SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287191

(21) Číslo prihlášky: **221-97**
(22) Dátum podania prihlášky: **17. 8. 1995**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **8. 2. 2010**
Vestník ÚPV SR č.: **2/2010**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **08/483 211, 08/438 431, 08/347 563, 08/292 345**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **7. 6. 1995, 10. 5. 1995, 30. 11. 1994, 17. 8. 1994**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, US, US, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 2. 1998**
Vestník ÚPV SR č.: **02/1998**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **28. 1. 2010**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US95/10479**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO96/05309**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2010):

C12N 15/12
C07K 14/435
C12Q 1/68
C12N 1/19
C12N 1/21
C07K 16/18
C12N 15/16
A61K 8/30
A61K 38/00
A61K 48/00

(73) Majiteľ: **THE ROCKEFELLER UNIVERSITY, New York, NY, US;**

(72) Pôvodca: **Friedman Jeffrey M., New York, NY, US;**
Zhang Yiying, New York, NY, US;
Proenca Ricardo, Astoria, NY, US;
Maffei Margherita, New York, NY, US;
Halaas Jeffrey L., New York, NY, US;
Gajiwala Ketan, New York, NY, US;
Burley Stephen K., New York, NY, US;

(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Obezitný polypeptid modulujúci telesnú hmotnosť, jeho analógy, zodpovedajúce nukleové kyseliny a farmaceutický prostriedok s jeho obsahom**

(57) Anotácia:
Predložený vynález sa týka obezitného polypeptidu OB obsahujúceho 145 až 167 aminokyselín, ktorý moduluje telesnú hmotnosť zvierat, kde tento obezitný polypeptid OB obsahuje aminokyselinové sekvencie SEQ ID č. 2, 4, 5 alebo 6.

SK 287191 B6

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka regulácie telesnej hmotnosti ľudí a zvierat a najmä sa týka modulátorov telesnej hmotnosti.

Doterajší stav techniky

Obezita, definovaná ako nadbytok telesného tuku v prirodzenej telesnej hmote, je spojená s vážnymi psychologickými a zdravotnými ťažkosťami, ako je hypertenzia, zvýšená hladina tukov v krvi, diabetes mellitus typ II alebo diabetes mellitus nezávislý od inzulínu (NIDDM). V Spojených štátoch amerických trpí NIDDM 6 až 10 miliónov pacientov vrátane 18 % populácie staršej ako 65 rokov [Harris *et* al., *Int. J. Obes.*, 11: 275 až 283 (1987)]. Približne 45 % mužov a 70 % žien trpiacich NIDDM je obéznych a ich diabetes možno podstatne zmierniť alebo celkom vyliečiť znížením telesnej hmotnosti [Harris, *Diabetes Care,* 14(3): 639 - 648 (1991)]. Ako bude uvedené ďalej, sú obezita a NIDDM silne dedičné, aj keď gény nesúce príslušnú predispozíciu ešte neboli identifikované. Molekulárna genetická podstata týchto metabolických porúch je významný, hoci zatiaľ málo objasnený problém.

Asimilácia, uchovanie a využitie energie zo živín je súčasťou komplexného vnútorného systému, veľmi dôležitého na existenciu mnohobunkových živočíchov. Pre suchozemské cicavce sú veľké zásoby metabolického paliva, napr. triglyceridov, v tukových tkanivách kritické na prekonanie obdobia bez potravy. Nutnosť udržiavať energetické zásoby na stálej hladine bez toho, aby priebežne dochádzalo k zmenám veľkosti a tvaru tela, vyžaduje rovnováhu medzi príjmom a výdajom energie. Mechanizmy regulácie energetickej rovnováhy na molekulárnej úrovni je však nutné najprv objasniť. Izolácia molekúl, ktoré vedú nutričné informácie a ovplyvňujú energetickú rovnováhu, bude kľúčom k pochopeniu regulácie telesnej hmotnosti zdravého aj chorého organizmu.

Individuálna hladina adipozity je do značnej miery daná geneticky. Sledovanie miery zhody v telesnej hmotnosti a adipozite medzi mono- a dizygotnými dvojčatami, adoptívnymi deťmi a ich biologickými rodičmi ukázalo, že dedičnosť obezity (0,4 - 0,8) prevyšuje dedičnosť mnohých iných vlastností zvyčajne považovaných za dedičné, ako je schizofrénia, alkoholizmus a ateroskleróza [Stunkjard *et al. N. Engl. J. Med.*, 322: 1438 - 1487 (1990)]. Podobnosti z hľadiska miery výdajov energie medzi príbuznými boli tiež opísané [Bogardus *et. al., Diabetes,* 35: 1 - 5 (1986)]. Genetická analýza geograficky ohraničených populácií naznačila, že relatívne malý počet génov je príčinou 30 - 50 % odlišnosti v telesnej stavbe [Moll *et. al., Am. J. Hum. Genet.*, 49: 1243 - 1255 (1991)]. Genetické mapovanie a chromozomálne umiestnenie génu zodpovedného za obezitu populácie však doteraz nebolo vykonané.

Na hlodavčích obezitných modeloch bolo nájdených sedem zrejmých mutácií v jednom géne. Najlepšie sú preštudované mutácie na myších obezitných modeloch v génoch *OB* (obezity) a *DB* (diabetes). Pokiaľ nie sú *OB* a *DB* prítomné v geneticky rovnakom druhu, je výsledkom metabolicky a behaviorálne nerozlíšiteľný fenotyp, čo označuje, že tieto gény pôsobia rovnakou fyziologickou cestou [Coleman *et. al., Diabetológia,* 14: 141 - 148 (1978)]. Homozygótne myši od oboch mutácií sú hyperalergické a hypometabolické a vyvinú obézny fenotyp zrejmý už vo veku jedného mesiaca. Ich hmotnosť sa stabilizuje na 60 až 70 g (oproti 30 až 35 g kontrolných myší). *OB* a *DB* zvieratá manifestujú mnohé ďalšie hormonálne a metabolické zmeny, ktoré sťažujú rozpoznanie primárnej poruchy vyvolanej mutáciou [Bray *et. al., Am. J. Clin. Nutr.*, 50: 891 - 902 (1989)].

Na všetkých hlodavčích obezitných modeloch boli pozorované zmeny v metabolizme uhľovodíkov pripomínajúce ľudský diabetes typ II. V niektorých prípadoch závisí stupeň diabetes sčasti od histórie myšacieho kmeňa [Leiter, *Endocrinology,* 124: 912 - 922 (1989)]. Tak *OB,* ako aj *DB* kongénne C57B1/Ks myši vyvinuli ťažký diabetes s konečnou nekrózou β buniek a atrofiou ostrovčekov vedúcou k relatívnej inzulínopenii. Naproti tomu *OB* aj *DB* kongénne C57B1/6J myši vyvinuli prechodný inzulín-rezistentný diabetes, ktorý môže byť kompenzovaný hypertrofiou β buniek pripomínajúcou ľudský diabetes typ II.

Fenotyp *OB* a *DB* myší pripomína ľudskú obezitu inak než rozvinutý diabetes - mutantné myši prijímajú viac potravy a vydávajú menej energie ako chudé kontrolné myši (podobne ako obézni ľudia). Tento fenotyp tiež pripomína zvieratá s porušeným ventromediálnym hypotalamom, čo naznačuje, že obidve mutácie interferujú so schopnosťou správne prijímať alebo reagovať na nutričné informácie v rámci centrálneho nervového systému. Túto hypotézu podporujú aj výsledky parabiotických experimentov [Coleman, *Diabetológia,* 9: 294 - 298 (1973)], podľa ktorých *OB* myši majú nedostatočný cirkulujúci faktor pocitu sýtosti a *DB* myši sú rezistentné proti účinkom *OB* faktora (pravdepodobne vďaka defektu OB receptora). Z experimentov vyplýva, že obezita mutantných myší môže viesť k rôznym defektom v aferentnej kľučke a/alebo integračnom centre predpokladaného spätnoväzobného mechanizmu regulujúceho stavbu tela.

Pri využití molekulárnych a klasických genetických markerov boli mapované *OB* a *DB* gény a bolo zistené, že sa nachádzajú na počiatku chromozómu 6, respektíve v polovici chromozómu 4 [Bahary *et. al., Proc.*

Natl., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8642 - 8646 (1990); Friedman *et. Al., Genomics,* 11: 1054 - 1062 (1991)]. V obidvoch prípadoch zasahujú mutácie oblasti myšacieho genómu zhodné s ľudskými, čo znamená, že pokiaľ existujú ľudské homológy *OB* a *DB,* pravdepodobne budú mutácie zasahovať ľudské chromozómy 7q respektíve 1p. Defekty *OB* génu vedú k obezite aj u ďalších druhov cicavcov u geneticky krížených krýs Zucker *FA/FA* s Brown Norway +/+ je *FA* mutácia (krysí chromozóm 5) napadnutá v rovnakom mieste ako u *DB* myší [Truett *et. al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 88: 7806 - 7809 (1991)].

Vzhľadom na mnoho faktorov, ktoré môžu ovplyvňovať telesnú hmotnosť, nebolo možné predvídať, ktoré faktory a najmä ktoré homeostatické mechanizmy primárne určujú telesnú hmotnosť. Základným predmetom predkladaného vynálezu sú teda modulátory telesnej hmotnosti so schopnosťou regulovať adippozitu a obsah tukov.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je obezitný polypeptid OB obsahujúci 145 až 167 aminokyselín, ktorý moduluje telesnú hmotnosť zvierat, kde tento obezitný polypeptid OB obsahuje aminokyselinové sekvencie SEQ ID č. 2, 4, 5 alebo 6.

Podľa predkladaného vynálezu je problém regulácie adipozity a obsahu tukov u zvierat, najmä cicavcov, riešený na úrovni obezitných (OB) polypeptidov a nukleových kyselín, ktoré tieto peptidy kódujú. Predkladaný vynález poskytuje najmä izolované polypeptidy schopné modulovať, t. j. kontrolovať a regulovať telesnú hmotnosť a adipozitu. Predkladaný vynález taktiež prináša sekvencie nukleových kyselín kódujúcich tieto polypeptidy, čo umožňuje rekombinantnú produkciu OB polypeptidov a použitie samotných nukleových kyselín ako modulátorov telesnej hmotnosti.

Obezitné (OB) polypeptidy podľa predkladaného vynálezu obsahujúce 145 až 167 aminokyselín modulujúce telesnú hmotnosť zvierat, najmä cicavcov. Medzi OB polypeptidy patria aj ich alelické varianty alebo analógy vrátane fragmentov, ktoré majú rovnakú biologickú aktivitu. OB polypeptidy možno pripraviť rekombinantnými alebo chemickými postupmi. Výhodné predkladané OB polypeptidy sú polypeptidy s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID č. 2, 4, 5 alebo 6 a ich alelické varianty alebo analógy vrátane fragmentov.

Imunogénne fragmenty OB polypeptidov predkladaného vynálezu zahŕňajú: Val-Pro-Ile-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr (SEQ ID č. 18); Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala (SEQ ID č.19); Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp (SEQ ID č. 20); a Ser-Arq-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys (SEQ ID č. 21).

Ľudské analógy OB polypeptidov majú aminokyselinovú sekvenciu zodpovedajúcu SEQ ID č.4 a 6, v ktorých je jedna alebo niekoľko aminokyselín z aminokyselín 53, 56, 71, 85, 89, 92, 95, 98, 110, 118, 121, 122, 126, 127, 128, 129, 132, 139, 157, 159, 163 a 166 (číslované podľa SEQ ID č. 4) substituovaných inými aminokyselinami, napríklad divergentnými aminokyselinami myšacieho OB polypeptidu SEQ ID č. 2 alebo alanínom. Ľudské analógy OB polypeptidov zahŕňajú polypeptidy, v ktorých je:

(a) serín v polohe 53 substituovaný glycínom, alanínom, valínom, cysteínom, metionínom alebo treonínom;
(b) serín v polohe 98 substituovaný glycínom, alanínom, valínom, cysteínom metionínom alebo treonínom; a
(c) arginín v polohe 92 substituovaný asparagínom, lyzínom, histidínom, glutamínom, kys. glutámovou, aspartovou, serínom, treonínom, metionínom alebo cysteínom. Analóg OB polypeptidu predkladaného vynálezu je výhodne z 83 % alebo viac sekvenčne homológový so sekvenciou ľudského OB polypeptidu SEQ ID č. 2, 4, 5 alebo 6.

Dodatočné ľudské analógy OB polypeptidov majú aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č. 4 a 6 a majú:
(a) jeden alebo niekoľko zvyškov kys. aspartovej substituovaných kys. glutámovou;
(b) jeden alebo niekoľko zvyškov izoleucínu substituovaných leucínom;
(c) jeden alebo niekoľko zvyškov glycínu alebo valínu substituovaných alanínom;
(d) jeden alebo niekoľko zvyškov arginínu substituovaných histidínom;
(e) jeden alebo niekoľko zvyškov tyrozínu alebo fenylalanínu substituovaných tryptofánom;
(f) jeden alebo niekoľko zvyškov v polohách 121 až 128 (číslované podľa SEQ ID č. 4) substituovaných glycínom alebo alanínom;
(g) jeden alebo niekoľko zvyškov v polohách 54 až 60 alebo 118 až 166 (číslované podľa SEQ ID č. 4) substituovaných lyzínom, kys. glutámovou, cysteínom alebo prolínom.

Výhodné skrátené analógy ľudského OB polypeptidu predkladaného vynálezu zahŕňajú polypeptidy (číslované podľa SEQ ID č. 4), v ktorých:
(a) je deletovaný jeden alebo niekoľko zvyškov v polohách 121 až 128;
(b) sú deletované zvyšky 1 až 116;
(c) sú deletované zvyšky 1 až 21 a 54 až 167;

(d) sú deletované zvyšky 1 až 60 a 117 až 167;
(e) sú deletované zvyšky 1 až 60;
(f) sú deletované zvyšky 1 až 53; a
(g) analóg podľa bodu (a), v ktorom sú deletované zvyšky 1 až 21. Predkladané OB polypeptidy a OB analógy, ktoré nemajú 21. aminokyselinovú „signálnu" sekvenciu (napr. aminokyseliny 1 až 21, číslované podľa SEQ ID č. 4) môžu obsahovať N-terminálnu aminokyselinu alebo aminokyselinovú sekvenciu ako sú (1) metionín, (2) glycín-serín-histidín-metionín (SEQ ID č. 38), (3) metionín-glycín-serín-serínhistidín-histidín-histidín-histidín-histidín-histidín-histidín-serín-serín-glycín-leucín-valín-prolín-arginín-glycín-serín-histidín-metionín (SEQ ID č. 98), (4) leucín-kys. glutámová-lyzín-arginín-kys. glutámová-alanín-kys. glutámová-alanín (SEQ ID č. 26), (5) kys. glutámová-alanín-kys. glutámová-alanín (SEQ ID č. 27), (6) leucín-kys. glutámová-lyzín-arginín (SEQ ID č. 28), (7) metionín-glycín-serín-serín-histidín-histidín-histidín-histidín-histidín-histidín-serín-serín-glycín-leucín-valín-prolín-arginín-glycín-serín-prolín (SEQ ID č. 99) a (8) glycín-serín-prolín.

Deriváty predkladaného OB polypeptidu obsahujú jednu alebo niekoľko naviazaných chemických skupín vrátane polymérov rozpustných vo vode, ako je polyetylénglykol. Polypeptidy derivatizované polyetylénglykolom môžu byť mono-, di-, tri- alebo tetrapegylované, napr. N-terminálne monopegyláty. Výhodné N-terminálne monopegyláty OB polypeptidov predkladaného vynálezu zahŕňajú OB polypeptidy obsahujúce aminokyseliny 22 až 167 zo SEQ ID č. 4 alebo aminokyseliny 22 až 166 zo SEQ ID č. 6, a prípadne ešte (pegylovaný) metionín v polohe 21.

