンパク質はまた、所望の適用に応じて、標識、キャリア、固体支持体などにカップリングされ得る。標識形態は、それらの代謝運命の追跡に使用され得る。この目的のための適切な標識は、特に、ヨウ素131、テクネチウム99、インジウム111などのような放射性同位体標識を含む。標識はまた、アッセイ系中の単鎖タン

30 パク質の検出を媒介するために使用され得る。この場合、放射性同位体はまた、酵素標識、蛍光標識、発色標識などと同様に使用され得る。このような標識の使用は、関連のレセプターの位置決めを可能にする。なぜなら、これらは、このようなレセプターに関する標的化剤として使用され得るからである。
【0049】本発明のタンパク質はまた、これらの新規な改変形態と特異的に免疫反応する抗体の調製において、それらの免疫原性を増強するために、キャリアにカップリングされ得る。この目的のための適切なキャリアは、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)、ウ

40 シ血清アルブミン(BSA)およびジフテリアトキソイドなどを含む。二官能性リンカーの使用を含む、本発明の改変ペプチドをキャリアに連結させるための標準的なカップリング技術が、使用され得る。
【0050】他の技術とともに、同様の結合技術が、本発明のタンパク質を固体支持体にカップリングさせるために使用され得る。カップリングされる場合、これらのタンパク質は、次いで、特異的反応が示される所望の成分を分離するためのアフィニティー試薬として使用され得る。従って、これらは、適切な サブユニットが相互

作用するレセプターの精製および単離において有用である。

【0051】(調製方法)本発明のタンパク質を構築するための方法は、当該分野で周知である。現在最も実用的なアプローチは、所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現によって、これらの物質を組換え法により合成することである。改変体を含む単鎖形態をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸は、ネイティブ配列から調製され得るか、またはデノボで、もしくはこれらの技術の組み合わせを用いて合成され得る。部位特異的変異誘発、さらなる配列の連結、PCRによるような増幅、および適切な発現系の構築のための技術は、現在までに全て当該分野で周知である。所望のタンパク質をコードするDNAの部分あるいは全部は、好ましくは連結を容易にするための制限部位を含むように、標準的な固相法によって合成して構築され得る。含まれるコード配列の転写および翻訳のための適切な制御エレメントが、DNAコード配列に提供され得る。周知のように、発現系は、広範囲の宿主(E.coliまたはB. subtilisのような原核生物宿主、ならびに酵母、AspergillusおよびNeurosporaのような他の真菌、植物細胞、昆虫細胞、CHO細胞のような哺乳動物細胞、鳥類細胞などのような真核生物宿主を含む)に適合するものが、現在入手可能である。

【0052】宿主の選択は、翻訳後の事象(最も具体的にはグリコシル化を含む)に対して特に適切である。グリコシル化の位置は、分子内のグリコシル化部位の性質によって、ほとんどの場合制御される。しかし、この部位を占める糖の性質もまた、宿主の性質により影響される。従って、本発明のホルモンの特性の微調整は、宿主の適切な選択によって達成され得る。

【0053】サブユニット部分の遺伝子の特に好ましい形態(サブユニットは改変されていようと、あるいは改変されてなからうと)は、「ミニ遺伝子」構築物である。本明細書で使用される場合、サブユニット「ミニ遺伝子」は、 pM^2/CG あるいは $pM^2/$ の構築物の記載において、Matzuk, M.M.ら、Mol Endocrinol(1988)2:95~100に開示されている遺伝子構築物のことである。

【0054】組換え産生については、発現系を用いる改変宿主細胞が使用され、所望のタンパク質を産生するために培養される。これらの用語は、本明細書では以下のように使用される。

【0055】「改変(された)」組換え宿主細胞、すなわち、本発明の組換え発現系を「含むように改変された」細胞とは、この発現系を導入するために、トランスフェクション、ウイルス感染などを含む任意の都合のよい様式によって、この発現系を含むように改変された宿主細胞のことである。「改変(された)細胞」とは、系が染色体中に組み込まれようと、あるいは染色体外性で

あろうと、この発現系を含有する細胞のことである。「**変更された細胞**」は、発現系の含有に関して安定であり得るか、あるいはコード配列が一過的に発現され得るかのいずれかである。簡単に言えば、本発明の発現系を用いて「**変更された**」組換え宿主細胞とは、この取り込みをもたらす様式に関係なく、ネイティブでは含まない場合に、この発現系を含ませる操作の結果として、この発現系を含む細胞をいう。

【0056】「**発現系**」とは、発現されるべきコードヌクレオチド配列、および、コード配列の発現をもたらすのに必要な制御配列を伴うコードヌクレオチド配列を含む核酸分子のことである。代表的には、これらの制御は、プロモーター、終止調節配列、および、いくつかの場合には、オペレーターあるいは発現を調節するその他の機構を含む。制御配列は、特定の標的組換え宿主細胞で機能的であるように設計されたものであり、従って、宿主細胞が、構築された発現系で制御配列に適するように選択されなければならない。

【0057】**産生されたタンパク質の分泌が所望される場合**、シグナルペプチドをコードするさらなるヌクレオチド配列もまた、プレタンパク質を産生するために所望の単鎖ホルモンに作動可能に連結される、シグナルペプチドを産生するように含まれる。翻訳の間に、このシグナルペプチドは、成熟単鎖ホルモンを放出するために切断される。

【0058】本明細書で使用されている場合、「**細胞**」、「**細胞培養(物)**」および「**細胞株**」は、意味の微妙な差に特に注意を払うことなく、互換的に使用される。それらの間の区別が重要な場合、その区別は文脈から明白である。いずれかが意味される場合、全てが包含されることが意図される。

【0059】**産生されたタンパク質は**、細胞内で産生されるときは細胞溶解物から、あるいは、分泌されるときは培地から回収され得る。細胞培養物から組換えタンパク質を回収する技術は、当該分野で周知であり、これらのタンパク質は、クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、選択沈降などのような公知の技術によって、精製され得る。

【0060】本発明のホルモンの全体あるいは一部は、当該分野で公知のペプチド合成技術を使用して直接合成され得、そして合成部分は、化学的にまたは酵素を用いて連結され得る。

【0061】(抗体)本発明のタンパク質は、これらの新規化合物と特異的に免疫反応する抗体を生成するために使用され得る。これらの抗体は、種々の診断適用および治療適用に有用である。

【0062】抗体は、一般的に、ウサギ、マウス、ヒツジ、またはラットのような哺乳動物での標準免疫プロトコールを使用して調製され、そして抗体は、十分な免疫を確実にするためにポリクローナル抗血清として力価測

定される。次に、ポリクローナル抗血清は、例えば、イムノアッセイでの使用のために、採取される。宿主からの抗体分泌細胞、例えば、脾細胞または末梢白血球は、公知の技術を使用して不活化され得、そして本発明のタンパク質に免疫特異性であるモノクローナル抗体の産生のためにスクリーニングされ得る。「**抗体**」は、必要とされる免疫特異性を維持する任意のフラグメント(例えば、 F_{ab} 、 $F_{ab'}$ 、 $F_{(ab')_2}$ 、 F_v など)を含む。従って、この抗体はまた、組換え技術(代表的には、適切な特異性を有するモノクローナル抗体の少なくとも可変領域をコードするヌクレオチド配列を単離すること、および適切な発現系を構築することによる)を用いて調製され得る。このアプローチは、 F_v 形態、キメラ形態、「**ヒト化**」形態などの産生のような任意の所望の変更を可能にする。

【0063】「**本発明のタンパク質に免疫特異的な**」によって、本発明の参照化合物を特異的に結合するが、ヘテロダイマーにも、含まれるサブユニット自体または任意の単鎖形態(これは、親和性または非親和性を決定するために考慮される一般的なパラメーター内で単一のサブユニットのみを含む)のいずれにも結合しない抗体を意味する。特異性とは、相対的な用語であって、100倍以上の特異的結合の差異のような、任意の限定が選択され得ることが理解される。従って、本発明内に包含される免疫特異的抗体は、対応のヘテロダイマー、先行技術の単鎖形態または別個のサブユニットに対するよりも、特定のタンパク質に対して少なくとも100倍高く反応性である。このような抗体は、例えば、本発明の化合物を結合するものについてスクリーニングすること、およびヘテロダイマー、サブユニットまたはWO95/22340、WO96/05224、およびWO99/25849に記載される先行技術の単鎖形態にも結合するものを捨てることによって入手され得る。

【0064】(処方および使用方法)本発明のタンパク質は、それらに対応するヘテロダイマーについて公知である方法に匹敵する方法を使用して、処方および投与される。従って、処方および投与方法は、使用される特定のホルモンまたは使用される特定のホルモンの組み合わせに従って変動する。しかし、用量レベルおよび投与頻度は、特にCTPユニットが、その存在に起因する生物学的半減期の延長を考慮して存在するときには、ヘテロダイマーに比較して変化され得る。

【0065】本発明のタンパク質の処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences、最新版、Mack Publishing Company、Easton、PA中に見出されるような、タンパク質薬物またはペプチド薬物に代表的な処方物である。一般的に、タンパク質は、注射、代表的には静脈内、筋肉内、皮下、または腹腔内注射により、あるいは経粘膜送達または経皮送達のための処方物を用

いて、投与される。これらの処方物は一般的に、界面活性剤あるいは浸透剤（例えば、胆汁酸塩、フシジン酸など）を含有する。これらの処方物は、エアロゾルまたは坐薬として、あるいは経皮投与の場合には、皮膚パッチの形態で投与され得る。経口投与もまた、その処方物が消化系における分解から本発明のペプチドを保護するという条件で可能である。

【0066】投与レジメンおよび処方の最適化は、当該分野での慣用問題としておよび一般的に実施されているように実行される。これらの処方物はまた、獣医学的使用について適切なものを含むように改変され得る。

【0067】本発明の化合物は、多数の方法において、最も明白には、ホルモンのヘテロダイマーの形態についての代用物として、使用され得る。従って、ヘテロダイマーのように、本発明の単鎖ホルモンのアゴニスト形態は、不妊症の処置において、インビトロ受精技術およびネイティブホルモンに関連する他の治療方法の補助として、使用され得る。これらの技術は、ヒトおよび他の動物に対して適用可能である。その種誘導に関する単鎖抗体の選択は、当然に、その方法が適用される被験体に依存する。

【0068】本発明の化合物はまた、ヘテロダイマーに関して使用されるものと類似した様式において試薬として有用である。

【0069】さらに、本発明の化合物は、生物学的サンプル中でそのような抗体がこれらの単鎖化合物の関連部分に結合する程度に、ネイティブタンパク質に結合する抗体の存在または非存在を検出するための診断ツールとして使用され得る。これらはまた、種々のサンプルにおけるこれらのホルモンのレベルを評価するためのアッセイキットにおいて、コントロール試薬として有用である。ホルモン自体のレベルまたはそれらに対して惹起された抗体のレベルを評価するためのプロトコルは、当該分野で一般に公知の標準的な免疫アッセイプロトコルである。種々の競合的アッセイ方法および直接的なアッセイ方法が使用され、これは、放射性同位体標識、蛍光標識、酵素標識などを含む種々の標識技術を含む。

【0070】本発明の化合物はまた、ネイティブのホルモンが結合するレセプターを検出することおよび精製することにおいて有用である。従って、本発明の化合物は固体支持体にカップリングされ得、そしてレセプターまたは抗ホルモン抗体のアフィニティークロマトグラフィー調製において使用され得る。得られたレセプターは、それ自体が治療剤候補および試薬候補についてのスクリーニング試験において、候補薬物についてホルモン活性を評価する際に有用である。当然、サブユニットが異なるので、サブユニットの二重特異性を考慮しなければならない。

【0071】最後に、本発明の化合物と独特に反応する抗体は、次の調製においてこれらの物質を単離するため

の、精製手段として使用され得る。それらもまた、薬物として投与されたこれらの化合物のレベルをモニターするのに使用され得る。

【0072】以下の実施例は、本発明を例証することを意図するが、限定することは意図しない。

【0073】（実施例1）
（発明化合物の調製）発現ベクターを、タンパク質の生成およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞からのこのタンパク質の分泌のために調製した。調製し、そして試験した化合物は以下の通りである：

FSH - CTP - LH (1 - 114) - ;
FSH - CTP - LH (1 - 121) - ;および
FSH - CTP - LH (1 - 114) - CTP -

。【0074】FSH - CTP - LH (1 - 121) - CTP - の産生のための発現ベクターもまた構築した。

【0075】（実施例2）
（LHレセプターの結合またはFSHレセプターの結合）実施例1の化合物を、I - 125標識したhCGまたはFSHヘテロダイマーと適切に競合するその能力について試験した。アッセイについての手順は、上記に引用され、そして本明細書中に参考として援用される、Kanda, Mら、Mol Endocrinol (1999) 13: 1873 ~ 1881に示される。

【0076】手短には、CG/LHレセプターへの結合を評価するために、ヒトLHレセプターを発現するCHO細胞（ 4×10^5 / 試験管）を、増加する濃度のスタンダードとしての非標識CGと競合して、または増加する量の試験するサンプルと競合して、22 で18時間、1 ngの標識CGと共にインキュベートした。サンプルの存在下における標識の減少は、そのサンプルにおける結合能力を測定する。その結果を図1に示す。

【0077】示されるように、どの構築物もCGヘテロダイマー（黒色菱形）の活性に匹敵する活性を示さない。しかし、構築物FSH - CTP - LH (1 - 114) - CTP - （黒丸および縦1本線）は、ネイティブホルモンよりも約10倍を超える EC_{50} を提供する。構築物FSH - CTP - LH (1 - 121) - （黒四角および黒三角）は、なおいくらか大きい EC_{50} を示す。構築物FSH - CTP - LH (1 - 114) - は、このアッセイにおいてより大きな活性を全く示さないようである（白丸および×印）。

【0078】I - 125で標識されたFSHと競合して（それ以外は上記に示されるプロトコルと同一のプロトコルで）CHO細胞上に提示されるFSHレセプターに結合する化合物の能力を試験する比較アッセイ（essay）において、全ての化合物は、概して匹敵するFSHレセプター結合活性を示した。図2を参照されたい。構築物FSH - CTP - LH (1 - 114) - CT

P - (黒丸および白丸)は、試験された残りの分子(組換えFSHヘテロダイマーを含む)よりも、わずかにより効果的であるようである。

【0079】(実施例3)

(LHに関するアゴニスト活性)本発明の化合物のいくつかを、CG/LHレセプターかまたはFSHレセプターを提示するCHO細胞におけるサイクリックAMP産生を刺激する能力について試験した。この手順は、上記に引用されたKandaら、(1999)の手順であった。手短には、cAMPの細胞外および細胞内の総量を、Adenyl Cyclase Activation Flash Plate Kit(NEN Life Science Products, Boston MA)を製造者の指示により使用して決定した。LH/CGレセプターかまたはFSHレセプターのいずれかを発現するCHO細胞(1つのウェルにつき 5×10^4 細胞)を、室温で2時間、リガンドとともにインキュベートした。I-125で標識したcAMPを添加し、そして細胞を室温でさらに16~18時間インキュベートした。フラッシュするプレートをPackard Top

線カウンターで読み、そして各実験を2~3回行った。cAMP含量を、pmol/mlで表した。
【0080】図3Aおよび図3Bは、CG/LH活性アゴニストについての結果を示す。示されるように、構築物FSH-CTP-LH(1-114)CTP-(黒四角または×印)は、このアッセイにおいて、ヘテロダイマーである組換えhCG(CR127、黒菱形)よりもいくらか有効でなかった。しかし、この化合物は、構築物FSH-CTP-LH(1-114)-(黒三角)よりもとても有効であった。予想されたよ

うに、コントロールFSHは、これらの細胞において応

答を提供しない。
【0081】図4Aおよび図4Bは、FSHアゴニスト活性についての結果を示す。予期されるように、hCG(黒四角)は、FSHレセプターを提示する細胞においてcAMPを生成し得ない。しかし、FSHヘテロダイマー(黒菱形)は生成する。試験した本発明の両方の化合物、すなわちFSH-CTP-LH(1-114)-(黒三角)およびFSH-CTP-LH(1-114)CTP-(×印)は、ヘテロダイマーである組換えFSHの応答に匹敵する応答を提供した。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の種々の化合物の、標識化hCGと競合してのLHレセプターに対する結合を示す。

【図2】図2は、本発明の種々の化合物の、FSHと競合してのFSHレセプターに対する結合を示す。

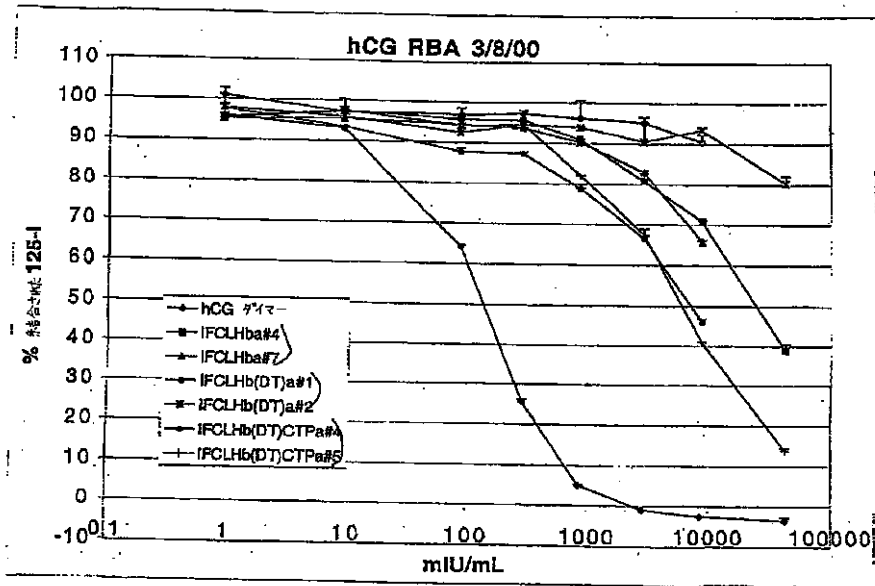
【図3A】図3Aは、本発明の種々の化合物が、LH/CGレセプターを生成するように改変されたCHO細胞において、サイクリックAMPの生成を誘導する能力を示す。

【図3B】図3Bは、本発明の種々の化合物が、LH/CGレセプターを生成するように改変されたCHO細胞において、サイクリックAMPの生成を誘導する能力を示す。

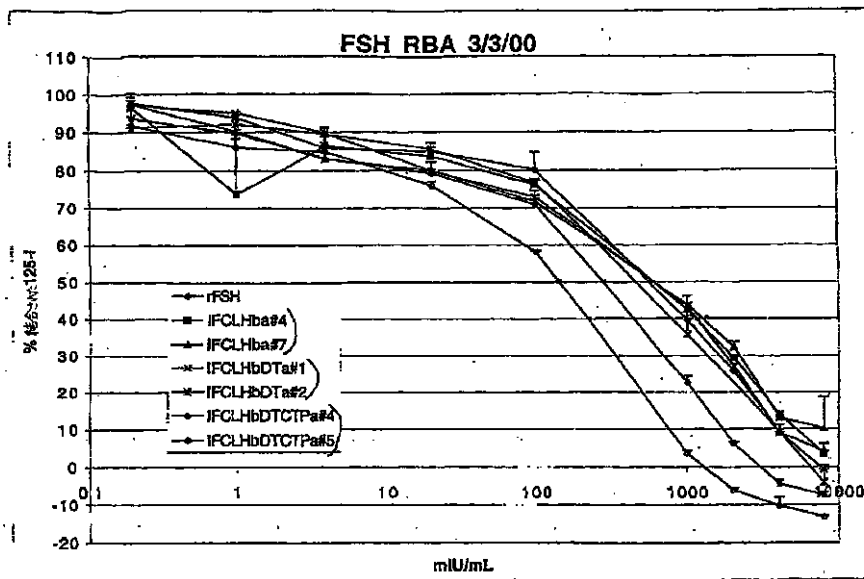
【図4A】図4Aは、本発明の種々の化合物が、FSHレセプターを生成するように改変されたCHO細胞において、サイクリックAMPの生成を誘導する能力を示す。