Izolované molekuly nukleových kyselín predkladaného vynálezu kódujú OB polypeptid, jeho alelický variant alebo analóg vrátane fragmentov. Dôležité sú najmä molekuly DNA, ktoré zaisťujú expresiu biologicky aktívneho OB polypeptidu s aktivitou modulátoru telesnej hmotnosti cicavcov, teda DNA zo skupiny zahŕňajúcej:
(a) molekuly DNA so sekvenciou zodpovedajúcou SEQ ID č. 1 a 3 alebo alebo ich fragmenty;
(b) molekuly DNA hybridizujúce s DNA uvedenou v bode (a) alebo ich hybridizujúce fragmenty; a
(c) molekuly DNA kódujúce expresiu aminokyselinovej sekvencie kódovanej DNA definovanou v bodoch (a) a (b). Ilustratívnym príkladom je ľudská genómová DNA so sekvenciou SEQ ID č. 22 a 24.

Výhodné DNA molekuly predkladaného vynálezu kódujú polypeptid s aminokyselinovou sekvenciou:
(a) SEQ ID č. 2;
(b) aminokyseliny 22 až 167 zo SEQ ID č. 2;
(c) SEQ ID č. 4;
(d) aminokyseliny 22 až 167 zo SEQ ID č. 4;
(e) SEQ ID č. 5;
(f) aminokyseliny 22 až 166 zo SEQ. ID č. 5; a
(g) SEQ ID č. 6;
(h) aminokyseliny 22 až 166 zo SEQ ID č. 6, rovnako ako polypeptidy obsahujúce N-terminálnu aminokyselinu alebo sekvenciu aminokyselín, ako boli uvedené. Napríklad výhodná DNA predkladaného vynálezu je DNA kódujúca polypeptid s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID č. 3, najmä sekvenciou aminokyselín 22 až 167.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje vektory obsahujúce predkladanú DNA, výhodne expresné vektory, v ktorých je predkladaná DNA operatívne pripojená k expresnej kontrolnej sekvencii. Tieto vektory alebo predkladaná DNA slúži na transformáciu alebo transfekciu jednobunkových hostiteľských buniek. Výhodnými hostiteľmi sú baktérie, kvasinky, bunkové tkanivá buniek cicavcov, rastlín a hmyzu. Vhodné hostiteľské bunky možno voliť zo skupiny zahŕňajúcej *E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces,* kvasinky, CHO, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, BMT10 a Sf9. Medzi výhodné hostiteľské kvasinky patria *Saccharomyces, Pichia, Candida, Hansenula* a *Torulopsis.* Predkladaný vynález ďalej poskytuje bunky cicavcov obsahujúce DNA kódujúcu OB polypeptid, ktoré boli *in vitro* modifikované na vyššiu expresiu OB polypeptidu homológovou rekombinantnou technikou, spočívajúcou v inzercii expresnej regulačnej sekvencie do funkčnej blízkosti sekvencie kódujúcej OB polypeptid. Expresná regulačná frekvencia môže, ale nemusí byť expresnou sekvenciou OB polypeptidu a môže v bunke nahrádzať mutantnú regulačnú sekvenciu OB polypeptidu.

Predkladaný vynález poskytuje postupy prípravy OB polypeptidu zahŕňajúce:
(a) kultiváciu buniek v podmienkach umožňujúcich expresiu OB polypeptidu; a
(b) spôsob odoberania exprimovaného polypeptidu. Postup môže byť doplnený ešte ďalšími krokmi:
(c) chromatografia polypeptidu na Ni-chelatačnej kolóne; a
(d) purifikácia polypeptidu gélovou filtráciou.

Podľa výhodného uskutočnenia vynálezu možno medzi krokmi (c) a (d) zaradiť ionexovú chromatografiu OB polypeptidu na kolóne silného katexu.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje značené aj neznačené monoklonálne a polyklonálne protilátky špecifické k predkladanému OB polypeptidu a nesmrteľné bunkové línie produkujúce predkladané monoklonálne protilátky. Príprava protilátok predkladaného vynálezu zahŕňa:

(a) konjugáciu OB polypeptidu k proteínovému nosiču;
(b) imunizáciu hostiteľa zmesou konjugátu fragment OB polypeptidu/proteínový nosič podľa kroku (a) a adjuvans; a (c) spôsob odobratia protilátky z imunizovaného zvieraťa.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje postupy stanovenia prítomnosti OB polypeptidu vo vzorke zahŕňajúcej:
(a) kontakt vzorky obsahujúcej predpokladaný OB polypeptid s protilátkou (výhodne naviazanou na pevný nosič), ktorá špecificky viaže OB polypeptid v podmienkach podporujúcich tvorbu reakčného komplexu OB polypeptid-protilátka; a
(b) detekciu tvorby reakčného komplexu OB polypeptid-protilátka vo vzorke potvrdzujúcej prítomnosť OB polypeptidu. Vynález tiež poskytuje postupy *in vitro* stanovenia hladiny OB polypeptidu v biologickej vzorke zahŕňajúcej:
(a) detekciu tvorby reakčného komplexu v biologickej vzorke, ako je opísané; a
(b) stanovenie množstva vzniknutého reakčného komplexu, ktoré zodpovedá hladine OB polypeptidu prítomného vo vzorke. Pri zistení alebo diagnóze choroby spojenej so zvýšenou hladinou OB polypeptidu predkladaného vynálezu, možno uskutočniť stanovenie hladiny prítomného OB polypeptidu a uskutočniť porovnanie s hladinou OB polypeptidu normálneho subjektu alebo so staršou hodnotou hladiny OB polypeptidu testovaného subjektu. Zvýšená hladina OB polypeptidu proti normálu alebo staršej hodnote naznačuje chorobu sprevádzanú zvýšenou hladinou OB polypeptidu a znížená hladina OB polypeptidu proti normálu alebo staršej hodnote naznačuje chorobu sprevádzanú zníženou hladinou OB polypeptidu. Predkladaný vynález umožňuje monitorovať *in vitro* postup terapie chorôb súvisiacich so zvýšenou alebo zníženou hladinou OB polypeptidu cicavcov, spočívajúci v stanovení obsahu OB polypeptidu v sérii biologických vzoriek odohraných pacientovi v rôznych časových fázach liečby.

Farmaceutické prípravky predkladaného vynálezu obsahujú OB polypeptid a farmaceuticky prijateľný nosič. Sú určené na liečebné postupy zamerané na zníženie telesnej hmotnosti cicavcov. Ďalšie farmaceutické prípravky predkladaného vynálezu sú určené na liečebné postupy zamerané na zvýšenie telesnej hmotnosti cicavcov. Tieto prípravky obsahujú antagonistu OB polypeptidu, výhodne volený zo skupiny zahŕňajúcej: protilátky, ktoré viažu OB polypeptid a neutralizujú jeho aktivitu; fragment OB polypeptidu, ktorý viaže, ale neaktivuje OB receptor; malé molekuly antagonistov OB polypeptidu. Predkladaný vynález ďalej poskytuje kozmetické prípravky znižujúce alebo zvyšujúce telesnú hmotnosť, určené na vylepšenie telesného vzhľadu. Kozmetické prípravky sa podávajú v dostatočných dávkach, umožňujúcich reguláciu telesnej hmotnosti na požadovanú úroveň.

Predkladaný vynález ďalej zahŕňa použitie nukleových kyselín aj anti-sensy nukleových kyselín hybridizujúcich s nukleovou kyselinou kódujúcou OB polypeptid, na výrobu liečiv (napr. na génovú terapiu) modifikujúcich telesnú hmotnosť cicavcov. Vynález tiež zahŕňa použitie predkladaných antagonistov OB polypeptidu na prípravu liečiv modifikujúcich telesnú hmotnosť cicavcov. Vyvinuté liečivá možno použiť na modifikáciu telesnej hmotnosti cicavcov pri liečbe porúch zo skupiny zahŕňajúcej diabetes, vysoký krvný tlak, vysoký obsah cholesterolu, a ako súčasť kombinovanej terapie spolu s liečivom určeným na tieto choroby. Tieto liečivá možno podávať intravenózne, intraarteriálne, intraperitoneálne, intramuskulárne, subkutánne, nazálne, perorálne alebo pulmonálne.

Z predkladaných údajov vyplýva, že OB polypeptidy predkladaného vynálezu sú sekrétované adipocytmi cicavcov a plnia hormonálne funkcie.

Uvádzané príklady ukazujú, že OB polypeptid, alternatívne označovaný ako „leptín", cirkuluje v myšej, krysej a ľudskej plazme. Leptín nebol nájdený v plazme *OB/OB* myší a je prítomný v desaťnásobnej koncentrácii v plazme *DB/DB* myší a v dvadsaťnásobnej koncentrácii v plazme *FA/FA* krýs. Každodenná injekcia rekombinantného leptínu dramaticky znižuje telesnú hmotnosť *OB/OB* myší, podstatne ovplyvňuje telesnú hmotnosť divokých myší a nemá žiadny účinok na *DB/DB* myši.

Ďalším rysom predkladaného OB polypeptidu je, že polypeptid pochádzajúci z jedného živočíšneho druhu je aktívny aj v inom druhu. Konkrétne ľudský OB polypeptid je aktívny v myšiach.

Modulátory predkladaného vynálezu zahŕňajú nukleové kyseliny, ako sú rekombinantné DNA molekuly (napr. cDNA alebo vektor obsahujúci cDNA alebo izolovaná genómová DNA) alebo klonované gény (t. j. izolovaná genómová DNA), alebo ich degenerované varianty kódujúce polypeptidy s aktivitou modulátorov regulácie telesnej hmotnosti, alebo konzervatívne varianty či fragmenty týchto polypeptidov, najmä fragmenty s chýbajúcim signálnym peptidom (alternatívne označované ako maturované OB polypeptidy) s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID č. 2 (obr. 1 (A až E)), SEQ ID č. 4 (obr. 3), SEQ ID č. 5 (obr. 5) a SEQ ID č. 6 (obr. 6). Konkrétne sú uvedené aminokyselinové sekvencie dvoch variantov myšacieho a ľudského OB polypeptidu. Pri obidvoch polypeptidoch bol deletovaný glutamín v polohe 49, čo môže výsledkom anomálneho spájania mRNA. OB polypeptidy z rôznych biologických druhov môžu byť vysoko homológové, podľa obr. 4 sú myšací a ľudský OB polypeptid homológové z viac ako 80 %.

Predkladané nukleové kyseliny, rekombinantné molekuly DNA alebo klonované gény majú kódujúcu nukleotidovú sekvenciu SEQ ID č. 1 (obr. 1 (A až E) a SEQ ID č. 3 (obr. 2 (A a B)), alebo sú k týmto sek-

venciám komplementárne. Tieto molekuly nukleových kyselín môžu byť cDNA alebo genómová DNA izolovaná z chromozómu. Predkladané nukleové kyseliny môžu mať tiež sekvenciu zodpovedajúcu 5' a 3' okrajovým sekvenciám kódujúcej DNA a sekvenciám intrónov DNA. Predkladaný vynález zahŕňa aj identifikáciu nukleových kyselín so sekvenciami SEQ ID č. 1 (obr. 1 (A až E)) a SEQ ID č. 6 (obr. 2 (A a B)), ich degenerovanými variantmi, alelickými variantmi a ďalšími príbuznými molekulami.

Predkladané nukleové kyseliny sú molekuly DNA alebo RNA vrátane príslušných syntetických variantov obsahujúcich fosfátové alebo analógové napr. tiofosfátové väzby. Uvažované sú sekvencie jednovláknového a dvojvláknového usporiadania reťazcov.

Predkladaný vynález ďalej zahŕňa nukleové kyseliny použiteľné ako molekulové próby alebo ako priméry pre polymerázovú reťazovú reakciu (PCR), t. j. syntetické alebo prirodzené oligonukleotidy s nukleotidovou sekvenciou zodpovedajúcou časti sekvencií SEQ ID č. 1 (obr. 1 (A až E)), SEQ ID č. 3 (obr. 2 (A a B)) a SEQ ID č. 22 a 24 (obr. 20 (A až C)); alebo 5' a 3' okrajovým sekvenciám kódujúcej DNA; alebo sekvenciám intrónov genómovej DNA. Predkladaný vynález uvažuje molekuly DNA s minimálnou dĺžkou 10 nukleotidov, zodpovedajúcou rovnako dlhým úsekom zo sekvencií SEQ ID č. 1 (obr. 1 (A až E)), SEQ ID č. 3 (obr. 2 (A a B)) a SEQ ID č. 22 (obr. 20 (A až C)), alebo z príslušných komplementárnych sekvencií. Sekvencia obsahuje najvýhodnejšie najmenej 20 nukleotidov. Podľa uskutočnenia vynálezu, kde bol oligonukleotid použitý ako próba, bol tento oligonukleotid detegovateľne značený, napr. rádioizotopom (^{32}P) alebo enzýmom.

Predkladaný vynález ďalej prináša klonovací vektor obsahujúci predkladané nukleové kyseliny kódujúce OB polypeptid; a expresný vektor baktérií, hmyzu alebo cicavcov obsahujúci predkladané nukleové kyseliny kódujúce OB polypeptid, v operatívnej s expresnou kontrolnou sekvenciou. Predkladaný vynález sa teda tiež týka hostiteľských buniek, ako sú baktérie, kvasinky, bunky hmyzu alebo cicavcov, transfekovaných alebo transformovaných príslušným expresným vektorom a využitie týchto systémov na výrobu predkladaných modulátorov telesnej hmotnosti.

Predkladaný vynález ďalej zahŕňa protilátky, ktoré viažu OB polypeptid. Tieto protilátky možno generovať imunizáciou celým polypeptidom alebo antigénnym fragmentom. Je možné použiť ako inhibítory funkcie polypeptidu (t. j. modulácie telesnej hmotnosti a obsahu tuku v tele). Protilátky možno taktiež použiť pri stanovení hladiny polypeptidu v obehu, t. j. v plazme alebo sére. Oblastne špecifické protilátky, zvlášť monoklonálne protilátky, možno využiť ako próby štruktúry OB polypeptidu.

Všetky uvedené látky možno ako modulátory telesnej hmotnosti a obsahu tuku v tele použiť v mnohých súvislostiach. Konkrétne, celý súbor tu definovaných modulátorov telesnej hmotnosti vrátane nukleových kyselín a peptidov, má diagnostické a terapeutické využitie a využitie v poľnohospodárstve. Moduláciu telesnej hmotnosti, sprostredkovanú podaním jedného alebo niekoľkých predkladaných modulátorov, možno špecificky terapeuticky využiť v prípadoch nežiaducej obezity alebo naopak kachexie.

Modulácia telesnej hmotnosti cicavcov spočíva v regulácii expresie proteínu kódovaného nukleovou kyselinou zo skupiny sekvencií SEQ ID č. 1 (obr. 1 (A až E)), SEQ ID č. 3 (obr. 2 (A a B)) a ich degenerovaných a alelických variantov. Zavedenie týchto sekvencií génovou terapiou do tukových buniek pacienta alebo hostiteľa vedie k regulácii či zníženiu obezity. Naopak podanie antagonistov nukleotidových sekvencií, ako sú anti-sense molekuly, je indikované v prípadoch významných strát hmotnosti, napríklad pri liečbe mentálnej anorexie, rakoviny alebo AIDS. Rovnako ako nukleové kyseliny sú antagonistné prípravky zavádzané priamo do tukových buniek, kde vyvolávajú plánované zmeny.