【図4B】図4Bは、本発明の種々の化合物が、FSHレセプターを生成するように改変されたCHO細胞において、サイクリックAMPの生成を誘導する能力を示す。

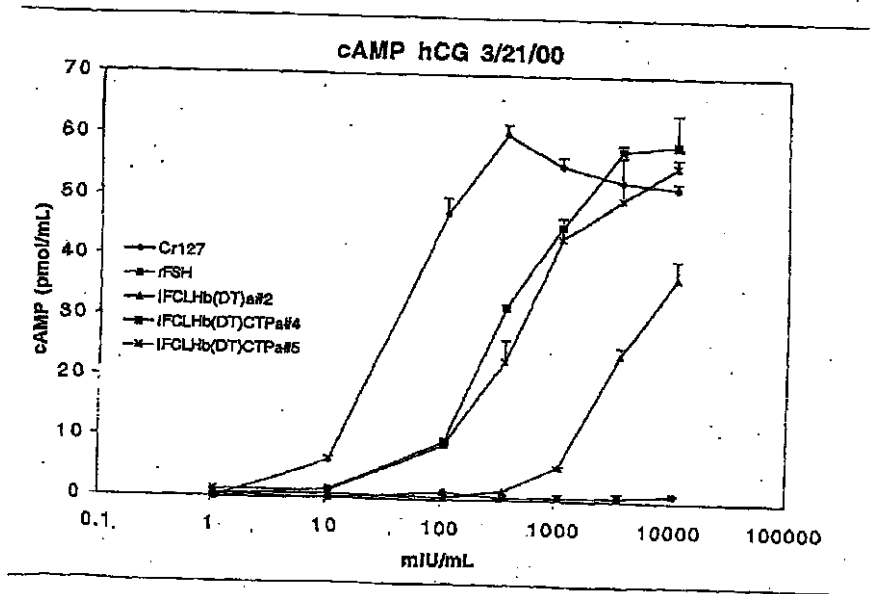
【図1】



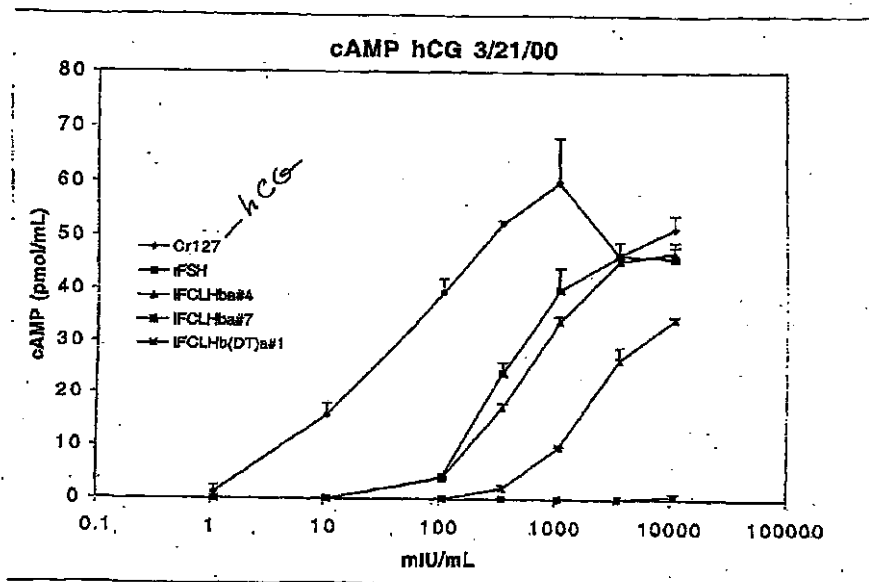
【図2】



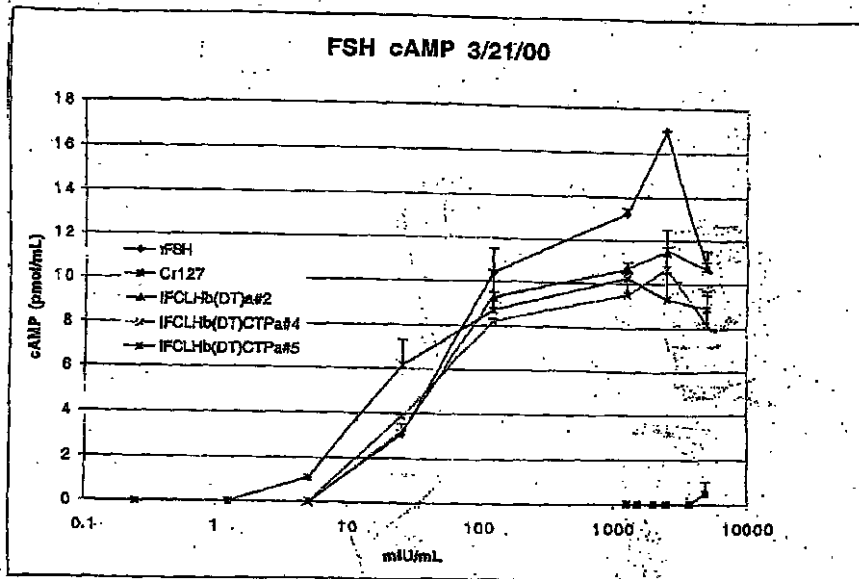
【図3A】



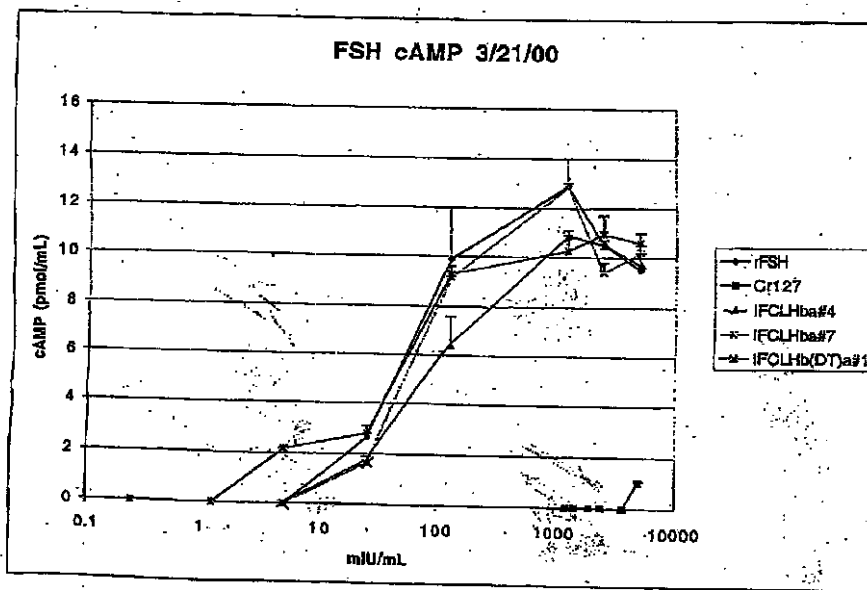
【図3B】



【図4A】



【図4B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C 0 7 K 16/26
 C 1 2 N 1/15
 1/19
 1/21
 5/10

識別記号

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 P 21/02
 21/08
 G 0 1 N 33/15
 33/50

テ-コード(参考)

4 H 0 4 5

C

Z

Z

C 1 2 P	21/02		33/53	F
	21/08			
G 0 1 N	33/15	C 1 2 R	1:91)	
	33/50	(C 1 2 P	21/02	C
	33/53	C 1 2 R	1:91)	
//(C 1 2 N	5/10	(C 1 2 P	21/08	
C 1 2 R	1:91)	C 1 2 R	1:91)	
(C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 R	1:91)	A 6 1 K	37/02	
(C 1 2 P	21/08		37/38	
C 1 2 R	1:91)	C 1 2 N	5/00	A
		C 1 2 R	1:91)	

Fターム(参考) 2G045 AA16 AA34 AA35 AA40 BB20
 CB01 DA12 DA13 DA14 DA54
 4B024 AA01 AA11 BA01 BA43 CA04
 DA02 EA04 GA11 HA01
 4B064 AG15 AG26 CA10 CA19 CC24
 DA01
 4B065 AA90X AA93Y AA99Y AB01
 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA22
 BA23 BA34 DB10 DB25 DB26
 MA01 NA14 ZC042
 4H045 AA10 BA10 BA41 CA40 DA30
 EA30 FA74

【外国語明細書】

1. Title of Invention

**SINGLE-CHAIN FERTILITY HORMONES WITH
VARIABLE LH ACTIVITY**

2. Claims

1. A glycosylated or nonglycosylated protein having agonist activity for FSH, and a lesser agonist activity for LH, of the formula



wherein FSH β is a vertebrate follicle stimulating hormone β subunit or a variant thereof;

CTP refers to the amino acid sequence at positions 112-118 to 145 of human chorionic gonadotropin β subunit or a variant thereof;

LH β (1-X) refers to a β subunit of a vertebrate luteinizing hormone containing positions 1-X where X is an integer of 114-121 or a variant thereof;

"linker" is a hydrophilic, flexible amino acid sequence containing 1-100 amino acid residues;

n is a 0 or 1; and

α is the α subunit of a vertebrate glycoprotein hormone or a variant thereof, with the proviso that if n is 1 and linker is complete CTP, X cannot be 114.

2. The protein of claim 1 wherein n is 1.

3. The protein of claim 2 wherein linker is a complete or partial CTP comprising at least one glycosylation site or a variant thereof.

4. The protein of claim 1 wherein X is 119-121.

5. The protein of claim 1 wherein FSH β is human FSH β , LH β is human LH β and α is the human alpha subunit.

6. The protein of claim 1 which is FSH β -CTP-LH(1-121)-CTP- α or FSH β -CTP-LH(1-114)-CTP- α or FSH β -CTP-LH β (1-121)- α or FSH β -CTP-LH β (1-114)- α or FSH β -CTP-CG β - α .
7. A pharmaceutical composition which comprises the protein of claim 1 in admixture with a suitable pharmaceutical excipient.
8. The protein of claim 1 coupled to a solid support.
9. Antibodies immunospecific for the protein of claim 1.
10. A DNA or RNA molecule which comprises a nucleotide sequence encoding the protein of claim 1.
11. An expression system for production of an agonist of FSH and LH which expression system comprises a first nucleotide sequence encoding the protein of claim 1 operably linked to control sequences for effecting the expression of said first nucleotide sequence.
12. The expression system of claim 11 which further contains a second nucleotide sequence encoding a signal peptide operably linked to the protein encoded by said first nucleotide sequence.
13. A host cell modified to contain the expression system of claim 11.
14. A host cell modified to contain the expression system of claim 12.

15. A method to produce a single-chain protein which is an agonist of FSH and LH which method comprises culturing the cells of claim 13 under conditions wherein said protein is produced; and
recovering said protein from the culture.

16. A method to produce a single-chain protein which is an agonist of FSH and LH which method comprises culturing the cells of claim 14 under conditions wherein said protein is produced; and
recovering said protein from the culture.

3. Detailed Description of Invention

Technical Field

The invention relates to a specific class of single-chain fertility hormones. The single-chain forms contain two β subunits upstream of the α subunit. The hormones of the invention have similar activities with respect to follicle stimulating hormone (FSH) function, but differing activities with respect to luteinizing hormone (LH) function. Thus, the compounds of the invention have variable ratios of FSH and LH activity.

Background Art

In humans, four important glycoprotein hormone heterodimers (LH, FSH, thyroid stimulating hormone (TSH) and chorionic gonadotropin CG) have identical α subunits and differing β subunits. Three of these hormones are present in virtually all other vertebrate species as well; CG has so far been found only in primates and in the placenta and urine of pregnant mares. FSH is an important hormone in regulating fertility; FSH has been used both *in vivo* and *in vitro* to enhance fertility. LH also appears to play a role in such treatments.

Two published PCT applications describe single chain forms of the four hormones FSH, LH, TSH and CG wherein the α and β unit are covalently linked to result in a fusion peptide of the general formulas:

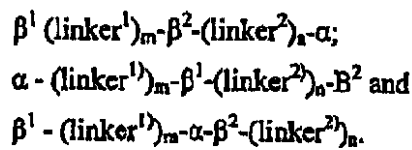
β (linker)_n α or

α (linker)_n β

wherein n is 0 or 1 and α and β represent the respective subunits of these hormones: Moyle, W.R., PCT application WO95/22340 published 24 August 1995 and the application of the inventor herein, WO96/05224 published 22 February 1996. The disclosure of these documents is incorporated herein by reference.

Forms of the above-described single-chain glycoprotein hormones in which the number of cystine bridges has been depleted are disclosed in US Serial No. 08/933,693 filed 19 September, 1997, and incorporated herein by reference.

PCT application published as WO99/25849, published 27 May 1999, discloses additional single-chain forms which contain two β subunits linked to a single α subunit. These proteins are of the formula:



This genus includes a large number of individual members and the publication does not focus on any particular subclass. The contents of this document are incorporated herein by reference.

In addition, PCT application PCT/US 99/23555 filed 12 October 1999 and also incorporated herein by reference, discloses additional forms of the hormones which contain two β subunits, but wherein one of the β subunits is bound non-covalently to a single-chain form containing a single β and an α subunit.

Of additional relevance to present invention are publications wherein the carboxy terminal peptide (CTP) of human chorionic gonadotropin or a variant thereof is used to modify pharmaceuticals in general, and these hormones in particular. Thus, PCT application publication number WO90/09800, published 7 September 1990, and incorporated herein by reference, describes various modified forms of these hormones, including C-terminal extension of the β subunit by CTP or a variant. Other muteins of these hormones are also described. "CTP" is the sequence of amino acids extending from any one of positions 112-118 to position 145 of the β subunit of human chorionic gonadotropin. In addition, PCT application publication number WO94/24148 published

27 October 1994, incorporated herein by reference, describes modifying these hormones and other compounds by extension or insertion of the CTP at locations other than the C-terminus and with CTP fragments shorter than the sequence extending from positions 112-118 to 145.

The CTP-extended β subunit of FSH is also described in two papers by applicants herein: LaPolt, P.S., *et al.*, *Endocrinology* (1992) 131:2514-2520 and Fares, F.A., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89:4304-4308. Both of these papers are incorporated herein by reference. Also incorporated by reference is an article by the inventors herein which describes the activity of a single-chain compound: FSH β -CG β - α : Masatoshi Kanda, *et al.*, *Molecular Endocrinology* (1999) 13: 1873-1881.

The crystal structure of the heterodimeric form of human chorionic gonadotropin has now been published in more or less contemporaneous articles; one by Lapthorn, A.J., *et al.*, *Nature* (1994) 369:455-461 and the other by Wu, H., *et al.*, *Structure* (1994) 2:545-558. The results of these articles are summarized by Patel, D.J., *Nature* (1994) 369:438-439.

PCT application WO91/16922 published 14 November 1991 describes a multiplicity of chimeric and otherwise modified forms of the heterodimeric glycoprotein hormones. In general, the disclosure is focused on chimeras of α subunits or β subunits involving portions of various α or β chains respectively. One construct simply listed in WO91/16922, and not otherwise described, fuses substantially all of the β chain of human chorionic gonadotropin to the α subunit preprotein, *i.e.*, including the secretory signal sequence for this subunit.

It has now been found that a particular subset of the genus of biofunctional single-chain compounds disclosed in the above-referenced PCT publication WO99/25849 have particularly advantageous properties when used in protocols for enhanced fertility *in vitro* and *in vivo*. In this subset, FSH activity is maintained at a level comparable to that of the native hormone, but LH activity is varied over a range generally lower than that of native LH.

Disclosure of the Invention

The present invention provides the following:

1. A glycosylated or nonglycosylated protein having agonist activity for FSH, and a lesser agonist activity for LH, of the formula

$$\text{FSH}\beta\text{-CTP-LH}\beta(1\text{-X})\text{-(linker)}_n\text{-}\alpha$$
 wherein FSH β is a vertebrate follicle stimulating hormone β subunit or a variant thereof;

CTP refers to the amino acid sequence at positions 112-118 to 145 of human chorionic gonadotropin β subunit or a variant thereof;

LH β (1-X) refers to a β subunit of a vertebrate luteinizing hormone containing positions 1-X where X is an integer of 114-121 or a variant thereof;

"linker" is a hydrophilic, flexible amino acid sequence containing 1-100 amino acid residues;

n is a 0 or 1; and

α is the α subunit of a vertebrate glycoprotein hormone or a variant thereof, with the proviso that if n is 1 and linker is complete CTP, X cannot be 114.
2. The protein of item 1 wherein n is 1.
3. The protein of item 2 wherein linker is a complete or partial CTP comprising at least one glycosylation site or a variant thereof.
4. The protein of item 1 wherein X is 119-121.
5. The protein of item 1 wherein FSH β is human FSH β , LH β is human LH β and α is the human alpha subunit.

6. The protein of item 1 which is FSH β -CTP-LH(1-121)-CTP- α or FSH β -CTP-LH(1-114)-CTP- α or FSH β -CTP-LH β (1-121)- α or FSH β -CTP-LH β (1-114)- α or FSH β -CTP-CG β - α .
7. A pharmaceutical composition which comprises the protein of item 1 in admixture with a suitable pharmaceutical excipient.
8. The protein of item 1 coupled to a solid support.
9. Antibodies immunospecific for the protein of item 1.
10. A DNA or RNA molecule which comprises a nucleotide sequence encoding the protein of item 1.
11. An expression system for production of an agonist of FSH and LH which expression system comprises a first nucleotide sequence encoding the protein of item 1 operably linked to control sequences for effecting the expression of said first nucleotide sequence.
12. The expression system of item 11 which further contains a second nucleotide sequence encoding a signal peptide operably linked to the protein encoded by said first nucleotide sequence.
13. A host cell modified to contain the expression system of item 11.
14. A host cell modified to contain the expression system of item 12.

15. A method to produce a single-chain protein which is an agonist of FSH and LH which method comprises culturing the cells of item 13 under conditions wherein said protein is produced; and
recovering said protein from the culture.

16. A method to produce a single-chain protein which is an agonist of FSH and LH which method comprises culturing the cells of item 14 under conditions wherein said protein is produced; and
recovering said protein from the culture.

The invention provides single-chain forms of fertility inducing hormones that have varying ratios of LH activity as compared to FSH activity. In general, the single-chain forms have FSH agonist activity comparable to the activity exhibited by equivalent amount of native FSH, but have LH agonist activity which is variable among the various embodiments of the class. Generally, the compounds have LH agonist activities in varying degrees, but typically less than that associated with the native hormone. The single-chain forms of the invention may either be glycosylated, partially glycosylated, or nonglycosylated and the FSH β is linked through CTP to LH β . The α subunit is downstream from both.

Thus, in one aspect, the invention is directed to a glycosylated or nonglycosylated protein of the formula



wherein " α " designates the common α subunit of the glycoprotein hormones or a variant thereof; FSH β refers to the β subunit of follicle stimulating hormone, CTP refers to the carboxy terminal peptide of chorionic gonadotropin β subunit as further defined hereinbelow, LH $\beta(1\text{-X})$ refers to the luteinizing hormone β subunit optionally containing deletion of up to seven amino acids from said carboxy terminus, "linker" is an amino acid sequence which is flexible and hydrophilic and may be CTP'; i.e., a complete or partial CTP. n is 0 or 1. However, if n = 1 and linker = CTP, X cannot be 114.

In other aspects, the invention is directed to recombinant materials and methods to produce the proteins of the invention, to pharmaceutical compositions containing them; to antibodies specific for them; and to methods for their use.

Modes of Carrying Out the Invention

Four "glycoprotein" hormones in humans provide a family which includes human chorionic gonadotropin (hCG), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and thyroid stimulating hormone (TSH). All of these hormones are heterodimers comprised of α subunits which, for a given species, are identical in amino acid sequence among the group, and β subunits which differ according to each member of the family. Thus, normally these glycoprotein hormones occur as heterodimers composed of α and β subunits that are non-covalently associated. Most vertebrates produce FSH, TSH and LH; chorionic gonadotropin has been found only in primates, including humans, and in pregnant mares.

In animals, the α and β subunit of each hormone are encoded by different genes and are synthesized separately and then assembled into the noncovalent heterodimeric complex. In the compounds of the invention the β subunits are covalently linked to an α subunit into a single-chain molecule which is essentially linear in primary structure. The three dimensional structure conferred by secondary and tertiary structural considerations and energy of conformation is apparently sufficiently similar to the heterodimeric form to permit the functionality of the heterodimer represented by the β subunits to be exhibited. The general properties of the genus of compounds which contain, in a single-chain, an α subunit and two β subunits, are described in the above cited PCT application publication WO99/25849. However, the compounds of the present invention, which form a very small subset of those described in the above cited PCT application, are particularly advantageous in the design of pharmaceuticals for inducing fertility.