Proteíny so sekvenciami SEQ ID č. 1, SEQ ID č. 4, SEQ ID č. 5 a SEQ ID č. 6 (obr. 1 (A až E), 3, 5 a 6), ich konzervatívne varianty, aktívne fragmenty a príbuzné malé molekuly, možno teda priamo terapeuticky využiť pri znižovaní alebo regulácii nadmerného množstva tuku alebo hmotnostného prírastku. Na druhej strane možno k uvedeným proteínom pripraviť protilátky a iné antagonistné prípravky a podávať ich v prípadoch, keď je požadovaný opačný účinok. Predkladaný vynález je teda výhodne zameraný na farmaceutické prípravky obsahujúce predkladaný OB polypeptid alebo naopak príslušný antagonist a farmaceuticky prijateľný nosič alebo excipient.

Predkladaný OB polypeptid možno taktiež podávať ako súčasť kozmetických prípravkov, napr. na vylepšenie telesného vzhľadu znížením tukových zásob. OB polypeptid možno užívať samostatne alebo ako súčasť kozmetického postupu, napr. kozmetického chirurgického zákroku.

Diagnostické použitie predkladaných nukleotidových sekvencií a zodpovedajúcich peptidov rozširuje význam nukleových kyselín pri identifikácii ďalších mutácií ich alelických variantov, lebo tak vzniká súbor aktívneho materiálu využiteľného na diagnostické a liečebné účely. Konkrétne možno rozpoznať homozygótne a heterozygótne nukleotidické mutácie, presnejšie kvantifikovať stav pacientov a určiť riziko rozvoja obezity. V súčasnosti sa zdá, že heterozygótne mutácie sú spojené s miernou až strednou obezitou a homozygótne mutácie sú spojené s pokročilou až vážnou obezitou. S využitím súboru aktívneho materiálu možno uskutočňovať zodpovedajúce testovanie DNA a uľahčiť dlhodobú prognózu určitých tendencií tak, aby bolo možné odvrátiť hroziaci rizikový stav včasným zavedením zmien v stravovaní a iných osobných zvykoch, alebo priamo začatím terapie.

Diagnostické využitie predkladaného vynálezu zahŕňa aj postupy stanovenia a kvantifikácie predkladaných modulátorov v bunkových vzorkách alebo biologických extraktoch (alebo vzorkách) odobraných od testovaných subjektov; a to tak hladiny nukleových kyselín (genómová DNA alebo mRNA), ako aj proteínov. Ak je známe, že zvýšená aktivita nukleotidových sekvencií a prítomnosť príslušného proteínu odráža schopnosť pacienta inhibovať obezitu, môže ošetrujúci lekár pri analýze príslušných výsledkov obéznej osoby stanoviť, aký iný faktor než disfunkcia vyvolaná prítomnosťou a aktivitou nukleotidových sekvencií predkladaného vynálezu, mohol obezitu ovplyvniť. Na druhej strane znížené hladiny nukleotidových sekvencií a/alebo expresných proteínov naznačujú, že liečba obezity vyžaduje ich zvýšenie a že je nutné vypracovať príslušný terapeutický plán.

Stanovené nukleotidové sekvencie uvedené na obr. 1 (A až E) a 2 (A a B) predstavujú cDNA využiteľnú na stanovenie zodpovedajúcej mRNA. Podobne možno pripraviť rekombinantné proteíny zodpovedajúce polypeptidom na obr. 1 (A až E) a 3, príslušne ich označiť a použiť napr. na stanovenie tuku a/alebo OB proteínu v plazme rádioimunoesejí alebo na detekciu a kvantifikáciu OB receptorov v tkanivách, napr. v hypotalame.

Predkladaný vynález sa zaoberá nielen identifikáciou predkladaných nukleotidových sekvencií a zodpovedajúcich proteínov, ale tiež objasnením ich receptorov. Táto úloha vyžaduje pripraviť polypeptidy na obr. 1 (A až E), 3, 5 a/alebo 6 a využiť ich na prehľadanie príslušnej expresnej knižnice a na izoláciu aktívnych receptorov. Receptory možno ďalej klonovať a využiť samotné alebo spolu s ligandom na vyhľadávanie malých molekúl s predpokladanou modulátorovou aktivitou.

Predkladaný vynález sa ďalej týka farmaceutických prípravkov obsahujúcich predkladané modulátory, výhodne polypeptidy so sekvenciami SEQ ID č. 2, SEQ ID č. 4, SEQ ID č. 5 a SEQ ID č. 6, ich protilátky, zodpovedajúce malé agonistné alebo antagonistné molekuly alebo aktívne fragmenty. Tieto farmaceutické prípravky sú formulované tak, aby vyhovovali rôznym cestám administrácie podľa terapeutického zámeru. Prípravky ďalej obsahujú farmaceuticky prijateľné nosiče alebo iné adjuvans a sú pripravované v rozmanitých dávkových rozmedziach účinnej zložky tak, aby ich vo všetkých prípadoch mohol ošetrujúci lekár ľahko predpísať.

Hlavným predmetom predkladaného vynálezu sú modulátory telesnej hmotnosti, ako tu boli definované, v dostatočne čistej forme, majúce požadované charakteristiky a aktivitu regulátorov adipozity a telesného obsahu tukov cicavcov.

Ďalším predmetom predkladaného vynálezu sú spôsoby detekcie a stanovenia modulátorov telesnej hmotnosti na efektívnu diagnostiku a monitorovanie patologických stavov súvisiacich so zmenami hladín týchto modulátorov.

Ďalším predmetom predkladaného vynálezu je spôsob vyhľadania a z neho vychádzajúci testovací systém na vyhľadanie látok, ako sú liečivá, činidlá, a pod., ktoré napodobňujú alebo inhibujú aktivitu predkladaných modulátorov cicavcov.

Ďalším predmetom predkladaného vynálezu je spôsob liečby cicavcov spočívajúci v regulácii telesnej hmotnosti a telesného obsahu tukov cicavcov a/alebo spôsob liečby niektorých patologických stavov, pre ktoré je charakteristické abnormálne zníženie alebo zvýšenie telesnej hmotnosti.

Ďalším predmetom predkladaného vynálezu je príprava genetických systémov na génovú terapiu a/alebo príslušných farmaceutických prípravkov, ktoré obsahujú alebo vychádzajú z jedného alebo niekoľkých modulátorov, ich väzobných partnerov, činidiel regulujúcich ich produkciu alebo napodobňujúcich či inhibujúcich ich aktivitu.

Ďalšie predmety predkladaného vynálezu a jeho prínos budú odborníkom v odbore zrejmé z nasledujúceho prehľadu a vysvetľujúcich obrázkov.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 (A až E) uvádza nukleotidovú sekvenciu SEQ ID č. 1 a zodpovedajúcu aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č. 2 odvodené pre myšaciu OB cDNA. Po prvých 39 bp od 5' konca nasleduje predpovedaných 167 aminokyselín otvoreného čítacieho rámca a približne 3,7 kB 3' nepredloženej sekvencie. (V predchádzajúcej patentovej prihláške por. č. 08/347 563, predloženej 30. 11. 1994 a por. č. 08/438 431, predloženej 10. 5. 1995, bolo určené, že dodatočná 58 bp dlhá 5'-nekódujúca sekvencia je artefaktom klonovania. Tento artefakt nemá žiadny vzťah ku kódujúcej oblasti, ani k 39 bp 5'-nekódujúcej oblasti génu). Je uvedené celé množstvo asi 2500 bp 3'-nepredloženej sekvencie. Analýza predpovedanej aminokyselinovej sekvencie, uskutočnená ručne aj na počítači v programe *SigSeg*, naznačuje prítomnosť signálnej sekvencie (podčiarknuté). Bola pozorovaná mikroheterogenita cDNA; približne 70 % cDNA kyselín má glutamínový kodón v polohe 49 a 30 % kyselín ho nemá (pozri obr. 5 a 6, ďalej). Aminokyselina glutamín je podčiarknutá, podobne ako argilínový kodón, ktorý je pri C57B1/6J *OB/OB* myší (myší 1J) mutovaný.

Obr. 2 (A a B) uvádza nukleotidovú sekvenciu SEQ ID č. 3 odvodenú pre ľudskú OB cDNA. Nukleotidy sú očíslované od 1 do 701, štartovacie miesto je v polohe 46 aterminačné v polohe 550.

Obr. 3 uvádza celú vydedukovanú aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č. 4 odvodenú pre ľudský *OB* gén, zodpovedajúcu nukleotidovej sekvencii na obr. 2 (A a B). Aminokyseliny sú očíslované od 1 do 167. Signálna sekvencia štiepneho miesta nasleduje za aminokyselinou 21 (Ala), takže maturovaný proteín začína aminokyselinou 22 (Val) a končí aminokyselinou 167 (Cys).

Obr. 4 uvádza porovnanie myšej (SEQ ID č. 2) a ľudskej (SEQ ID č. 4) vydedukovanej aminokyselinovej sekvencie. Vydedukovaná aminokyselinová sekvencia ľudského OB proteínu je vysoko homológová s myším OB proteínom. Konzervatívne zmeny sú označené pomlčkou, nekonzervatívne zmeny hviezdičkou. Variabilný glutamínový kodón je podčiarknutý rovnako ako nonsense mutácia pri C57B1/6J *OB/OB* myší (1J). Na úrovni aminokyselín bola pozorovaná 83 % identita, aj keď bolo nájdených len osem substitúcií v oblasti medzi valínom na kodóne 22 (po smere, hneď za signálnou sekvenciou) a cysteínom v polohe 117.

Obr. 5 uvádza celú aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č. 5 odvodenú pre myší *OB* gén, ako je uvedený na obr. 3, s chýbajúcim glutamínom v polohe 49. Aminokyseliny sú očíslované od 1 do 166. Signálna sekvencia štiepneho miesta nasleduje za aminokyselinou 21 (Ala) (teda, s deletovaním glutamínu 49), maturovaný proteín začína aminokyselinou 22 (Val) a končí aminokyselinou 166 (Cys).

Obr. 6 uvádza celú vydedukovanú aminokyselinovú sekvenciu (SEQ ID č. 6) odvodenú pre ľudský *OB* gén a zodpovedajúcu nukleotidovej sekvencii na obr. 4, s chýbajúcim glutamínom v polohe 49. Aminokyseliny sú očíslované od 1 do 166. Signálna sekvencia štiepneho miesta nasleduje za aminokyselinou 21 (Ala) (teda s deletovaním glutamínu 49), maturovaný proteín začína aminokyselinou 22 (Val) a končí aminokyselinou 167 (Cys).

Obr. 7 (A) Fyzická mapa umiestnenia *OB* na myšacom chromozóme a klonovacie mapy YAC a P1. „M a N" zodpovedá reštrikčným miestam *Mul*I a *Not*I. Číslovanie zodpovedá jednotlivým zvieratám, u ktorých bola nájdená rekombinantná oblasť *OB* po 1606 meiózach. Označenie Met, Pax 4, D6Rck39, D6Rck13 a Cpa sa vzťahujú na väzbové miesta DNA prób v rámci oblasti *OB*. YAC boli izolované pomocou prób D6Rckl3 a Pax 4, konce boli obnovené s využitím vektora PCR a/alebo uvoľnením plazmidu a použité opäť pri izolácii ďalších YAC. (B) Výsledná sada YAC. Jedna oblasť YAC tejto sady, Y902A0925, bola chimérna. Próby použité pri analýze genotypu rekombinantných zvierat sú uvedené v zátvorkách. (6) je YAC 107, (5) je M16(+) alebo M16(pLUS); (4) je *adu*(+); (3) je *aad*(pICL) ; (2) je 53(pICL); a (1) je 53(+). (C) P1 sada klonov bakteriofágu P1 izolovaná pomocou vybratých YAC koncových prób. Gén *OB* bol izolovaný v P1 klone s využitím vzdialeného konca YAC YB6S2F12 (koniec (4)) (alternatívne označený ako *adu*(+)).

Obr. 8 ukazuje fotografiu 192 nezávislých izolátov po odfarbení etídium bromidom zo štvrtého experimentu zameraného na vyhľadanie exónov po amplifikácii PCR a ich charakterizácii.

Obr. 9 ukazuje fotografiu PCR-amplifikovaných klonov s predpokladaným *OB* po odfarbení etídium bromidom. Každý zo 7 klonov, ktorý neobsahuje artefakt, bol opakovane PCR-amplifikovaný a rozdelený elektroforézou na 1 % agarózovom géli v TBE a odfarbený etídium bromidom. Marker veľkosti (ľavá neočíslovaná dráha) je komerčný „1 kB ladder". Dráha 1 -- klon 1D12 obsahujúci „HIV sekvenciu". Dráha 2 -- klon 1F1, nový klon z oblasti mimo *OB*. Dráha 3 --klon 1H3. Dráha 4 -- klon 2B2, identický s 1F1. Dráha 5 -- klon 2G7, obsahujúci *OB* exón. Dráha 6 -- klon 2G11, identický s 1F1. Dráha 7 -- klon 2H1 neobsahujúci inzert.

Obr. 10 uvádza sekvenciu klonu 2G7 (SEQ ID č. 7), ktorá obsahuje exón kódujúci časť génu *OB*. Primárna sekvencia použitá na amplifikáciu tohto exónu je označená rámčekom SEQ ID č. 8 a 9.

Obr. 11. (A) Reverzná transkripčná PCR-analýza mRNA z rôznych tkanív jednej myši s využitím priméru 2G7 a priméru aktínového. Reakcie RT-PCR boli uskutočňované na 100 ng celkovej RNA reverzne prepísanej do prvého reťazca cDNA, pri syntéze bol ako primér použitý oligo-dT. PCR amplifikácia bola uskutočňovaná v 35 cykloch, v nasledujúcich podmienkach: denaturácia 94 °C, 1 min.; hybridizácia 55 °C, 1 min.; a extenzia 72 °C, 2 min. a 1 min. druhej autoextenzie v každom cykle. Produkty RT-PCR boli analyzované elektroforézou v 2 % agarózovom géli pri nízkej teplote topenia v 1 x TBE pufri. (B) Northernové blotovanie mRNA z rôznych orgánov myši s PCR značenou próbou 2G7. 10 μg celkovej RNA z každého jednotlivého tkaniva bolo rozdelené elektroforézou na agarózovom géli s formaldehydom. Próba bola hybridizovaná pri 65 °C v Rapid Hybe (Amersham). Autorádiografické signály boli zrejmé po 1 h expozície; uvedený výsledok je po 24 h expozícii.

Obr. 12. (A) Elektroforetický záznam odfarbený etídium bromidom z RT-PCR reakcie uskutočnenej na RNA z tukových buniek (biele adipózne tkanivo) jednotlivých myších kmeňov. Totálna RNA (100 ng) z každej vzorky bola reverzne prepísaná s využitím oligo-dT s reverznej transkriptázy a výsledná jednovláknová cDNA bola amplifikovaná PCR s 2G7 primérmi (nižšie pásy) alebo s aktínovými primérmi (vyššie pásy). Obidva typy primérov, 2G7 aj aktín, boli v PCR reakcii použité súčasne. Produkty boli analyzované na 1 % agarózovom géli v TBE. (B) Northernová analýza zodpovedajúca bodu (A). RNA (10 μg) z tukových buniek (biele adipózne tkanivo) jednotlivých myších kmeňov bola rozdelená elektroforézou a analyzovaná pomocou PCR značených prób 2G7 ako na obr. 11B. Približne 20-násobný vzrast hladiny 2G7 mRNA bol zrejmý u

RNA z bieleho tukového tkaniva myší C57B1/6J *OB/OB* (1J) oproti chudým zvieratám z rovnakého vrhu. Ani v jednom z experimentov, RT-PCR alebo northernovom, sa neobjavil detegovateľný signál pre 2G7 v RNA z myší SM/Ckc-+$^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}$, dokonca ani po dvojtýždňovej expozícii. Uvedený výsledok je po 24 h expozícii. Rovnaký filter bol hybridizovaný s aktívnoou próbou (dolná časť obrázku).