In treating cells either *in vitro* or *in vivo* for induction of fertility, it is desirable to provide the effects of follicle stimulating hormone (FSH) as the major component. However, it is advantageous to provide a typically lesser, but nevertheless significant amount of activity with respect for receptors for chorionic gonadotropin/luteinizing

hormone. (The same receptor recognizes both CG and LH). The degree of LH activity that is desirable varies somewhat with the particular subject or cells to be treated, but it is typically substantially less than that of the FSH activity. The compounds of the present invention provide a group of biologically active molecules which share substantially the same agonistic activity as FSH but provide a range of LH activity ranging, typically, from an activity of about 1% of the FSH agonist stimulation to about 100% of the FSH agonist stimulation. This range is generated by manipulating the LH β component with respect to its level of glycosylation, with respect to the inclusion (or not) of a linker and linker length, and with respect to C terminal deletions as is further described below.

The Subunit Components

As used herein, the common α subunit, and FSH, LH, and CG β subunits as well as the heterodimeric forms have their conventional definitions and refer to the proteins having the amino acid sequences known in the art *per se*, or allelic variants thereof, regardless of the glycosylation pattern exhibited or other derivatization of the amino acid side chains.

"Native" forms of these peptides are those which have the amino acid sequences that have been isolated from the relevant vertebrate tissue, and have these known sequences *per se*, or those of their allelic variants. Included in this definition are the C-terminal truncations of the LH β subunit amounting to 7 or less amino acid deletions.

"Variant" forms of these proteins and of CTP units (see below) are those which have deliberate alterations, including truncations, in amino acid sequences of the native protein produced by, for example, site-specific mutagenesis or by other recombinant manipulations, or which are prepared synthetically.

These alterations consist of 1-5, preferably 1-3, and more preferably 1 amino acid changes, including deletions, and/or insertions, and/or substitutions, including in addition to non-conservative substitutions, conservative amino acid substitutions. The resulting variants must retain an activity that reflects that the native hormone -- *i.e.*, they must retain the biological activity of the native hormone so as to behave as agonists.

“Conservative analog” means, in the conventional sense, an analog wherein the residue substituted is of the same general amino acid category as that for which substitution is made. Amino acids have been classified into such groups, as is understood in the art, by, for example, Dayhoff, M., *et al.*, Atlas of Protein Sequences and Structure (1972) 5:89-99. In general, acidic amino acids fall into one group; basic amino acids into another; neutral hydrophilic amino acids into another; and so forth. More specific classifications are set forth in WO 96/05224 incorporated by reference above.

One set of preferred variants is that wherein the glycosylation sites of either the α or β subunits or both or of the CTP or partial CTP have been altered. Some useful variants of the hormone quartet described herein are set forth in U.S. Patent 5,177,193 issued 5 January 1993 and incorporated herein by reference. The glycosylation patterns can be altered by destroying the relevant sites, by adding one or more sites, or, in the alternative, by changing the host cell in which the protein is produced.

Variants also include those with noncritical regions altered or removed. Such deletions and alterations may comprise entire loops, so that sequences of considerably more than 10 amino acids may be deleted or changed. The resulting variants must, however, retain at least the receptor binding domains and the regions involved in signal transduction.

There is considerable literature on variants of the glycoprotein hormones and it is clear that a large number of possible variants which result in agonist activity can be prepared. Such variants are disclosed, for example, in Chen, F., *et al.*, *Molec Endocrinol* (1992) 6:914-919; Yoo, J., *et al.*, *J Biol Chem* (1993) 268:13034-13042; Yoo, J., *et al.*, *J Biol Chem* (1991) 266:17741-17743; Puett, D., *et al.*, Glycoprotein Hormones, Lusbader, J.W., *et al.*, EDS, Springer Verlag New York (1994) 122-134; Kuetmann, H.T., *et al.*, (*ibid*) pages 103-117; Erickson, L.D., *et al.*, *Endocrinology* (1990) 126:2555-2560; and Bielinska, M., *et al.*, *J Cell Biol* (1990) 111:330a (Abstract 1844).

Other variants include those wherein one or more cystine-bonds are deleted, typically by substituting a neutral amino acid for one or both cysteines which participate in the link. Particularly preferred cystine bonds which may be deleted are those between positions 26 and 110 and between positions 23 and 72.

As used herein "peptide" and "protein" are used interchangeably, since the length distinction between them is arbitrary.

"Noncritical" regions of the α and β subunits are those regions of the molecules not required for biological activity. In general, these regions are distant from binding sites, precursor cleavage sites, and catalytic regions. Regions critical for inducing proper folding, binding to receptors, catalytic activity and the like should be evaluated. It should be noted that some of the regions which are critical in the case of the dimer become noncritical in single chain forms since the conformational restriction imposed by the molecule may obviate the necessity for these regions. The ascertainment of noncritical regions is readily accomplished by deleting or modifying candidate regions and conducting an appropriate assay for the desired activity. Regions where modifications result in loss of activity are critical; regions wherein the alteration results in the same or similar activity are considered noncritical.

As used herein, the "CTP unit" refers to an amino acid sequence found at the carboxy terminus of human chorionic gonadotropin β subunit which extends from amino acid 112-118 to residue 145 at the C-terminus. Thus, each "complete" CTP unit contains 28-34 amino acids, depending on the N-terminus of the CTP.

By a "partial" CTP unit is meant an amino acid sequence which occurs between positions 112-118 to 145 inclusive, but which has at least one amino acid deleted from the shortest possible "complete" CTP unit (*i.e.*, from positions 118-145). These "partial" sequences are included in the definition of "variants" with respect to CTP. The "partial" CTP units contain at least one O-glycosylation site. The CTP unit contains four glycosylation sites at the serine residues at positions 121 (site 1); 127 (site 2); 132 (site 3); and 138 (site 4). The partial forms of CTP useful in agonists will contain one or more of these sites arranged in the order in which they appear in the native CTP sequence, although intervening sites may be omitted.

In the compounds of the present invention, FSH β represents the FSH β subunit from the appropriate species in essentially unaltered form except for the possible deletion, and/or insertion, and/or substitution of 1-5 amino acids wherein any substitution or insertion may be, but need not be conservative, in order to form variants. Thus, the

FSH β portion of the molecule, although minor variations are permitted, is essentially a constant feature.

The FSH β subunit is linked through a complete CTP linker to the downstream portion of the molecule. The CTP linker in this position is mandated. The linker will be, in this position, a complete CTP linker containing CG/ β amino acids 112-118 to 145. Again, only minor variants are included - *i.e.*, 1-5 amino acids substitutions, and/or insertions, and/or deletions. Such alterations must not effect the glycosylation sites.

The LH β (1-X) portion of the molecule is more variable. The designation 1-X represents the amino acid sequence of LH β included; X is 114-121. Thus, the LH β subunit may comprise only the N terminal 114 amino acids of the 121 which occur in the native human hormone or, of course, the corresponding positions of an LH β derived from a different species. Thus, the LH β may include positions 1-114, 1-115, 1-116, up to 1-121. In addition, the LH β subunit may contain 1-5 amino acid substitutions, and/or insertions, and/or deletions. Particularly preferred are substitution of amino acids of which are present in the corresponding positions in chorionic gonadotropin. Thus, an additional variable which permits alteration of the LH activity may be included by virtue of selected mutations which bridge the differences between LH β and CG β subunits. In general, LH in positions 1-121 is more hydrophobic than CG in the corresponding positions. It appears that intracellular activity is skewed in favor of CG; indeed, a preferred embodiment of the invention includes, in place of "LH β -linker," various truncated (or un-truncated) forms of CG β . Preferred embodiments of the invention include those wherein one or more of the amino acids present in the LH β moiety is replaced by the corresponding amino acid in CG β at that position.

There are 17 residues at positions 1-114 which are different in LH and CG β . All of the amino acids at positions 115-121 differ. By systematically replacing LH amino acids with those of CG β , the activity of the compound as a LH/CG receptor agonist can be altered. Thus, the specific replacements expand the compounds within the range of LH activities encompassed by the invention compounds.

The linker downstream of the LH β (1-X) is optional. The linker is a sequence of amino acids, typically, 1-100 amino acids, preferably 1-75 amino acids, preferably 1-50, and more preferably 1-40. The amino acid sequence should be flexible and hydrophilic. Typical amino acids for inclusion in the linker include glycine, serine, and repeating gly/ser sequences are preferred. A particularly preferred embodiment is CTP', which is a partial or complete CTP unit.

The α subunit and its variants are as defined herein for variants in general.

Particularly preferred embodiments of the hormones of the invention include, shown N-C:

FSH β -CTP-LH β (1-114)- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-115)- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-116)- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-117)- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-118)- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-119)- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-120)- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-121)- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-114)CTP'- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-115)CTP'- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-116)CTP'- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-117)CTP'- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-118)CTP'- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-119)CTP'- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-120)CTP'- α ; and

FSH β -CTP-LH β (1-121)CTP'- α

where CTP' represents a complete CTP.

Also preferred are the foregoing embodiments wherein the CTP' between the LH β subunits and the α subunit is a partial CTP.

Also preferred are embodiments similar to those listed wherein one or more amino acids of the LH β subunit residue are replaced by the corresponding amino acid from the CG β subunit. Thus, amino acids in any of the relevant positions in the region 1-114 can be replaced, so that 1-17 such substitutions can be made; in addition, any number of the amino acids in positions 115-121 of LH β subunit can be replaced by the corresponding amino acids in those positions in the CG β subunit. In one particularly preferred embodiment, all of such replacements have been made and the CTP linker to the α subunit is simply that naturally occurring in the CG β subunit. In addition, the CG β subunit can be further extended by at least a portion of CTP. The following embodiments exemplify, for illustration purposes only, the types of substitutions that can be made wherein the LH β subunit residue is "morphed" into a CG β subunit. The illustrations are set forth with respect to the human hormones, but similar substitutions may occur with respect to the hormones from other animal species.

FSH β -CTP-LH(1-114, H10R, M42T)-CTP'- α

FSH β -CTP-LH(1-116, T8R, N71D, L115F, S116Q)-CTP'- α

FSH β -CTP-LH(1-114, R2K, I15T, T53N, P83A)-CTP'- α

FSH β -CTP-LH(1-118, W8R, P51A, F82Y, G117D)-CTP'- α

FSH β -CTP-CG β - α

In the compounds set forth above, the standard one-letter amino acid code is used; the number indicates the position and the residue to the left is that of LH, that to the right is the residue from CG β ; thus, for example, "W8R" refers to an embodiment wherein the tryptophan residue of LH at position 8 is replaced by an arginine residue.

While for human use, the human forms of the α and β subunits are desirable, it should be noted that the corresponding forms in other vertebrates are useful in veterinary contexts. The FSH, TSH and LH subunits from bovine, ovine, equine, porcine, feline, canine, and other species are appropriate to indications affecting these species.