Obr. 13 ukazuje northernovú analýzu dodatočných zvierat 2J a kontrol, potvrdzujúcu neprítomnosť *OB* mRNA u zvierat 2J. Northernová analýza bola uskutočnená podľa opisu obr. 11 a 12. Ako kontrola bola použitá RNA ap2, transkript z tukového tkaniva. Rôzna intenzita pásov ap2 nie je významná.

Obr. 14 porovnáva DNA sekvenciu C57B1/6J (normálnych) a C57B1/6J *OB/OB* (1J) myší v oblasti bodovej mutácie, ktorá vedie ku vzniku prematurovaného stop kodónu (nonsence mutácia) v cDNA mutantného kmeňa. U myši *OB/OB* došlo k mutácii C->T a teda k zmene arginínu v polohe 105. Zmena bázy bola potvrdená automatickým sekvenátorom DNA. Na RNA z bieleho tukového tkaniva obidvoch druhov myší (+/+ a *OB/OB)* bola uskutočnená RT-PCR s primármi z 5' a 3' neprelożených oblastí. Produkty RT-PCR boli purifikované na géli a sekvenované ručne aj na automatickom sekvenátore Applied Biosystems, Inc. 373A s primármi pozdĺž obidvoch vlákien kódujúcej sekvencie.

Obr. 15. (A) Southernovo blotovanie genómovej DNA z jednotlivých myších kmeňov. Približne 5 µg DNA (DNA izolovaná z pečene, ľadvín alebo sleziny) bolo štiepených reštrikčným enzýmom. Potom bola DNA rozdelená elektroforézou na 1 % agarózovom géli v TBE a analyzovaná PCR značenou próbou 2G7. Reštrikčné štiepenie *Bgl*II odhalilo vzrast fragmentu *Bgl*II s veľkosťou približne 9 kB (najväčší) v DNA pochádzajúcej z SM/Ckc-+$^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}$ (2J). Pri žiadnom ďalšom reštrikčnom enzýme neboli RFLP detegovateľné. Predbežné reštrikčné mapovanie genómovej DNA naznačilo, že polymorfné miesto *Bg-l*II je 7 kB proti smeru od štartovacieho miesta. Žiadny z ostatných testovaných enzýmov nezasiahol oblasť za štartovacím miestom mRNA. (B) Segregácia *Bgl*II polymorfizmu u kmeňa SM/Ckc-+^{Dac} ob^{2J}/ob^{2J}. U šiestich obéznych a piatich chudých potomkov jednej generácie koizogénnej kolónie SM/Ckc-+^{Dac} ob^{2J}/ob^{2J} bol analyzovaný genotyp vypočítaním skóre *Bgl*II polymorfizmu podľa bodu (A). Všetky fenotypovo obézne zvieratá boli homozygótne na väčšine alel polymorfného *Bgl*II fragmentu. V kontrolnej dráhe bola použitá DNA izolovaná z nepríbuzných myší SM/Ckc-+$^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}$ pestovaných oddelene od kolónie SM/Ckc-+^{Dac} ob^{2J}/ob^{2J}.

Obr. 16 ukazuje Southernovo blotovanie *Eco*RI digestu genómovej DNA izolovanej z uvedených druhov, s využitím *OB* cDNA ako próby (t. j. zoo blot). Hybridizačné signály boli detegovateľné vo vzorkách od všetkých stavovcov, už pri miernych hybridizačných podmienkach. Mačacia DNA bola v tomto experimente mierne degradovaná. Rozštiepená DNA bola rozdelená elektroforézou na 1 % agarózovom géli v TBE a prenesená na membránu na ďalšiu analýzu próbou. Filter bol hybridizovaný pri 65 °C a premytý 2 x SSC/0,2 % SDS pri 65 °C, 2 x 20 min. a exponovaný 3 dni s filmom Kodak (Rochester, N. Y.) X-OMAT.

Obr. 17 ukazuje expresnú klonovaciu oblasť vektora pET-15b (Novagen) (SEQ ID č. 11 a 12).

Obr. 18 ukazuje výsledky analýzy eluátu z Ni-chelatačnej kolóny plnenej živicou s afinitou k histidínu, pre rekombinantný maturovaný myšací OB fúzny s His-tag (A) a pre maturovaný ľudský OB fúzny s His-tag (B). Baktérie boli transformované vektormi pETM9 alebo pETH14. Po indukcii 1 mmol IPTG za optimálnych podmienok, produkovali baktérie 100 až 300 Mg/ml OB fúzneho proteínu vnútrobunkovo. Bunky boli rozpustené v 6 mol.l^{-1} guanidín hydrochloridu alebo močovine a fúzny proteín (prítomný v supernatante po lýze) bol nanesený na stĺpec (Ni) plnený živicou s afinitou k histidínu v 10 ml 1 x väzbovom pufri s močovinou (10 ml). Stĺpec bol postupne eluovaný 5 ml alikvóty 20 umol.l^{-1}, 60 µmol.l^{-1} a 300 µmol.l^{-1} imidazolu a nakoniec vymývacím pufrom. Alikvóty boli analyzované na prítomnosť OB fúzneho polypeptidu na 15 % akrylamidovom géli. Do každej dráhy bol nanesený ekvivalent 100 µl bakteriálneho extraktu.

Obr. 19. (A) *In vitro* translácia *OB* RNA. Ľudská *OB* cDNA bola subklonovaná do vektora pGEM. Plazmid bol linearizovaný a syntetizovaný plus reťazec RNA s využitím Sp6 polymerázy. RNA syntetizovaná *in vitro* bola preložená v prítomnosti alebo v neprítomnosti psích pankreatických mikrozomálnych membrán. Po translácii *in vitro* bol pozorovaný primárny translačný produkt približne 18 kD. Pridanie mikrozomálnych membrán do reakcie ku vzniku druhého translačného produktu menšieho asi o 2 kD. Veľkosť translačného produktu RNA z interleukínu-1α, ktorý neobsahuje zakódovanú signálnu sekvenciu, zostala po pridaní mikrozomálnych membrán nezmenená. Z uvedených dát vyplýva prítomnosť funkčnej signálnej sekvencie. (B) *In vitro* translácia v prítomnosti alebo neprítomnosti proteinázy-K. Štiepenie proteázou viedlo k úplnej proteolýze primárneho translačného produktu 18 kD, zatiaľčo produkt 16 kD zostal nezmenený. Permeabilizácia mikrozómov účinkom 0,1 % TRITON-X100 spôsobilo citlivosť produktu 16 kD na proteolýzu. Výsledky naznačujú, že produkt bol translokovaný do lumenu mikrozómu.

Obr. 20. (A až E): Sekvencia ľudského *OB* génu SEQ ID č. 22 a 24. (F): Schematický diagram myšacieho *OB* génu. (G): Schematický diagram ľudského *OB* génu. V obidvoch diagramoch (F) a (G) sú podčiarknuté štartovacie a stop kodóny. Homológia prvého intrónu ľudského *OB* génu s prvým intrónom myšacieho *OB* génu nebola potvrdená, ale nie je vylúčená.

Obr. 21 uvádza schematickú kresbu stratégie klonovania rekombinantnej expresie *OB* v kvasinkách *Pichia.* (A) Expresný vektor *OB* obsahujúci signálnu sekvenciu α-párovacieho faktoru. (B) schematická kresba štruktúry rekombinantného fúzneho proteínu zahŕňajúca aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č. 26 s označe-

ním miest *Xho*I a predpokladaných štiepnych miest KEX-2 a STE-13, a N-koncový presah vzniknutý po štiepení KEX-2 (SEQ ID č. 27). (C) Alternatívna stratégia produkcie maturovaného OB zahŕňajúca prípravu aminokyselinovej sekvencie zodpovedajúcej štiepnym miestam *Xho*I a KEX-2, umiestneným po smere hneď za maturovanou sekvenciou OB polypeptidu (SEQ ID č. 28).

Obr. 22. Alternatívna expresná stratégia v *Pichia*. (A) expresný vektor fúzneho OB s His-tag prijatý z expresného systému pET, riadený signálnou sekvenciou α-párovacieho faktoru (SEQ ID č. 33). Schematická kresba štruktúry rekombinantného fúzneho proteínu OB s His-tag, so signálnou sekvenciou α-párovacieho faktora, predpokladanými štiepnymi miestami KEX-2 a STE-13, miestom His-tag a trombínovým štiepnym miestom, teda proteínu OB s presahom troch N-koncových aminokyselín.

Obr. 23. PAGE analýza expresie myšacieho OB (obidvoch mikroheterogénnych foriem, t. j. s aj bez Gln v polohe 49) v transformovaných kvasinkách *Pichia*. Očakávaný pás okolo 16 kD je zrejmý v kultivačnom médiu transformovaných kvasiniek (druhá a tretia dráha), v kultivačnom médiu netransformovaných kvasiniek (prvá dráha) zrejmý nie je. (B) PAGE analýza čiastočne purifikovaného rekombinantného OB polypeptidu po čiastočnej purifikácii na karboxymetylcelulóze (slabý katex). Pruh okolo 16 kD je dobre viditeľný v tretej a štvrtej frakcii z kolóny, ktoré boli eluované 250 mmol.l^{-1} NaCl. Dráha 1 -- nanesená vzorka; dráha 2 -- premývanie; dráhy 3-5 -- frakcie eluované 250 mmol.l^{-1} NaCl.

Obr. 24 ukazuje cirkuláciu OB proteínu v myšej plazme. (A) Imunoprecipitácia z myšej krvi. 0,5 ml myšej plazmy bolo predčistených s nekonjugovanou sefarózou a inkubovaných cez noc s imunopurifikovanými anti-OB protilátkami naviazanými na sefaróze 4B. Imunoprecipitát bol oddelený na 15 % SDS-PAGE géli, bol prenesený a bolo uskutočnené westernové blotovanie s anti-OB protilátkami. Proteín s molekulovou hmotnosťou okolo 16 kD migroval do rovnakej vzdialenosti ako maturovaný myší OB proteín exprimovaný v kvasinkách. V plazme myší C57B1/6J *OB/OB* proteín prítomný nebol, ale proti divokým myšiam vzrástol desaťnásobne v plazme myší C57B1/KS *DB/DB*. U myší *DB* sa predpokladá nadprodukcia OB proteínu doprevádzajúca rezistenciu proti jeho účinkom. (B) Zvýšené hladiny OB u obéznych krýs. Obezita u krýs je výsledkom recesívnej mutácie na krysom chromozóme 5. Podľa genetických údajov možno predpokladať defekt na rovnakom mutovanom géne ako u *DB* myší. Bola uskutočnená imunoprecipitácia a westernové blotovanie plazmy z obéznych a chudých krýs z rovnakého vrhu. U mutantných zvierat bol zistený dvadsaťnásobný vzrast hladiny OB. (C) Kvantitatívne stanovenie OB proteínu v myšej plazme. Zvyšujúce sa dávky rekombinantného myšacieho proteínu boli pridávané k 100 lambda plazmy z *OB* myší a bola uskutočnená imunoprecipitácia. Intenzita signálov na westernových blotoch bola porovnaná s intenzitou analogických signálov získaných pre 100 lambda plazmy z divokých myší. Pri zvyšujúcich sa dávkach rekombinantného proteínu bol pozorovaný lineárny rast aktivity intenzity signálov, čo dokazuje, že nadbytok protilátok viedol k imunoprecipitácii. Podobné signály boli zrejmé aj vo vzorkách plazmy u divokých myší a podľa vzorky s obsahom 2 ng rekombinantného proteínu bolo stanovené, že hladina cirkulujúceho proteínu v plazme u myší je približne 20 ng/ml. (D) OB proteín v extraktoch z adipózneho tkaniva. Boli pripravené cytoplazmatické extrakty z myšacieho adipózneho tkaniva *DB* a divokých myší. Výsledky westernového blotovania ukázali vzrast hladiny proteínu 16 kD v extraktoch pripravených z *DB* myší.

Obr. 25 ukazuje kolísavé cirkulačné hladiny OB proteínu v ľudskej plazme. (A) Westernové blotovanie ľudskej plazmy. Od šiestich chudých dobrovoľníkov boli odohrané vzorky plazmy. Imunoprecipitácia a westernové blotovanie ukázali prítomnosť imunoreaktívneho proteínu 16 kD, ktorý mal rovnakú veľkosť ako rekombinantný ľudský proteín 146 aminokyselín, exprimovaný v kvasinkách. V každej zo šiestich vzoriek boli pozorované kolísavé hladiny proteínu. (B) ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) ľudského OB. Mikrotitračné platne boli potiahnuté imunopurifikovanými ľudskými anti-OB protilátkami. Známe množstvá rekombinantného proteínu boli nanášané na platne a boli detegované s využitím imunopurifikovaných biotinylovaných anti-OB protilátok. Hodnota absorbancie pri 414 nm bola vynesená proti známym koncentráciám OB a bola stanovená štandardná krivka. Z výslednej štandardnej krivky vyplýva citlivosť testu od 1 ng/ml ľudského OB proteínu. (C) Kvantitatívne stanovenie OB proteínu v ľudskej plazme. ELISA imunoesej bola uskutočnená na 100 lambda plazmy od šiestich chudých dobrovoľníkov a na štandardnej vzorke z oddielu (B). Boli pozorované hladiny OB proteínu v rozmedzí 2 ng/ml pre HP1 až 15 ng/ml pre HP6. Tieto údaje sú v korelácii s výsledkami westernového blotovania v oddiele (A).

Obr. 26 ukazuje, že OB proteín obsahuje inter- alebo intramolekulárne disulfidické mostíky. (A) Westernové blotovanie v redukujúcich a neredukujúcich podmienkach. Westernové blotovanie bolo opakovane uskutočňované na myšiach a ľudskej plazme s pridaním a bez pridania redukujúcich činidiel k rovnakým vzorkám. Keď bol v pufri vynechaný β-merkaptoetanol, imunoprecipitáty z *DB* plazmy migrovali spolu s molekulovými hmotnosťami 16 kD a 32 kD. Pridanie β-merkaptoetanolu do pufra viedlo k zmiznutiu hmotnosti 32 kD (pozri obr. 24). Rovnaký výsledok bol získaný aj pre myší proteín exprimovaný v kvasinkách *Pichia pastoris*. V prvom prípade migroval myší OB proteín ako dimér. V redukujúcich podmienkach migroval purifikovaný rekombinantný myší proteín ako molekulová hmotnosť 16 kD, čo znamená, že na molekulovú formu 32 kD spôsobí jeden alebo dva disulfidické mostíky. Ľudský proteín exprimovaný *in vivo* a v *Pichia pastoris* migroval s molekulovou hmotnosťou 16 kD v redukujúcich a v neredukujúcich podmienkach (údaje

nie sú uvedené). (B) Ľudský proteín exprimovaný v kvasinkách obsahuje intramolekulárny disulfidický mostík. Proteíny exprimované v expresnom systéme s *Pichia pastoris* zvyčajne zachovávajú správnu konformáciu. 146. aminokyselinový maturovaný ľudský proteín bol exprimovaný v *Pichia pastoris* a bol dvojstupňovo purifikovaný z kvasinkového média postupom IMAC a gélovou filtráciou. Purifikované proteíny boli analyzované hmotnostnou spektroskopiou pred brómkyánovom štiepení a po brómkyánovom štiepení. Brómkyán štiepi v mieste karboxylového konca metionínu. Molekulová hmotnosť rekombinantného kvasinkového bola 16,024 ± 3 Da (vypočítaná molekulová hmotnosť: 16,024 Da). Brómkyán štiepi sekvenciu proteínu za tromi metionínmi v polohách 75, 89 a 157. Brómkyánový fragment so stanovenou molekulovou hmotnosťou 8435,6 Da zodpovedá aminokyselinám 90 - 157 a 158 - 167 spojeným disulfidickým mostíkom medzi cys-117 a cys-167 (vypočítaná molekulová hmotnosť: 8434,5 Da). N. D. = nedetegované.

Obr. 27 ukazuje prípravu bioaktívneho rekombinantného proteínu. Nukleotidová sekvencia zodpovedajúca 145 aminokyselinám maturovaného myšacieho OB proteínu bola klonovaná do expresného vektora pET 15b. Vektor pET obsahuje polyhistidínovú oblasť (His-tag) v protismere od klonovanej sekvencie, čo umožňuje účinnú purifikáciu s využitím IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatografy). Rekombinantný proteín bol po bakteriálnej lýze obsiahnutý najprv v nerozpustnej membránovej frakcii. Membránová frakcia bola rozpustená guanidínium hydrochloridom a bola nanesená na stĺpec IMAC. Proteín bol postupne eluovaný rastúcou koncentráciou imidazolu. Eluovaný proteín bol v ďalšom kroku priestorovo preusporiadaný a pôsobením trombínu bola odštiepená oblasť His-tag, ako je uvedené ďalej. Konečný výťažok rozpustného proteínu bol 45 ng/ml bakteriálnej kultúry.

Obr. 28 ukazuje biologické účinky OB proteínu. Časový priebeh príjmu potravy (grafy A až C) a telesnej hmotnosti (grafy D až F). Skupiny po desiatich zvieratách dostávali denne intraperitoneálne injekcie OB proteínu v dávke 5 mg/kg/deň (plné štvorčeky), alebo injekcie PBS (plné krúžky) alebo nič (plné trojuholníky). Pokusné skupiny zahŕňali myši C57B1/6J *OB/OB* (grafy A a D), myši C57B1/KS *DB/DB* (grafy Ba E) a myši CBA/J +/+ (grafy C a F). Príjem potravy u myší bol denne monitorovaný a telesná hmotnosť bola zaznamenávaná v troch až štvordenných intervaloch. (Stupnica telesnej hmotnosti v gramoch je odlišná pre divoké myši vs. myši *OB* a *DB*.) Príjem potravy u *OB* myší, ktoré dostávali proteín, sa po prvej injekcii znížil a po štyroch dňoch sa stabilizoval na 40 % úrovni proti skupine, ktorá dostávala placebo ($p<.001$). Telesná hmotnosť týchto zvierat sa znižovala priemerne o 1,3 g/deň a po troch týždňoch sa stabilizovala na 60 % počiatočnej hmotnosti ($p<.0001$). U *DB* myší nebol pozorovaný žiadny účinok proteínu. Malý, ale zaznamenateľný účinok bol pozorovaný u myší CBA/J v dvoch ranných časových bodoch ($p<.02$). Štandardná chyba každého stanovenia je označená úsečkou a štatistická významnosť výsledkov je uvedená v tabuľke 1.

Obr. 29 ukazuje výsledky párového kŕmenia *OB* myší. (A) Skupina štyroch myší C57B1/6J *OB/OB* bola kŕmená rovnakým množstvom potravy, aké spotrebovala skupina *OB* myší liečená rekombinantným proteínom. Hmotnostný úbytok obidvoch skupín bol stanovovaný po piatich, ôsmich a dvanástich dňoch. Myši s obmedzeným prísunom potravy strácali menej hmotnosti (šrafované stĺpce) než myši liečené proteínom (plné stĺpce) ($p<.02$). Z výsledkov vyplýva, že vplyv OB proteínu na zníženie hmotnosti je súhrnom vplyvov na príjem potravy a výdaj energie. (B) Fotografie liečenej *OB* myši. Na obrázku sú dve C57B1/6J *OB/OB* myši. Myš na ľavej strane dostávala PBS a vážila 65 g, čo bola jej počiatočná hmotnosť. Myš napravo dostávala denne injekcie rekombinatného OB proteínu. Jej počiatočná hmotnosť bola tiež 65 g a po trojtýždňovej liečbe proteínom hmotnosť klesla na 38 g. Pečeň liečenej a neliečenej *OB* myši. Na obrázku je pečeň liečenej a neliečenej C57B1/6J *OB/OB* myši. Pečeň z myši, ktorá dostávala PBS, je veľká a tučná a váži 5,04 g. Pečeň z myši, ktorá dostávala rekombinantný OB proteín, má normálny vzhľad a váži 2,23 g.

Obr. 30 ukazuje *in situ* hybridizáciu *OB* k adipóznemu tkanivu. *OB* RNA (vlákno sense a anti-sense) bola označená *in vitro* s využitím Sp6 a T7 polymerázy a digoxigenínu. Značené vlákna RNA boli prihybridizované k rezom adipózneho tkaniva z epididymálnych tukových zásob zaliatych do parafínu, pochádzajúcich z osemtýždňových C57B1/Ks myší (označené divoký typ) a C57B1/KS *DB/DB* myší (označené *DB)*. Na obrázku sú vidieť tukové kvapky ako nesfarbené vakuoly vnútri buniek. Cytoplazma je tenký lem na okraji buniek a je neodlíšiteľná od bunkovej membrány. Hybridizácia v celom poli adipocytov bola detegovaná na tkanivových rezoch z divokých myší len s použitím antisense próby a značne zvýšené hladiny boli pozorované na tkanivových rezoch *DB/DB* zvierat.

Obr. 31 ukazuje expresiu *OB* RNA v adipocytoch *in vivo* a *in vitro*. Totálna RNA (10 ng) z niekoľkých rôznych zdrojov bola rozdelená elektroforézou, bola blotovaná a hybridizovaná s *OB* sondou. Najprv bol na purifikáciu adipocytov využitý rozdiel vo vznosnosti buniek po štiepení kolagenázou. *OB* RNA sa vyskytovala len vo frakcii adipocytov. *OB* RNA nebola exprimovaná v nediferencovaných preadipocytárnych bunkách 3T3-442, dráha U. Diferencované adipocyty týchto bunkových línií exprimovali zreteľne detegovateľné hladiny *OB* mRNA (dráha D).

Obr. 32 ukazuje, že k expresii *OB* RNA dochádza vo všetkých adipóznych tkanivových depotoch. Všetky testované adipózne tkanivové depoty exprimovali *OB* RNA. Ingvinálne tukové zásoby exprimovali trochu nižšie hladiny RNA, ale v rôznych pokusoch boli pozorované premenlivé hladiny signálov. (Obr. 31 A) dráhy (1) epididymálna, (2) ingvinálna, (3) abdominálna a (4) parametriálna tukovej zásoby. Hnedý tuk taktiež

exprimoval nízke hladiny *OB* RNA. (Obr. 31 B) Hladiny expresie *OB* RNA v hnedom tuku zostali nezmenené u zvierat žijúcich pri 4 °C počas 1 týždňa, zatiaľčo vzrástol päťnásobne nadbytok špecifickej UCP RNA indukovanej chladom.

Obr. 33 ukazuje expresiu *OB* RNA u myší *DB/DB* a u myší po aplikácii aurotioglukózy. Totálna RNA z parametriálnych tukových zásob z myší po aplikácii aurotioglukózy (GTG) a z myší *DB/DB* bola elektroforeticky rozdelená a bolo uskutočnené northernové blotovanie. Je známe, že podanie jednej dávky GTG vyvolá obezitu indukovaním špecifickej hypotalamickej lézie. (A) CBA myším samiciam, starých jeden mesiac, bolo aplikované GTG (0,222 mg/g), čo viedlo k výslednému zvýšeniu hmotnosti o >20 g oproti kontrolnej skupine (<5 g). (B) Podľa hybridizácie *OB* próby na RNA z *DB/DB* a GTG myší bol zistený dvadsaťnásobný vzrast *OB* RNA oproti kontrolnej RNA (aktín alebo GAPDH).

Obr. 34 ukazuje analýzu ľudskej RNA northernovým blotovaním. Northernové bloty obsahujúce 10 mg totálnej RNA z ľudských adipóznych tkanív (FAT, obr. A) a 2 mg poly A + RNA z iných ľudských tkanív (graf B) boli hybridizované s ľudskou *OB* sondou alebo s ľudskou β-aktínovou sondou. Intenzívne signály v oblasti 4,5 kb boli zrejmé u totálnej RNA z adipózneho tkaniva. Hybridizácia s poly A + RNA odhalila detegovateľné signály srdca (HE) a placenty (PL), zatiaľčo *OB* RNA nebola detegovaná v mozgu (BR), pľúcach (LU), pečeni (LI), kostrovom svalstve (SM), ľadvinách (KI) a slinivke (PA). Vo všetkých pokusoch je poznamenaná dĺžka autorádiografickej expozície. Pôvod nízkomolekulárnych pásov placentálnej RNA (napr. alternatívny splicing, degradácia RNA) nie je známy.

Obr. 35 predstavuje sadu YAC obsahujúcich ľudský *OB* gén a 8 mikrosatelitných markerov. Genetická mapa oblasti chromozómu 7 s ľudským *OB* génom obsahuje oblasti STS vychádzajúce z YAC a bola vydedukovaná pomocou SEGMAP/verzia 3.29 [Green *et. al., PCR Methods Applic,* 1: 77 - 90 (1991)]. 19 jedinečne usporiadaných oblastí STS (pozri tabuľka 3) je uvedených v hornej časti. 8 STS špecifických na mikrosatelity je označených hviezdičkami (pozri tabuľka 4). Taktiež sú označené STS zodpovedajúce Pax4 a *OB* génu, rovnako ako predpovedané relatívne polohy centroméru (CEN) a 7q teloméru (TEL). Všetkých 43 klonov YAC je znázornených horizontálnou čiarou s menom vľavo a odhadom veľkosti v zátvorke (v kb, podľa pulznej gélovej elektroforézy). Prítomnosť STS v YAC je naznačená plnými krúžkami v príslušných polohách. Pokiaľ STS zodpovedá inzertovanému koncu YAC, je okolo zodpovedajúceho krúžku zakreslený štvorec, tak v hornej časti v blízkosti názvov STS, ako aj na konci YAC, z ktorého bolo STS odvodené. Pri 5 YAC v spodnej časti (pod horizontálnou prerušovanou čiarou) nebola predpokladaná prítomnosť 1 alebo niekoľkých STS (vychádzajúca zo stanoveného poradia) potvrdená (podľa zodpovedajúcich STS-špecifických PCR testov s jednotlivými YAC, uskutočnených dvakrát) a polohy týchto STS sú označené prázdnymi krúžkami. Väčšina YAC bola izolovaná z knižnice odvodenej z hybridných buniek pochádzajúcich z ľudí a škrečkov [Green et. *al., Genomics,* 25: 170 - 183 (1995)], pôvodné názvy sú zachované. Ostatné YAC boli izolované z totálnych ľudských genómových knižníc a ich pôvod je uvedený v tabuľke 3. Tri YAC, ktorých názvy sú vyznačené rámčekom (yWSS691, yWSS999, y¥SS2935), boli vyhľadané FISH analýzou a mapované do oblasti 7q31.1. Sada nie je uvedená v „pomerných" veľkostiach, z veľkostí YAC nie je možné odhadnúť presahy klonov alebo STS spacing, všetky STS sú preto umiestnené ekvidištantne. V „pomernej" forme možno z veľkostí YAC odhadnúť relatívne vzdialenosti oddeľujúce každý pár susedných STS, rovnako ako rozsah presahov klonov, totálna sada YAC má potom rozpätie cez 2 Mb.

Podrobný opis

Predkladaný vynález sa týka objasnenia a objavu proteínu označovaného ako OB polypeptid alebo leptín, nukleových kyselín kódujúcich tento protein a ich degenerovaných variantov, napr. ktoré obsahujú optimálne kodóny pre expresiu v určitom expresnom systéme. Predkladané proteíny sa zúčastňujú regulácie telesnej hmotnosti cicavcov. Predkladané nukleové kyseliny predstavujú kódujúce sekvencie zodpovedajúce myšaciemu a ľudskému OB polypeptidu, ktorý má kľúčovú úlohu v regulácii telesnej hmotnosti a adipozity. Predkladané údaje naznačujú, že polypeptidický produkt predkladaných nukleových kyselín je vylučovaný bunkami, ktoré ho exprimujú a že tento polypeptid pôsobí ako hormón. Ďalší experimentálne údaje dokazujú, že OB polypeptid je veľmi účinný pri liečbe obezity myších nositeľov mutovaného *OB* génu. Vysoká dávka alebo mierne kontinuálne dávky OB polypeptidu vedú k zníženiu telesnej hmotnosti aj u normálnych myší (divokého typu).

Predkladané príklady dokazujú, že OB polypeptid, alternatívne označovaný ako „leptín", sa vyskytuje v obehu v myšej, krysej a ľudskej plazme. Leptín sa nevyskytuje v plazme *OB/OB* myší, je prítomný v desaťnásobnej koncentrácii v plazme *DB/DB* a v dvadsaťnásobnej koncentrácii v plazme *FA/FA* krýs. Najpodstatnejšie je, že denné injekcie rekombinantného leptínu podstatne znižujú telesnú hmotnosť *OB/OB* myší, významne ovplyvňujú telesnú hmotnosť divokých myší, ale nemajú žiadny účinok na *DB/DB* myši.

OB polypeptid pochádzajúci z jedného druhu je biologicky aktívny aj v inom druhu. Konkrétne ľudský OB polypeptid aplikovaný myšiam, má aktivitu.

Predkladaný vynález je primárne zameraný na identifikáciu látok, ktoré pôsobia ako modulátory telesnej hmotnosti cicavcov. Predkladaný vynález sa konkrétne týka izolácie, purifikácie a sekvenovania nukleových

kyselín zodpovedajúcich ľudskému aj myšaciemu *OB* génu alebo jeho kódujúcej sekvencii a izolácie, purifikácie a sekvenovania zodpovedajúcich exprimovaných polypeptidov. Vynález prináša objav nukleových kyselín s nukleotidovými sekvenciami SEQ ID č. 1 (obr. 1 (A až E)) a SEQ ID č. 3 (obr. 2 (A a B)) a ich degenerovaných variant, alel a fragmentov, ktoré majú aktivitu modulátorov telesnej hmotnosti a adipozity. Súvislosť predkladaných kyselín s *OB* génom je podstatou ich významného vplyvu na obezitu a iné choroby a poruchy, ktoré sú sprevádzané abnormálnou telesnou hmotnosťou. Vynález sa ďalej týka proteínov exprimovaných predkladanými nukleovými kyselinami, najmä proteínov SEQ ID č. 2 (obr. 1 (A až E)), SEQ ID č. 4 (obr. 3), SEQ ID č. 5 (obr. 5) a SEQ ID č. 6 (obr. 6) a príslušných konzervatívnych variantov, aktívnych fragmentov a malých príbuzných molekúl.