While not wishing to be bound by any theory, applicants believe that the LH activity of the molecule is enhanced by extending the C terminus of the LH component. Thus, it appears that the spectrum of activity ranges from compounds wherein LH β is present as positions 1-114 and CTP is not included (having the lowest activity) to embodiments wherein the LH β subunit is included in its entirety and further extended by CTP (to provide molecules of the greatest activity). The correlation is not, of course, perfect and will be influenced by any variations in the amino acid sequences of the components. Nevertheless, the foregoing provides some general guidance in constructing the range of activities desirable in the compounds of the invention; the LH agonist activity can generally be enhanced by extending the C-terminus sequence of the LH β subunit portion of the molecule and LH agonist activity can be diminished by decreasing the length of this extension.

Other Modifications

The single-chain proteins of the invention may be further conjugated or derivatized in ways generally understood to modify amino acid sequences, such as phosphorylation, glycosylation (both N- and O- linked), deglycosylation of ordinarily glycosylated forms, acylation, modification of amino acid side chains (e.g., conversion of proline to hydroxyproline) and similar modifications analogous to those posttranslational events which have been found to occur generally.

The glycosylation status of the hormones of the invention is particularly important. The hormones may be prepared in nonglycosylated form either by producing

them in prokaryotic hosts or by mutating the glycosylation sites normally present in the subunits and/or any CTP units that may be present. Both nonglycosylated versions and partially glycosylated versions of the hormones can be prepared by manipulating the glycosylation sites. Normally, glycosylated versions are, of course, also included within the scope of the invention.

As is generally known in the art, the single-chain proteins of the invention may also be coupled to labels, carriers, solid supports, and the like, depending on the desired application. The labeled forms may be used to track their metabolic fate; suitable labels for this purpose include, especially, radioisotope labels such as iodine 131, technetium 99, indium 111, and the like. The labels may also be used to mediate detection of the single-chain proteins in assay systems; in this instance, radioisotopes may also be used as well as enzyme labels, fluorescent labels, chromogenic labels, and the like. The use of such labels permits localization of the relevant receptors since they can be used as targeting agents for such receptors.

The proteins of the invention may also be coupled to carriers to enhance their immunogenicity in the preparation of antibodies specifically immunoreactive with these new modified forms. Suitable carriers for this purpose include keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) and diphtheria toxoid, and the like. Standard coupling techniques for linking the modified peptides of the invention to carriers, including the use of bifunctional linkers, can be employed.

Similar linking techniques, along with others, may be employed to couple the proteins of the invention to solid supports. When coupled, these proteins can then be used as affinity reagents for the separation of desired components with which specific reaction is exhibited. Thus, they are useful in the purification and isolation of the receptors with which the appropriate β subunit interacts.

Preparation Methods

Methods to construct the proteins of the invention are well known in the art. The most practical approach at present is to synthesize these materials recombinantly by expression of the nucleotide sequence encoding the desired protein. A nucleic acid containing the nucleotide sequence encoding the single-chain forms, including variants;

can be prepared from native sequences, or synthesized *de novo* or using combinations of these techniques. Techniques for site-directed mutagenesis, ligation of additional sequences, amplification such as by PCR, and construction of suitable expression systems are all, by now, well known in the art. Portions or all of the DNA encoding the desired protein can be constructed synthetically using standard solid phase techniques, preferably to include restriction sites for ease of ligation. Suitable control elements for transcription and translation of the included coding sequence can be provided to the DNA coding sequences. As is well known, expression systems are now available compatible with a wide variety of hosts, including prokaryotic hosts such as *E. coli* or *B. subtilis* and eucaryotic hosts such as yeast, other fungi such as *Aspergillus* and *Neurospora*, plant cells, insect cells, mammalian cells such as CHO cells, avian cells, and the like.

The choice of host is particularly pertinent to posttranslational events, most particularly including glycosylation. The location of glycosylation is mostly controlled by the nature of the glycosylation sites within the molecule; however, the nature of the sugars occupying this site is also influenced by the nature of the host. Accordingly, a fine-tuning of the properties of the hormones of the invention can be achieved by proper choice of host.

A particularly preferred form of gene for the α subunit portion, whether the α subunit is modified or unmodified, is the "minigene" construction. As used herein, the α subunit "minigene" refers to the gene construction disclosed in Matzuk, M.M., *et al.*, *Mol Endocrinol* (1988) 2:95-100, in the description of the construction of pM²/CG α or pM²/ α .

For recombinant production, modified host cells using expression systems are used and cultured to produce the desired protein. These terms are used herein as follows:

A "modified" recombinant host cell, *i.e.*, a cell "modified to contain" the recombinant expression systems of the invention, refers to a host cell which has been altered to contain this expression system by any convenient manner of introducing it, including transfection, viral infection, and so forth. "Modified cells" refers to cells containing this expression system whether the system is integrated into the chromosome or is extrachromosomal. The "modified cells" may either be stable with respect to inclusion of the expression system or the encoding sequence may be transiently

expressed. In short, recombinant host cells "modified" with the expression system of the invention refers to cells which include this expression system as a result of their manipulation to include it, when they natively do not, regardless of the manner of effecting this incorporation.

"Expression system" refers to a nucleic acid molecule which includes a coding nucleotide sequence to be expressed and those accompanying control sequences necessary to effect the expression of the coding sequence. Typically, these controls include a promoter, termination regulating sequences, and, in some cases, an operator or other mechanism to regulate expression. The control sequences are those which are designed to be functional in a particular target recombinant host cell and therefore the host cell must be chosen so as to be compatible with the control sequences in the constructed expression system.

If secretion of the protein produced is desired, an additional nucleotide sequence encoding a signal peptide is also included so as to produce the signal peptide operably linked to the desired single-chain hormone to produce the preprotein. During translation, the signal peptide is cleaved to release the mature single-chain hormone.

As used herein "cells," "cell cultures," and "cell lines" are used interchangeably without particular attention to nuances of meaning. Where the distinction between them is important, it will be clear from the context. Where any can be meant, all are intended to be included.

The protein produced may be recovered from the lysate of the cells if produced intracellularly, or from the medium if secreted. Techniques for recovering recombinant proteins from cell cultures are well understood in the art, and these proteins can be purified using known techniques such as chromatography, gel electrophoresis, selective precipitation, and the like.

All or a portion of the hormones of the invention may be synthesized directly using peptide synthesis techniques known in the art and synthesized portions may be ligated chemically or enzymatically.

Antibodies

The proteins of the invention may be used to generate antibodies specifically immunoreactive with these new compounds. These antibodies are useful in a variety of diagnostic and therapeutic applications.

The antibodies are generally prepared using standard immunization protocols in mammals such as rabbits, mice, sheep or rats, and the antibodies are filtered as polyclonal antisera to assure adequate immunization. The polyclonal antisera can then be harvested as such for use in, for example, immunoassays. Antibody-secreting cells from the host, such as spleen cells, or peripheral blood leukocytes, may be immortalized using known techniques and screened for production of monoclonal antibodies immunospecific with the proteins of the invention. "Antibodies" include any fragment which retains the required immunospecificity, such as F_{ab} , F_{ab}' , $F_{(ab)2}$, F_v and so forth. Thus, the antibodies may also be prepared using recombinant techniques, typically by isolating nucleotide sequences encoding at least the variable regions of monoclonal antibodies with the appropriate specificity and constructing appropriate expression systems. This approach permits any desired modification such as production of F_v forms, chimeric forms, "humanized" forms and the like.

By "immunospecific for the proteins of the invention" is meant antibodies which specifically bind the referent compound of the invention, but not the heterodimers or any of the included subunits *per se* or any single-chain forms which include only a single β subunit, within the general parameters considered to determine affinity or nonaffinity. It is understood that specificity is a relative term, and an arbitrary limit could be chosen, such as a difference in specific binding of 100-fold or greater. Thus, an immunospecific antibody included within the invention is at least 100 times more reactive with the specified protein than with the corresponding heterodimers, prior art single-chain forms or separate subunits. Such antibodies can be obtained, for example, by screening for those that bind the invention compounds and discarding those that also bind the heterodimers, subunits or prior art single-chain forms set forth in WO95/22340, WO96/05224, and WO99/25849.

Formulation and Methods of Use

The proteins of the invention are formulated and administered using methods comparable to those known for the heterodimers corresponding to them. Thus, formulation and administration methods will vary according to the particular hormone or hormone combination used. However, the dosage level and frequency of administration may be altered as compared to the heterodimer, especially if CTP units are present in view of the extended biological half life due to its presence.

Formulations for proteins of the invention are those typical of protein or peptide drugs such as found in Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, Mack Publishing Company, Easton, PA. Generally, proteins are administered by injection, typically intravenous, intramuscular, subcutaneous, or intraperitoneal injection, or using formulations for transmucosal or transdermal delivery. These formulations generally include a detergent or penetrant such as bile salts, fusidic acids, and the like. These formulations can be administered as aerosols or suppositories or, in the case of transdermal administration, in the form of skin patches. Oral administration is also possible provided the formulation protects the peptides of the invention from degradation in the digestive system.

Optimization of dosage regimen and formulation is conducted as a routine matter and as generally performed in the art. These formulations can also be modified to include those suitable for veterinary use.

The compounds of the invention may be used in many ways, most evidently as substitutes for the heterodimeric forms of the hormones. Thus, like the heterodimers, the agonist forms of the single-chain hormones of the invention can be used in treatment of infertility, as aids in *in vitro* fertilization techniques, and other therapeutic methods associated with the native hormones. These techniques are applicable to humans as well as to other animals. The choice of the single-chain protein in terms of its species derivation will, of course, depend on the subject to which the method is applied.

The invention compounds are also useful as reagents in a manner similar to that employed with respect to the heterodimers.

In addition, the compounds of the invention may be used as diagnostic tools to detect the presence or absence of antibodies that bind to the native proteins to the extent

such antibodies bind to the relevant portions of these single chain compounds in biological samples. They are also useful as control reagents in assay kits for assessing the levels of these hormones in various samples. Protocols for assessing levels of the hormones themselves or of antibodies raised against them are standard immunoassay protocols commonly known in the art. Various competitive and direct assay methods can be used involving a variety of labeling techniques including radio-isotope labeling, fluorescence labeling, enzyme labeling and the like.