Ako už bolo spomínané skôr, peptidy modulujúce telesnú hmotnosť, ich väzbové náprotivky alebo iné ligandy a činidlá napodobňujúce či inhibujúce ich aktivitu alebo ovplyvňujúce ich produkciu, možno využiť vo farmaceutických prípravkoch. Farmaceutické prípravky ďalej obsahujú vhodný nosič a účinnú látku vo vhodnom množstve podľa cesty podania a sú určené pacientom s abnormálnymi zmenami telesnej hmotnosti alebo adipozity. Tieto farmaceutické prípravky možno podávať samostatne alebo ako doplňajúce lieky pri liečbe iných chorobných stavov, ako je rakovina alebo AIDS. Prípravky možno podávať rôznymi cestami, napr. perorálne, nazálne alebo ďalšími sliznicami, parenterálne napr. subkutánnymi, intravenóznymi alebo intraperitoneálnymi injekciami či katéterizáciou a pod. Priemerné množstvá rekogničných faktorov či ich podjednotiek sú premenlivé a musia vychádzať z doporučení a predpisu kvalifikovaného lekára či veterinára.

Z uvedených faktov vychádza testovací systém na vyhľadanie potenciálnych liečiv, ktoré majú napodobňovať či inhibovať aktivitu modulátorov telesnej hmotnosti. Testovací systém pracuje jednak so známym modulátorom hmotnosti a jednak s testovacím liečivom, ktoré sa zavedie do výslednej bunkovej kultúry. Potom sa sledujú rozdiely aktivity v bunkách pri podaní predpokladaného liečiva a vplyvom pridaného množstva známeho modulátoru hmotnosti.

Molekulárne klonovanie *OB* génu, ako je tu uvedené, viedlo k objavu skupiny látok, ktoré na molekulovej úrovni modulujú telesnú hmotnosť cicavcov. Objav predkladaných modulátorov je významný z hľadiska diagnózy a liečby nutričných porúch vrátane, ale nielen liečby obezity, váhového úbytku doprevádzajúceho rakovinu, ale aj liečby chorôb doprevádzajúcich obezitu, ako je vysoký krvný tlak, srdcové choroby a diabetes typ II. Predkladané génové produkty sú ďalej potenciálne využiteľné v poľnohospodárstve pri modulácii telesnej hmotnosti hospodárskych zvierat. Konečne, predkladané modulátory, ako sekrétované látky, možno biochemicky využiť pri izolácii príslušných receptorov, pomocou technológie expresného klonovania. Nasledujúce pojednanie zamerané na *OB* gén platí všeobecne pre celú triedu modulátorov predkladaného vynálezu.

Funkčná aktivita *OB* génu sa vyhodnocuje transgénovým postupom. Je vhodné použiť transgénny myšací model. Pri komplementačných štúdiách na transgénnych myšiach sa používa *OB* gén. S izolovaným *OB* génom sa konštruujú transgénne vektory vrátane vírových vektorov alebo kozmidových klonov (alebo fágových klonov) zodpovedajúce lokusu sledovaného génu divokého typu. Kozmidy sa potom zavedú do transgénnych myší opísanými postupmi [Jaenisch, *Science,* 240: 1468 - 1474 (1988)]. Konštrukcie sa zavádzajú do oplodnených vajec odvodených z potomkov F1 kríženi C57B1/6J *OB/OB* a DBA. Kvôli vzniku F1 zvierat je nutné pri krížení použiť C57B1/6J *OB/OB* ovariálne transplantáty. Ako náprotivok sa používajú myši DBA/2J, lebo majú sfarbenie nonaguti, čo je pre ovariálne transplantáty dôležité. Genotyp v *OB* lokuse kozmidových transgénnych myší možno určiť vytypovaním zvierat s tesne spojenými RFLP alebo mikrosatelitmi, ktoré po stranách obklopujú mutáciu a ktoré sú medzi rodičovskými kmeňmi polymorfné. Komplementácia sa prejaví, pokiaľ určitá konštrukcia spôsobí, že geneticky obézne F2 zvieratá (podľa skóre z RFLP analýzy) sú chudé a nediabetické. Za týchto okolností konečný dôkaz komplementácie vyžaduje, aby sa *OB/OB* alebo *DB/DB* myši nesúce transgén spojili s *OB/OB* alebo *DB/DB* ovariálnymi transplantátmi. Pri tomto krížení všetky N2 zvieratá, ktoré nenesú transgén, budú obézne a inzulín rezistentné/diabetické, zatiaľ čo zvieratá nesúce transgén budú chudé a budú mať normálne kontrakcie glukózy a inzulínu v plazme. V genetickom zmysle pôsobí transgén ako supresor mutácie.

Alternatívne možno *OB* gény testovať podľa vplyvu na fenotyp po expresii v anti-sense orientácii u zvierat divokého typu. V tomto prístupe dochádza k supresii alely divokého typu a vzniku mutantného fenotypu. Tvorba duplexu RNA-RNA (anti-sense - sense) bráni normálnemu chovaniu mRNA, čo vedie k čiastočnej alebo úplnej eliminácii účinku génu divokého typu. Tento postup bol použitý pri inhibícii syntézy TK v tkanivovej kultúre a pri produkcii fenotypov mutácie *Kruppel* u *Drosophila, a* mutácie *Shivever* u myší [Izant *et. al., Cell,* 36: 1007 - 1015 (1984); Green et. *al Annu. Rev. Biochem.,* 55: 569 - 597 (1986); Katsuki et. *al., Science,* 241: 593 - 595 (1988)]. Výhodou tohto prístupu je, že je nutné exprimovať len malé množstvo génu na dosiahnutie efektívnej inhibície expresie celej príbuznej mRNA. Umiestnenie anti-sense transgénu je riadené jeho vlastným promótorom alebo iným promótorom exprimovaným v príslušnom type buniek a nachádza sa v protismere od miesta SV40 poly A. Tento transgén sa využije pri príprave transgénnych myší. Transgénne myši budú taktiež spojené s ovariálnymi transplantátmi, aby bolo možné zistiť, či sú *OB* heterozygoti citlivejší na účinky anti-sense konštrukcií.

Vyriešenie biochemickej funkcie produktov *OB* génu (OB polypeptid alebo proteín) má z dlhodobého hľadiska význam na identifikáciu malých agonistných aj antagonistných molekúl ovplyvňujúcich jeho aktivitu.

Ďalej sú uvedené definície niektorých výrazov používaných v nasledujúcom opise.

Výrazy „modulátor telesnej hmotnosti", „modulátor", „modulátory" a ďalšie variácie sú používané zámenne a v predkladanej prihláške sa vzťahujú na nukleotidický a bielkovinový materiál, ako sú jednoduché aj multiplicitné proteíny. Konkrétne tieto výrazy zahŕňajú nukleotidy a DNA so sekvenciami SEQ ID č. 1 (obr. 1 (A až E)) a SEQ ID č. 3 (obr. 2 (A a B)) a analogické proteíny s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID č. 2 (obr. 1 (A až E) a SEQ ID č. 4 (obr. 3). Výrazy taktiež zahŕňajú profil aktivít materiálov uvedených tu a v nárokoch. Zahrnuté sú teda nukleotidy s ekvivalentnou alebo pozmenenou aktivitou vrátane homológových analógov a alelických variant. Podobne sú zahrnuté proteíny s ekvivalentnou alebo pozmenenou aktivitou vrátane zámerne modifikovaných proteínov, napr. cielenou mutagenézou, alebo náhodne modifikovaných proteínov vznikajúcich v mutovaných hostiteľských bunkách produkujúcich modulátory.

Prípravok obsahujúci „A" (kde „A" je jednoduchý proteín, molekula DNA, vektor, rekombinantná hostiteľská bunka atď.) v podstate neobsahuje „B" (kde „B" obsahuje jeden alebo niekoľko kontaminujúcich proteínov, DNA molekúl, vektorov atď., okrem racemických foriem „A"), pokiaľ aspoň 75 % hmotn. proteínov, DNA, vektorov atď. (podľa príslušnej kategórie A a B) v prípravku sú zložky „A". „A" výhodne obsahuje najmenej 90 % hmotn. A+B v prípravku, najvýhodnejšie 99 % hmotn. Je taktiež výhodné, keď prípravok, ktorý v podstate nie je kontaminovaný, obsahuje látky len jednej molekulovej hmotnosti s charakteristickou aktivitou predkladaných zlúčenín.

OB polypeptidy

Výrazy „proteín", vzťahujúci sa na prirodzené polypeptidy, a „polypeptid" sú používané zámenne ako produkty *OB* génu a ich varianty. Výrazy „maturovaný proteín" alebo „maturovaný polypeptid" sa týkajú najmä produktov *OB* génu (alebo príslušného fúzneho proteínu), z ktorých bola odstránená signálna sekvencia.

V konkrétnom uskutočnení vynálezu obsahujú predkladané OB polypeptidy s aminokyselinovou sekvenciou uvedenej ďalej, t. j. SEQ ID č. 2, 4, 5, 6 atď., prípadne sekvenciou modifikovanou substitúciami konzervatívnych aminokyselín vrátane príslušných biologicky aktívnych fragmentov, analógov a derivátov. Výraz „biologicky aktívny" sa týka niektorých typických vlastností polypeptidu, ako je (nie výhradne) špecifická väzba napr. na receptor, protilátku alebo iné rekogničné molekuly; aktivácia prenosových ciest signálov na molekulárnej úrovni; a/alebo indukcia (alebo inhibícia antagonistmi) fyziologických účinkov sprostredkovávaných *in vivo* prirodzeným OB polypeptidom. OB polypeptidy vrátane fragmentov, analógov a derivátov, možno pripraviť synteticky, t. j. s využitím známych postupov peptidovej syntézy na pevnej fáze alebo v roztoku. Výhodné sú syntetické postupy na pevnej fáze. Alternatívne možno predkladané OB polypeptidy pripravovať známymi postupmi génového inžinierstva, ako bude opísané ďalej. OB polypeptidy možno podľa predkladaného vynálezu purifikovať napr. imunoafinitnou chromatografiou z biologických tekutín, ako sú (nie výhradne) plazma, sérum, moč, výhodne ľudská plazma, sérum alebo moč, výhodnejšie pochádzajúcich zo subjektu so zvýšenou produkciou polypeptidu, ako je obézna osoba s mutáciou OB receptora alebo osoba postihnutá obezitou vzťahujúcou sa na „obéznu" mutáciu.

Fragmenty OB polypeptidu

Predkladaný vynález uvažuje aj niektoré dôležité prirodzene sa vyskytujúce fragmenty OB polypeptidu. Sekvencia polypeptidu zahŕňa mnoho bežných proteolytických miest, napr. argirínové zvyšky. Je možné, že polypeptid plnej dĺžky je v jednom alebo v niekoľkých tkanivových miestach štiepený na biologicky aktívne fragmenty. Tieto buď zosilňujú alebo zoslabujú funkciu OB polypeptidu, ktorý spôsobuje znižovanie telesnej hmotnosti.

Analógy OB polypeptidu

Predkladaný vynález sa týka prípravy analógov OB polypeptidu, ktoré majú rovnakú biologickú aktivitu ako OB polypeptid, t. j. viažu špecifických väzobných partnerov OB polypeptidu, ako je napr. OB receptor. Analógy OB môžu agonizovať funkciu OB polypeptidu, t. j. pôsobiť v rovnakom smere. Je výhodné, keď sú agonisty OB účinnejšie ako prirodzený proteín. OB antagonist môže napríklad viazať OB receptor s vyššou afinitou, alebo môže mať ďalší polčas *in vivo,* prípadne oboje. Ale vynález zahŕňa aj OB agonisty, ktoré sú menej účinné ako prirodzený proteín. Iné analógy pôsobia proti aktivite OB. Príkladom je analóg OB, ktorý sa viaže na receptor OB, ale neindikuje prenos signálu a pôsobí preto ako kompetetívny inhibítor prirodzeného OB receptora tým, že znižuje aktivitu OB *in vivo.* Antagonistné analógy OB môžu mať iné vlastnosti ako OB peptid, napr. dlhší (alebo kratší) polčas *in vivo,* vyššiu (alebo nižšiu) väzbovú afinitu na OB receptor, prípadne oboje.

Analógom OB peptidu môže byť OB polypeptid modifikovaný substitúciami aminokyselín v polohách, ktoré nie sú pre polypeptid z funkčného alebo štruktúrneho hľadiska významné. Napríklad, pretože nie je známe, že ľudský OB polypeptid je biologicky účinný v myšiach, povedú pravdepodobne substitúcie aminokyselín, ktorými sa ľudská sekvencia odlišuje od myšej (divergentných aminokyselín), k funkčným analógom OB polypeptidu. Napríklad serín ľudskej OB sekvencie v polohe 53 alebo 98, prípadne v obidvoch polohách (podľa sekvencie na obr. 4), môže byť substituovaný napr. glycínom, alanínom, valínom, cysteínom, metionínom alebo treonínom. Podobne arginín v polohe 92 (obr. 4) ľudskej sekvencie môže byť substituovaný napr. asparagínom, lyzínom, histidínom, glutamínom, kys. glutámovou, aspartovou, serínom, treonínom, metionínom alebo cysteínom. V aminokyselinovej sekvencii ľudského polypeptidu na obr. 4 možno substituovať ešte ďalšie aminokyseliny, ako histidín v polohe 118, tryptofán v polohe 121, alanín v polohe 122, kyselinu glutámovú v polohe 126, treonín v polohe 127, leucín v polohe 128, glycín v polohe 132, glycín v polohe 139, tryptofán v polohe 159 a glycín v polohe 166. Podľa iného uskutočnenia možno substituovať jednu alebo niekoľko aminokyselín v polohách 121 až 128 (obr. 4), napr. glycínom alebo alanínom, a iné aminokyseliny okrem serínu v polohe 123 alebo leucínu v polohe 125.

Iným analógom OB polypeptidu, výhodne ľudského OB polypeptidu môže byť skrátená forma polypeptidu. Napríklad glutamín v polohe 49 nie je esenciálny a možno ho z peptidu odstrániť. Podobne možno odstrániť niektoré divergentné aminokyseliny v polohách 121 až 128. Predkladaný vynález uvažuje aj analóg OB s minimálnou aminokyselinovou sekvenciou nutnou pre biologickú funkciu. Minimálnu sekvenciu možno ľahko určiť, napr. testom schopnosti fragmentu OB viazať OB špecifické protilátky, testom inhibície prirodzeného OB polypeptidu alebo naopak agonizácie prirodzeného OB polypeptidu. Konkrétne uskutočnenie predkladaného vynálezu poskytuje skrátený polypeptid, ktorého štruktúru tvorí slučka udržovaná disulfidickým mostíkom medzi cysteínovými zvyškami 117 a 167 (obr. 4). Iné uskutočnenie poskytuje skrátený analóg obsahujúci aminokyseliny 22 (za predpokladaným signálom pre štiepne miesto) až 53 (zvyšok priamo predchádzajúci oblasť flexibilnej slučky, ako bola detegovaná obmedzenou proteolýzou a hmotovou spektroskopiou OB polypeptidu; pozri Cohen *et. al., Protein Science,* 4: 1088 (1995)). V inom uskutočnení obsahuje skrátený analóg aminokyseliny 61 (zvyšok priamo predchádzajúci oblasť flexibilnej slučky, ako bola detegovaná obmedzenou proteolýzou a hmotovou spektroskopiou OB polypeptidu) až 116 (zvyšok priamo predchádzajúci prvý cysteín). V inom uskutočnení obsahuje skrátený analóg aminokyseliny 61 až 167.