The compounds of the invention are also useful in detecting and purifying receptors to which the native hormones bind. Thus, the compounds of the invention may be coupled to solid supports and used in affinity chromatographic preparation of receptors or antihormone antibodies. The resulting receptors are themselves useful in assessing hormone activity for candidate drugs in screening tests for therapeutic and reagent candidates. Of course, account must be taken of the dual specificity of the β subunits since the β subunits are different.

Finally, the antibodies uniquely reactive with the compounds of the invention can be used as purification tools for isolation of these materials in their subsequent preparations. They can also be used to monitor levels of these compounds administered as drugs.

The following examples are intended to illustrate but not to limit the invention.

Example 1

Preparation of Invention Compounds

Expression vectors were prepared for production of the proteins and their secretion from Chinese hamster ovary (CHO) cells. The compounds that were prepared and tested are as follows:

FSH β -CTP-LH β (1-114)- α ;

FSH β -CTP-LH β (1-121)- α ; and

FSH β -CTP-LH β (1-114)-CTP- α .

Also constructed is an expression vector for the production of:

FSH β -CTP-LH β (1-121)-CTP- α .

Example 2

Binding of the LH or FSH Receptor

The compounds of Example 1 were tested for their ability to compete with I-125 labeled hCG or FSH heterodimers as appropriate. The procedures for assay are those set forth in Kanda, M., *et al.*, *Mol Endocrinol* (1999) 13:1873-1881, cited above and incorporated herein by reference.

Briefly, for assessing binding to the CG/LH receptor, CHO cells expressing human LH receptor (4×10^5 /tube) were incubated with one ng labeled CG in competition with increasing concentrations of unlabeled CG as a standard or with increasing amounts of the samples to be tested, at 22°C for 18 hours. The decrease in label in the presence of sample measures the binding ability in the sample. The results are shown in Figure 1.

As shown, none of the constructs shows activity comparable to that of the CG heterodimer (solid diamonds). However, the construct FSH β -CTP-LH β (1-114)-CTP- α (solid circles and single cross line) provides an EC₅₀ approximately 10 fold more than the native hormone. The construct FSH β -CTP-LH(1-121)- α (solid squares and solid triangles) shows a still somewhat greater EC₅₀. It does not appear that the construct FSH β -CTP-LH β (1-114)- α exhibits much activity at all in this assay (open circles and crosses).

In a comparable assay testing ability of the compounds to bind the FSH receptor displayed on CHO cells in competition with I-125 labeled FSH, in protocol otherwise identical to that set forth above, all of the compounds showed roughly comparable FSH receptor binding activity. See Figure 2. The construct FSH β -CTP-LH β (1-114)-CTP- α (solid and open circles) appears slightly more effective than the remaining molecules tested, including recombinant FSH heterodimer.

Example 3

Agonist Activity With Respect to LH

Some of the compounds of the invention were tested for their ability to stimulate cyclic AMP production in CHO cells that display the CG/LH receptor or the FSH receptor. The procedure was that of Kanda, *et al.*, (1999) cited above. Briefly, the total extracellular

and intracellular amount of cAMP was determined using the Adenyl Cyclase Activation Flash Plate Kit (NEN Life Science Products, Boston MA) as per the manufacturer's instructions. CHO cells (5×10^4 cells per well) expressing either the LH/CG or FSH receptor were incubated with ligand for 2 hours at room temperature. cAMP labeled with I-125 was added and the cells were incubated for an additional 16-18 hours at room temperature. The flash plates were read in a Packard Top gamma counter and each experiment was performed 2-3 times. The cAMP content was expressed in pmol/ml.

Figures 3A and 3B show the results for CG/LH agonist activity. As indicated, the construct FSH β -CTP-LH β (1-114) CTP- α (solid squares or crosses) was somewhat less effective than heterodimeric recombinant hCG (CR127, solid diamonds) in this assay; however, the compound was much more effective than the construct FSH β -CTP-LH β (1-114)- α (solid triangles). The control FSH, as expected does not provide a response in these cells.

Figures 4A and 4B show the results for FSH agonist activity. As expected, hCG (solid squares) is not able to generate cAMP in cells displaying the FSH receptor; however, FSH heterodimer (solid diamonds) does so. Both compounds of the invention tested, FSH β -CTP-LH β (1-114)- α (solid triangles) and FSH β -CTP-LH β (1-114) CTP- α (crosses) provided responses comparable to those of heterodimeric recombinant FSH.

4. Brief Description of drawings

Figure 1 shows the binding of various compounds of the invention to the LH receptor in competition with labeled hCG.

Figure 2 shows the binding of various compounds of the invention to the FSH receptor in competition with FSH.

Figures 3A and 3B show the ability of various compounds of the invention to induce the production of cyclic AMP in CHO cells modified to produce the LH/CG receptor.

Figures 4A and 4B show the ability of various compounds of the invention to induce the production of cyclic AMP in CHO cells modified to produce the FSH receptor.