Ďalší analóg OB polypeptidu zahŕňa substitúcie jedného alebo niekoľkých zvyškov na predpokladanej flexibilnej slučke, napr. zvyškov 54 až 60. Jeden alebo niekoľko zvyškov môže byť substituovaných napr. lyzínom, kyselinou glutámovou alebo cysteínom (výhodne lyzínom) kvôli sieťovaniu napr. na polymér, pretože flexibilné slučkové štruktúry sú výhodnými miestami derivatizácie proteínu. Alternatívne možno substituovať zvyšky flexibilnej slučky aminokyselinami odolnejšími proti proteolýze, ale ktoré pri tom nenarušia flexibilnú štruktúru slučky, napr. jedným alebo niekoľkými prolínmi. Podľa iného uskutočnenia vynálezu možno vykonať substitúcie aminokyselinami, ktoré možno ďalej derivatizovať na formy odolnejšie proti degradácii, napr. proteolýze.

Odborníkovi v odbore je zrejmé, že veľkosti uvedených fragmentov sú približné a že obidva konce polypeptidu, vnútornú časť jeho reťazca, fragmenty a citované skrátené analógy možno predĺžiť alebo skrátiť o jednu až päť aminokyselín za predpokladu, že cysteínové zvyšky tvoriace disulfidický mostík slučkových analógov zostanú zachované.

Podľa analýzy spektier cirkulárneho dichroizmu rekombinantných peptidov v takmer fyziologických podmienkach bolo zistené, že myší OB peptid obsahuje 50 % α-helikálne zložky a ľudský OB polypeptid 60 % α-helikálne zložky. Iné uskutočnenie vynálezu teda uvažuje substitúcie aminokyselín takými zvyškami, ktoré vedú k OB analógom s vyšším sklonom tvorby α-helikálnej štruktúry alebo so sklonom tvorby stabilnejšej α-helikálnej štruktúry. Napríklad α-helikálnu štruktúru zvýhodňuje zavedenie substituentov Glu, Ala, Leu, His, Trp do prirodzeného OB polypeptidu. Výhodné sú substitúcie konzervatívnych aminokyselín, napr. substitúcia asparátu(ov) v polohách 29, 30, 44, 61, 76, 100 a/alebo 106 (podľa obr. 4) kyselinou glutámovou (Glu), substitúcia izoleucínu(ov) leucínom; substitúcia glycínu alebo valínu alebo ktorejkoľvek divergentnej aminokyseliny alanínom (napr. substitúcia serínu v polohe 53 ľudského OB polypeptidu alanínom), substitúcia arginínu alebo lyzínu histidínom a substitúcia tyrozínu a/alebo fenylalanínu tryptofánom. Zvýšenie podielu alebo výhodnejšie stability α-helikálnej štruktúry môže viesť k analógu OB, ktorý bude mať vyššiu aktivitu, zvýšenú väzbovú afinitu alebo dlhší polčas. Konkrétne uskutočnenie vynálezu poskytuje OB polypeptid s vyšším sklonom tvorby α-helikálnej štruktúry v oblasti aminokyselín 22 až 53. Iné uskutočnenie vynálezu poskytuje OB polypeptid s vyšším sklonom tvorby α-helikálnej štruktúry alebo stabilnejšej α-helikálnej štruktúry v oblasti aminokyselín 61 až 116. Iné uskutočnenie vynálezu poskytuje OB polypeptid s vyšším sklonom tvorby α-helikálnej štruktúry v oblasti aminokyselín 117 až 167, zodpovedajúci slučke držanej disulfidickým mostíkom. Vynález ďalej uvažuje OB analógy zahŕňajúce ešte ďalšie (skôr uvedené) domény s vyšším sklonom tvorby α-helikálnej štruktúry alebo stabilnejšej α-helikálnej štruktúry. Iné uskutočnenie vynálezu poskytuje skrátené analógy OB polypeptidu, ktoré obsahujú štruktúrotvorné aminokyselinové zvyšky,

napr. podporujúce tvorbu α-helikálnej štruktúry, čo kompenzuje nižšiu štruktúrnu stabilitu polypeptidických fragmentov.

Analógy, ako sú fragmenty, možno získavať napr. pepsínovým štiepením peptidových modulátorov hmotnosti. Iné analógy, muteíny, možno získavať štandardnou cielenou mutagenézou nukleotidových sekvencií kódujúcich peptidové modulátory hmotnosti. Typ aktivity, promotorovej či inhibičnej možno pri analógoch vykazujúcich „aktivitu modulátorov hmotnosti", napr. pri malých molekulových analógoch, identifikovať *in vivo* aj iv *vitro* známymi testami.

Malé molekulové analógy a peptidomimetika OB polypeptidu

Štruktúru OB polypeptidu, výhodne ľudského OB polypeptidu, možno analyzovať rôznymi známymi postupmi oblasti techniky. Sekvenciu proteínu možno charakterizovať analýzou hydrofility [napr. Hopp *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 78: 3824 (1981)]. Hydrofilný profil slúži na identifikáciu hydrofóbnych a hydrofilných oblastí OB polypeptidu, čo umožní charakterizovať vnútorné oblasti polypeptidu so správnym priestorovým usporiadaním a prístupnej oblasti na povrchu OB polypeptidu. Ďalej možno analyzovať sekundárnu štruktúru [napr. Chou *et. al., Biochem.,* 13: 222 (1974)], ktorá umožní rozpoznať oblasti OB polypeptidu zodpovedné za špecifické sekundárne štruktúrne rysy. Pri vypracovaní predpokladanej alebo reálnej štruktúry vrátane sekundárnej štruktúry, možno použiť počítačové programy oblasti techniky.

Vďaka tomu, že predpokladaný vynález poskytuje bohatý zdroj rekombinantného OB polypeptidu, možno uskutočňovať kvantitatívnu štruktúrnu charakterizáciu polypeptidu. Konkrétne vynález poskytuje dostatočné množstvo látky na spektrálne analýzy, ako sú nukleárna magnetická rezonancia (NMR), infračervená spektroskopia (IR), Ramanova spektroskopia a ultrafialová spektroskopia (UV), najmä pre cirkulárny dichroizmus (CD). NMR spektroskopia umožňuje veľmi významnú štruktúrnu analýzu molekúl v roztoku, teda v prostredí, ktoré sa blíži prirodzeným podmienkam [Marion *et. al., Biochim Biophys. Res. Comm.,* 113: 967 až 974 (1983); Bar *et. al., J. Kagn. Reson.,* 65: 355 - 360 (1985); Kimura et. *al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 77: 1681 - 1685 (1980)]. Ďalším typom štruktúrnej analýzy je napr. röntgenová kryštalografia [Engstom, *Biochem. Exp. Biol.,* 11: 7 - 13 (1974)].

Podľa ďalšieho uskutočnenia vynálezu možno testovať OB polypeptid z hľadiska krížovej reakcie s protilátkou pre prirodzený alebo jeho špecifický fragment. Stupeň krížovej reaktivity poskytuje informáciu o štruktúrnej homológii alebo podobnosti proteínov, alebo o prístupnosti oblastí zodpovedajúcich častiam polypeptidu, ktoré boli použité pri generácii špecifických protilátok.

Vyhľadávanie OB analógov

V oblasti techniky existuje mnoho postupov na vyhľadávanie analógov OB polypepditu, sú dostupné rôzne súbory chemikálií. Predkladaný vynález samozrejme uvažuje vyhľadávanie OB analógov v súboroch, ako sú napr. súbory syntetických zlúčenín vznikajúce dlhoročným výskumom, súbory prirodzených zlúčenín a kombinované súbory, ako bude podrobnejšie opísané ďalej. V konkrétnom uskutočnení vynálezu boli v knižniciach vyhľadávané zlúčeniny, ktoré sa viažu na anti-OB protilátky, výhodne na protilátky proti ľudskému OB polypeptidu. Po identifikácii OB receptora (pozri ďalej) možno použiť ktorýkoľvek testovací postup známy v oblasti techniky na vyhľadávanie agonistov alebo antagonistov OB receptora. Predkladaný vynález uvažuje vyhľadávanie malých molekúl ligandov alebo ligandových analógov a látok, ktoré ich napodobňujú, aj vyhľadávanie prirodzených ligandov, ktoré sa viažu na OB receptor, agonizujú či antagonizujú jeho aktiváciu *in vivo.*

Znalosť primárnej sekvencie receptoru a miery jej podobnosti so sekvenciami známych proteínov, môže byť prvou stopou k riešeniu otázky, či je agonist alebo antagonist proteínu. Identifikácia a vyhľadávanie antagonistov sú ďalej uľahčené po vypracovaní štruktúrnej charakteristiky proteínu, napr. pomocou röntgenovej kryštalografie, neutrónovej difrakcie, nukleárnej magnetickej rezonancie a ďalších postupov štruktúrnej analýzy. Tieto postupy umožňujú racionálne navrhovanie alebo identifikáciu agonistov a antagonistov.

Iný prístup využíva na tvorbu veľkých súborov rekombinantný bakteriofág. „Fágovým postupom" [Scott *et. al., Science,* 249: 386 - 390 (1990); Cwirla *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87: 6378 - 6382 (1990); Devlin *et. al., Science,* 249: 404 - 406 (1990)], možno konštruovať aj veľmi rozsiahle súbory (10^6-10^8 chemických indivíduí). Iný prístup vychádza primárne z chemických postupov, napr. Geysenov postup [Geysen *et. al., Molecular Immunology,* 23: 709 - 715 (1986); Geysen *et. al., J. Immunologic Method,* 102: 259 - 274 (1987)] alebo nový Fodorov postup [Fodor *et. al., Science,* 251: 767 - 773 (1991)]. Postup prípravy zmesi peptidov na testovanie agonistov či antagonistov, je opísaný v článkoch Furka *et. al.,* 14th International Congress of Biochemistry, Volume 5, Abstract FR:013 (1988); Furka, *Int. J. Peptide Protein Res.,* 37: 487 - 493 (1991); Houghton (U. S. Patent č. 4 631 211, vydaný v decembri 1986) a Rutter *et. al.,* (U. S. Patent č. 5 010 175, vydaný v apríli 1991).

Iný prístup využíva na vyhľadávanie OB receptorových ligandov predkladaného vynálezu syntetické súbory [Needels et. *al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90: 10700 - 10704 (1993); Lam *et. al.,* International Patent

Publication č. WO 92/00252, uvedené v odkazoch]. V týchto súboroch sa detegujú antagonisty OB receptora na bunkách exprimujúcich receptor, bez nutnosti skutočne OB receptor klonovať.

Alternatívne možno testovať väzbu rozpustného ligandu na bunky, ktoré exprimujú rekombinantné formy väzbovej domény ligandy OB receptora. Ako rozpustné ligandy môžu vhodne poslúžiť rekombinantný alebo syntetický polypeptid.

Vyhľadávanie možno uskutočňovať na rekombinantných bunkách, ktoré exprimujú OB receptor, alebo alternatívne s purifikovaným receptorovým proteínom, napr. pripraveným rekombinantným postupom. Na vyhľadanie súboru, ako je uvedené v predchádzajúcich odkazoch, možno využiť schopnosť označeného, rozpustného alebo rozpusteného OB receptoru viazať ligand, pričom tento receptor musí obsahovať časť molekuly, ktorá zaisťuje väzbu na ligand.

Deriváty OB polypeptidu

Predkladaný proteín (pojem „proteín" zahŕňa aj „polypeptid", pokiaľ nie je stanovené inak) možno derivatizovať zavedením jednej alebo niekoľkých chemických skupín do molekuly proteínu. Chemicky modifikované deriváty možno ďalej použiť do prípravkov určených na intraarteriálne, intraperitoneálne, intramuskulárne, subkutánne, intravenózne, perorálne, nazálne, rektálne, bukálne, sublingválne, pulmonálne, topické, transdermálne a pod. podávanie. Bolo zistené, že chemicky modifikované biologicky aktívne proteíny môžu podľa okolností poskytovať aj ďalšie výhody, napr. vyššiu stabilitu a môžu dlhšie pretrvávať v obehu alebo mať zníženú imunogenitu. Pozri U. S. Patent č. 4 179 337, Davis *et. al.*, vyd. 18. 12. 1979. Prehľad pozri Abuchowski *et. al.*, „Soluble Polymer-Enzyme Adducts" v *Enzymes as Drugs*, str. 367 - 383, Holcenberg, Roberts vyd., Wiley-Onterscience, New York, NY, (1981). Prehľadný článok o modifikácii proteínov a fúznych proteínov pozri Francis, *Focus on Growth Factors* 3: 4 - 10 (1992).

Chemické skupiny na derivatizáciu

Chemické skupiny vhodné na derivatizáciu možno voliť medzi polymérmi rozpustnými vo vode. Rozpustnosť vo vode je nutná preto, aby sa derivatizovaný proteín vo vodnom fyziologickom prostredí nezrážal. Na terapeutické účely je vhodné, aby polymér konečného produktu derivatizácie bol farmaceuticky prijateľný. Skúsený odborník v odbore bude schopný zvoliť vhodný polymér s ohľadom na možné terapeutické využitie konjugátu polymér/proteín, požadovanú dávku, čas pretrvania v obehu, rezistenciu na proteolýzu a iné kritériá. Pri predkladaných proteínoch a peptidoch možno splnenie takých kritérií zistiť pomocou uvedených testov.

Polymérové molekuly

Polyméry rozpustné vo vode možno voliť zo skupiny látok zahŕňajúcich napríklad polyetylénglykol, kopolyméry etylénglykol/propylénglykol, karboxymetylcelulózu, dextrán, polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidón, poly-1,3-dioxolán, poly-1,3-trioxán, kopolymér etylén/maleínanhydrid, polyaminokyseliny (homopolyméry alebo náhodné kopolyméry) a dextrán alebo poly(n-vinyl pyrolidín)polyetylénglykol, homopolymér polypropylénglykolu, kopolyméry polypropylénoxid/etylénoxid, polyoxyetylované polyoly a polyvinylalkohol. Polyetylénglykol propiónaldehyd je pri spracovaní výhodný vzhľadom na stabilitu vo vode.

Polyméry môžu mať ľubovoľnú molekulovú hmotnosť, môžu byť rozvetvené aj nerozvetvené. Z hľadiska ľahkého spracovania je výhodná molekulová hmotnosť polyetylénglykolu 2 kDa až 100 kDa (molekulová hmotnosť polyetylénglykolu použitého v prípravkoch sa môže mierne líšiť od uvedenej hodnoty). Možno však zvoliť aj iné molekulové hmotnosti podľa terapeutického zámeru (napr. čas pretrahovaného uvoľňovania liečiva, prípadné vplyvy na biologickú aktivitu, jednoduchosť pri manipulácii, stupeň antigenicity, či jej neprítomnosť a ďalšie známe účinky polyetylénglykolu na terapeutický proteín alebo analóg).

Pomer polymér/proteín

Počet naviazaných polymérových molekúl na proteín je variabilný, odborník v odbore je schopný rozhodnúť z hľadiska funkčnosti. Možno mono-derivatizovať alebo di-, tri-, tetra-derivatizovať, prípadne voliť kombinácie derivatizácií, použiť jednu alebo rôzne chemické skupiny (napr. polyméry, napr. rôzne molekulové hmotnosti polyetylénglykolov). Pomer molekúl polyméru k molekulám proteínu (peptidu) je premenlivý podľa ich koncentrácií v reakčnej zmesi. Optimálny pomer (za predpokladu úplnej reakcie, keď sa v reakčnej zmesi nezvýšia žiadne nezreagované proteíny ani polyméry), je daný faktormi ako požadovaný stupeň derivatizácie (t. j. mono-, di-, tri- atď.), molekulová hmotnosť zvoleného polyméru, ak je polymér rozvetvený alebo nerozvetvený, reakčné podmienky.