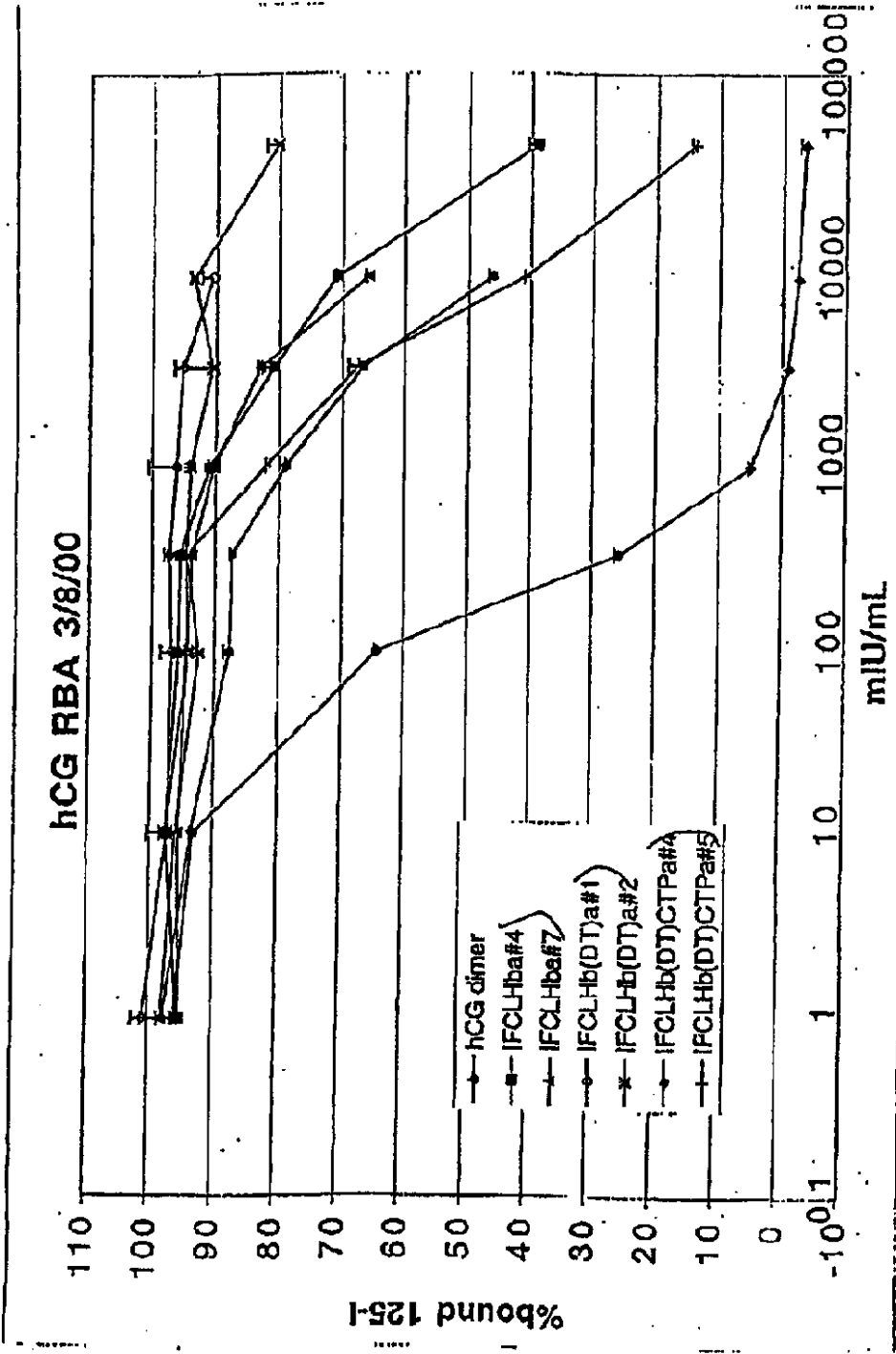


Figure 1

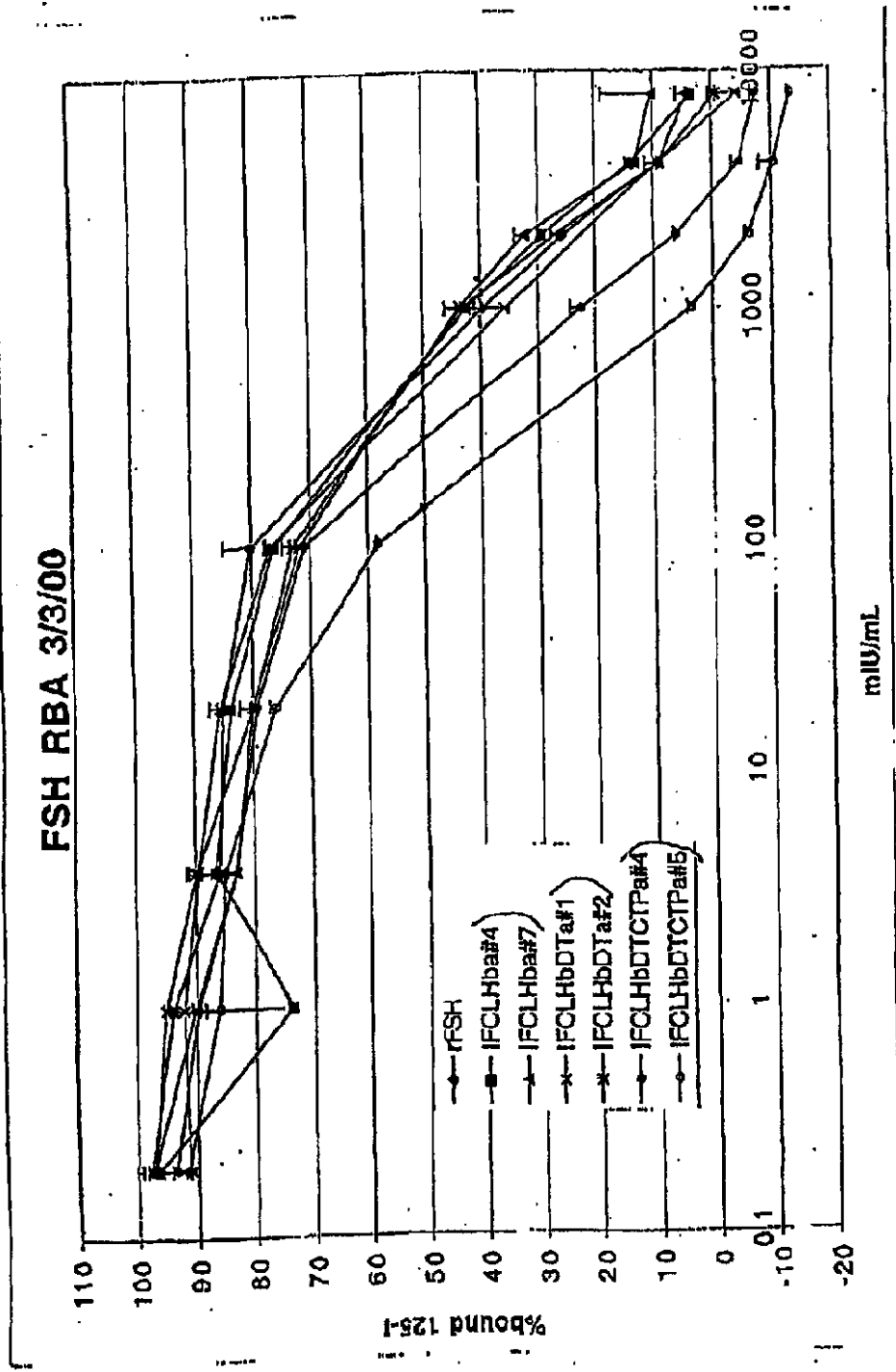


Figure 2

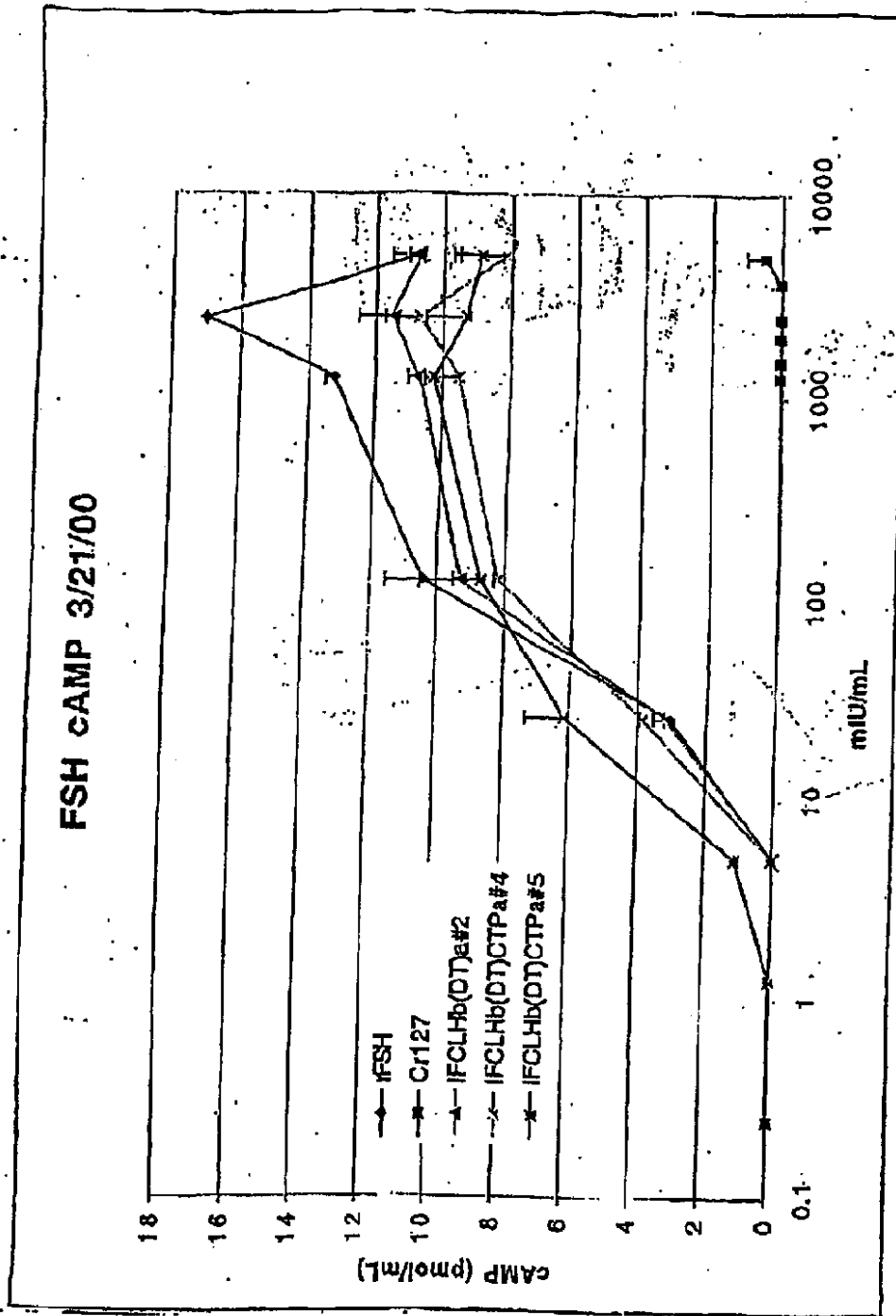


Fig 4A

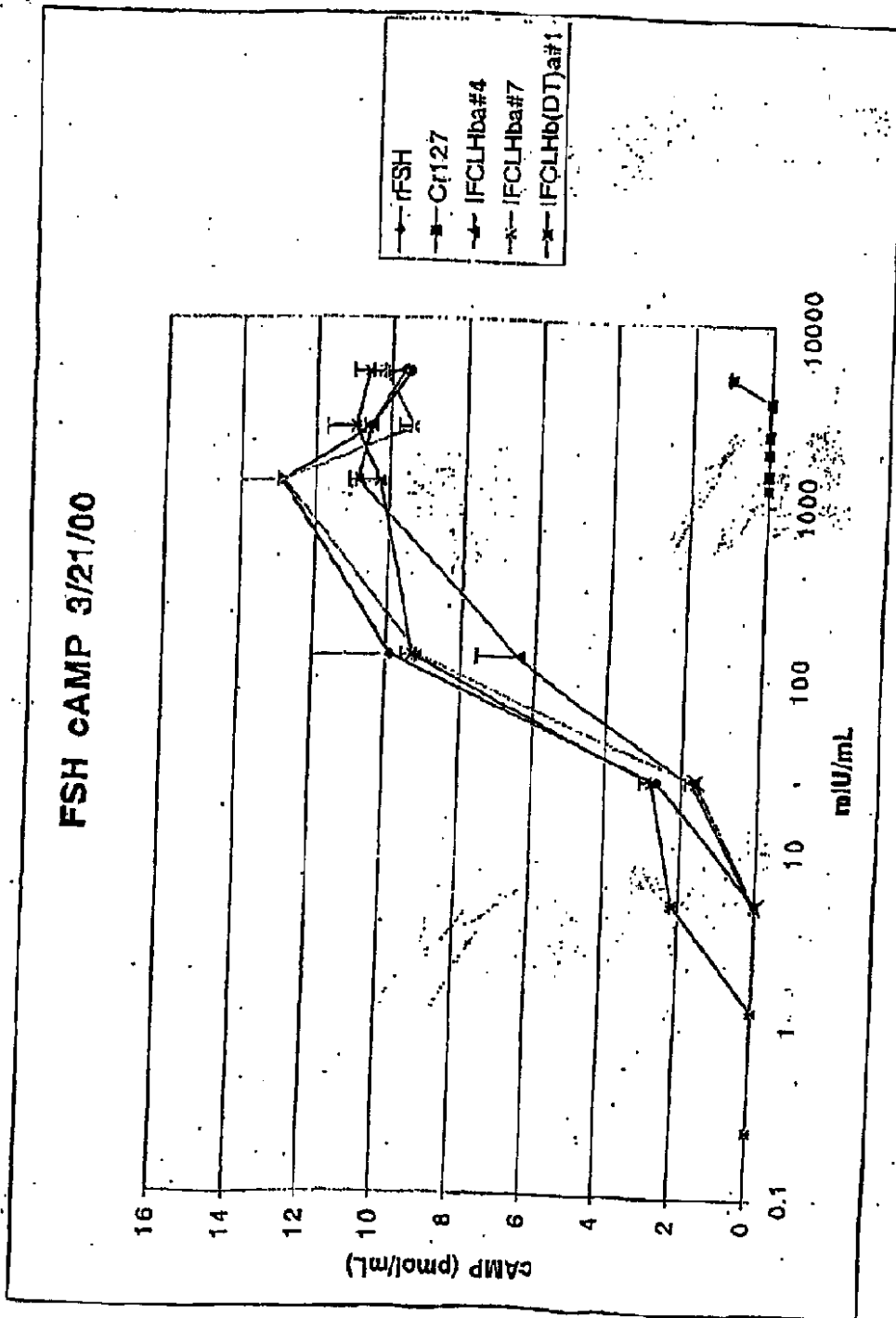


Fig. 4B

1. Abstract

Glycosylated or nonglycosylated proteins of the formula

$\text{FSH}\beta\text{-CTP-LH}\beta(1\text{-X})\text{-(linker)}_n\text{-}\alpha$

wherein FSH β is a vertebrate follicle stimulating hormone β subunit or a variant thereof;

CTP refers to the amino acid sequence at positions 112-118 to 145 of human chorionic gonadotropin β subunit or a variant thereof;

LH β (1-X) refers to a β subunit of a vertebrate luteinizing hormone containing positions 1-X where X is an integer of 114-121 or a variant thereof;

linker is an amino acid sequence of 1-100 amino acids, preferably a complete CTP as defined above or a partial CTP comprising at least one glycosylation site;

n is a 0 or 1; and

α is the α subunit of a vertebrate glycoprotein hormone or a variant thereof

are useful in protocols to enhance fertility in humans and in animals.

2. Representative Drawings

None