Naviazanie chemickej skupiny na proteín

Tio väzby molekúl polyetylénglykolu (alebo inej chemickej skupiny) na prote by mal byť volený s ohľadom na funkčné alebo antigénne domény proteínu. V odbore techniky existuje mnoho spôsobov uskutočňo-

vania väzieb, napr. EP 0 401 384, uvedené v odkazoch (väzba PEG na G-CSF). pozri tiež Malik *et. al., Exp. Hematol.,* 20: 1028 - 1035 (1992) (týkajúci sa pegylácie GM-CSF pomocou tesyl chloridu).

Polyetylénglykol možno napríklad naviazať na aminokyselinový zvyšok v mieste reaktívnej skupiny, ako je voľná aminoskupina alebo karboxylová skupina. Reaktívne skupiny sú tie, ku ktorým sa môže aktivovaný polyetylén glykol naviazať. Aminokyselinové zvyšky s voľnou aminoskupinou sú napríklad lyzínové zvyšky, N-koncové aminokyseliny, aminokyselinové zvyšky s voľnou karboxylovou skupinou sú napríklad zvyšky kyseliny aspartovej, glutámovej a C-koncové aminokyseliny. Na väzbu polyetylénglykolu možno ako reaktívne skupiny taktiež využiť sulhydrylové skupiny. Na terapeutické účely sú výhodné väzby využívajúce aminofunkciu, napr. na N-konci alebo s lyzínovými zvyškami. Chemické skupiny by nemali byť naväzované na zvyšky dôležité na receptorové väzby, pokiaľ majú receptorové väzby vznikať.

Chemicky modifikované proteíny na N-konci

V niektorých prípadoch je žiaduce chemicky modifikovať N-koniec proteínu. Napríklad pri modifikácii polyetylénglykolom možno voliť rôzne polyetylénglykolové molekuly (podľa molekulovej hmotnosti, rozvetvenia atď.), možno voliť pomer molekúl polyetylénglykolu k proteínu (alebo peptidu) v reakčnej zmesi, typ pegylačnej reakcie a postup izolácie pegylovaného proteínu na N-konci. Izoláciu N-koncovo pegylovaného derivátu (t. j. oddelenie tohto derivátu od ostatných monopegylátov) možno uskutočniť purifikáciou N-koncovo pegylovaného materiálu od ostatných pegylovaných molekúl proteín. Ďalej možno vykonať selektívnu N-koncovú chemickú modifikáciu reduktívnou alkyláciou, ktorá využíva rozdielnu reaktivitu rôznych typov derivatizovateľných primárnych aminoskupín určitého proteínu (lyzín proti N-koncu). Za určitých špecifických reakčných podmienok možno dosiahnuť v podstate selektívnu derivatizáciu N-konca proteínu polymérom s karbonylovou skupinou. Napríklad možno selektívne pegylovať proteín na N-konci pri určitej hodnote pH, ktorá umožní využiť výhodný rozdiel v pKa pre epsilon-aminoskupinu lyzínového zvyšku a α-aminoskupinu N-koncového zvyšku. Týmto spôsobom možno ovplyvniť naviazanie polyméru rozpustného vo vode na proteín: konjugácia s polymérom prebehne prevažne na N-konci proteínu a nezasiahne významne ostatné reaktívne skupiny, ako je napr. aminoskupina bočného lyzínového reťazca. Pri reduktívnej alkylácii možno použiť vo vode rozpustný polymér uvedeného typu, ale musí obsahovať karbonylovú skupinu na kondenzačnú reakciu s proteínom. Možno použiť napríklad polyetylénglykol propiónaldehyd nesúci jednu reaktívnu aldehydickú skupinu.

Nukleové kyseliny súvisiace s OB polypeptidom

Predkladaný vynález sa týka taktiež nukleových kyselín kódujúcich OB polypeptidy a ďalších genómových nekódujúcich sekvencií 5', 3" alebo intrónov súvisiacich s *OB* génom. Podľa predkladaného vynálezu možno v tejto oblasti využívať bežné molekulárne biologické a mikrobiologické postupy a postupy využívajúce rekombinantnú DNA, ako je v oblasti techniky známe. Tieto postupy sú úplne opísané v literatúre. Pozri napr. Sambrook et. *al., Molecular Cloninq: A Laboratory Manual,* 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); Glover vyd., *DNA Cloning: A Practical Approach,* vol Ia II, MRL Press, Ltd, Oxford, U. K. (1985); Gait ed., *0linucleotide Synthesis, Oxford University Press* (1984); Hames *et. al.,* vyd., *Nucleic Acid Hybridization,* Springer-Verlag (1985); Hames *et. al.,* vyd., *Transcription and Translation,* Oxford University Press (1984); Freshney vyd., *Animal Cell Culture,* Oxford University Press (1986); *Immobilized Cells And Enzymes,* IRL Press (1986); Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloninq, Wiley,* New York (1984). Medzi obzvlášť dôležité postupy predkladaného vynálezu patria postupy izolácie, klonovania, sekvenovania, analýzy a charakterizácie génu alebo nukleovej kyseliny využívajúce známy postup polymerázovej reťazovej reakcie (PCR).

„Replikon" je genetický prvok (napr. plazmid, chromozóm, vírus), ktorý pôsobí ako autonómna jednotka pri replikácii DNA *in vivo,* t. j. riadi vlastnú replikáciu.

„Vektor" je replikon, napr. plazmid, fág alebo kozmid, ku ktorému môže byť pripojený iný segment DNA, ktorý je potom replikovaný spolu s ním.

„Kazeta" je segment DNA, ktorý môže byť inzertovaný do vektora v špecifických reštrikčných miestach. Segment DNA kóduje zvolený polypeptid, kazeta a reštrikčné miesta sú naplánované tak, aby bola zaistená inzercia kazety do príslušného čítacieho rámca na transkripciu a transláciu.

„Heterológová" DNA je DNA, ktorá je bunke cudzia alebo je v jej chromozóme umiestnená neprirodzene. Heterológová DNA výhodne obsahuje cudzí gén.

Bunka bola „transfektovaná" exogénnou alebo heterológovou DNA, ak takáto DNA bola zavedená do vnútra bunky. Bunka bola „transformovaná" exogénnou alebo heterológovou DNA, ak transfektovaná DNA viedla k zmene fenotypu. Je výhodné, pokiaľ sa transformačná DNA integruje (kovalentne viaže) do chromozomálnej DNA a stane sa súčasťou bunkového genómu.

„Klon" je populácia buniek vzniknutá mitotickým delením z jednej bunky alebo zo spoločného predka.

„Molekula nukleovej kyseliny" je polymérová forma fosfátových esterov ribonukleotidov (adenozín, guanozín, uridín alebo cystidín; „molekuly RNA") alebo deoxyribonukleotidov (deoxyadenozín, deoxyguano-

zín, deoxytymidín alebo deoxycytidín; „molekuly DNA"), vyskytujúca sa v jednovláknovej alebo dvojvláknovéj skrutkovitej forme. Prirodzene sa vyskytujú skrutkovice DNA-DNA, DNA-RNA a RNA-RNA. Výraz „molekula nukleovej kyseliny" sa týka len primárnej a sekundárnej štruktúry molekuly, nevymedzuje žiadne konkrétne formy terciálnej či kvartérnej štruktúry. Výraz teda zahŕňa dvojvláknovú DNA, ktorá sa o. i. nachádza v lineárnych a cirkulárnych molekulách DNA (napr. reštrikčné fragmenty), v plazmidoch a chromozómoch. Pri štruktúre konkrétnej dvojvláknovéj molekuly DNA, sú sekvencie opisované bežným spôsobom v smere 5' -> 3' netranskribovaného vlákna DNA (t. j. vlákno s homológovou sekvenciou k mRNA). „Molekula rekombinantnej DNA" je molekula DNA upravená molekulárne biologickými postupmi.

Molekula nukleovej kyseliny „hybridizuje" s inou molekulou nukleovej kyseliny napr. s cDNA, genómovou DNA alebo RNA, pokiaľ sa jednovláknová forma molekuly nukleovej kyseliny môže anelovať k inej molekule nukleovej kyseliny v príslušných podmienkach, t. j. pri určitej teplote a iónovej sile roztoku (pozri Sambrook *et. al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2. vyd., *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York* (1989)). Teplota a iónová sila roztoku sú kritériá „prísnosti" hybridizácie. Na predbežné vyhľadávanie homológových nukleových kyselín sú volené málo „prísne" hybridizačné podmienky zodpovedajúce T_m pri 55 °C (napr. 5 x SSC, 0,1 SDS, 0,25 % mlieko a žiadny formamid; alebo 30 % formamid, 5 x SSC, 0,1 % SDS). Mierne „prísne" hybridizačné podmienky zodpovedajú vyššej T_m napr. 50 % formamid, 5 x alebo 6 x SSC. Podmienkou hybridizácie sú dve nukleové kyseliny s komplementárnymi sekvenciami, podľa „prísnosti" hybridizačných podmienok však môže niekedy nastať chybné párovanie báz. Vhodná „prísnosť" podmienok hybridizácie konkrétnych nukleových kyselín závisí od ich dĺžky a stupňa komplementarity, čo sú premenné veličiny v oblasti techniky známe. Čím väčší je stupeň podobnosti alebo homológie medzi dvoma nukleotidovými sekvenciami, tým vyššiu hodnotu T_m majú vzniknuté hybridné molekuly. Relatívna stabilita (podľa hodnoty T_m) hybridných nukleových kyselín klesá v poradí: RNA : RNA, DNA : RNA, DNA : DNA. Pre hybridné molekuly s dĺžkou presahujúcou 100 nukleotidov boli odvodené rovnice na výpočet T_m (pozri Sambrook *et. al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual,* 2. vyd., *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York* (1989), 9.50 - 0.51). Pri hybridizácii kratších úsekov nukleových kyselín, napr. oligonukleotidov, je poloha prípadných chybných párov dôležitejšia a dĺžka oligonukleotidu je pre špecifickosť hybridizácie určujúci (pozri Sambrook *et. al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2. vyd., *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York* (1989), 11.7 - 11.8). Minimálna výhodná dĺžka na hybridizáciu nukleových kyselín je najmenej 10 nukleotidov; výhodnejšie 15 nukleotidov, najvýhodnejšie 20 nukleotidov.

„Homológová rekombinácia" je inzercia vektora s cudzou sekvenciou DNA do chromozómu. Je výhodné, pokiaľ je vektor nasmerovaný do určitého miesta chromozómu, špecifického na homológovú rekombináciu. Pri špecifickej homológovej rekombinácii musí vektor obsahovať dostatočne dlhé oblasti homológovej sekvencie s chromozómom, aby bolo zaistené komplementárne naviazanie vektora na chromozóm. Ďalšie homológové oblasti a vyšší stupeň sekvenčnej podobnosti zvyšuje účinnosť homológovej rekombinácie.

„Kódujúca sekvencia" DNA je sekvencia dvojvláknovej DNA, ktorá je v bunke transkribovaná a prekladaná do polypeptidu *in vitro* alebo *in vivo,* pokiaľ je ale vhodne umiestnená vzhľadom na príslušné regulačné sekvencie. Kódujúca sekvencia je ohraničená štartovacím kodónom na 5' (amino) konci a stop-kodónom translácie na 3' (karboxylovom) konci. Kódujúca sekvencia môže zahŕňať, nie výhradne, prokaryontné sekvencie, cDNA z eukaryontnej mRNA, eukaryontnú genómovú DNA (napr. DNA cicavcov) a syntetické sekvencie DNA. Pokiaľ je kódujúca sekvencia určená na expresiu v eukaryontných bunkách, je zvyčajne na 3' konci umiestnená polyadenylová signálna sekvencia a terminačná sekvencia na transláciu.

Izolácia kódujúcich a okrajových sekvencií *OB*

Nukleové kyseliny predkladaného vynálezu zahŕňajú nukleové kyseliny kódujúce expresiu peptidov so sekvenciami SEQ ID č. 2 (obr. 1 (A až D)), SEQ ID č. 4 (obr. 3), SEQ ID č. 5 (obr. 5) a SEQ ID č. 6 (obr. 6). Zatiaľ čo špecifická DNA bola izolovaná a sekvenovaná vo vzťahu k *OB* génu, môže ľubovoľná živočíšna bunka poslúžiť ako zdroj nukleových kyselín na molekulárne klonovanie génu kódujúceho peptidy predkladaného vynálezu. DNA možno získať známymi štandardnými postupmi z klonovanej DNA (napr. z DNA „knižnice"), chemickou syntézou, klonovaním cDNA alebo klonovaním genómovej DNA alebo jej fragmentov purifikovaných z príslušnej bunky (pozri napr. Sambrook *et. al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2. vyd., *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York* (1989); Glover ed., *DNA Cloning: A Practical Approach,* vol Ia II, *MRL Press, Ltd, Oxford, U. K.* (1985)). Klony odvodené z genómovej DNA môžu obsahovať vedľa kódujúcich sekvencií aj regulačné a intrónové oblasti DNA; klony odvodené od cDNA neobsahujú intrónové sekvencie. Bez ohľadu na zdroj, možno gén molekulárne naklonovať do vektora vhodného na propagáciu génu.

Pri molekulárnom klonovaní génu z genómovej DNA, možno genómovú DNA amplifikovať s využitím primárov pochádzajúcich zo sekvencií cDNA. Alternatívne možno generovať fragmenty DNA, z ktorých niektoré kódujú požadovaný gén. DNA možno štiepiť v špecifických štiepnych miestach reštrikčnými enzýmami. Taktiež možno na fragmentáciu DNA použiť DNázu v prítomnosti mangánu alebo DNA mechanicky po-

lámať, napr. sonikáciou. Lineárne fragmenty DNA sa potom rozdelia podľa veľkostí štandardnými postupmi, ako sú, nie výhradne, elektroforéza na polyakrylamidovom alebo agarózovom géli a stĺpcová chromatografia.

Zo súboru pripravených fragmentov DNA možno špecifické fragmenty obsahujúce požadovaný *OB* alebo príbuzný gén identifikovať mnohými spôsobmi. Napríklad, ak je k dispozícii purifikovateľné a označiteľné množstvo časti génu *OB* génu, príbuzného génu alebo príslušnej RNA, či jej fragmentu, možno uskutočniť prehľadávanie generovaných fragmentov DNA postupom hybridizácie k označenej sonde [Benton *et. al., Science,* 196: 180 (1977); Grunstein *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 72: 3961 (1975)]. Predkladaný vynález poskytuje próby nukleových kyselín, ktoré možno pohodlne pripraviť z uvedených špecifických sekvencií, ako je napr. hybridizačná próba s nukleotidovou sekvenciou zodpovedajúcou najmenej 10, výhodnejšie 15-nemu nukleotidovému fragmentu zo sekvencie SEQ ID č. 1 (obr. 1 (A až E) alebo SEQ ID č. 3 (obr. 2 (A a B)). Je výhodné, aby zvolený fragment bol vysoko špecifický pre modulátorové peptidy predkladaného vynálezu. Dobre hybridizovať budú DNA fragmenty, ktorých sekvencia je v podstate homológová so sondou. Ako bolo uvedené, s rastúcim stupňom sekvenčnej homológie možno sprísňovať hybridizačné podmienky. Pri konkrétnom uskutočnení vynálezu boli na identifikáciu homológového modulátorového peptidu zvolené málo „prísne" hybridizačné podmienky. Výhodnejšie je, pokiaľ nukleová kyselina kódujúca predkladaný modulátorový peptid hybridizuje s nukleotidovými sekvenciami SEQ ID č. 1 (obr. 1 (A až E)) alebo SEQ ID č. 3 (obr. 2 (A a B)), prípadne s ich fragmentmi, v stredne „prísnych" podmienkach, výhodnejšie vo vysoko „prísnych" podmienkach, ako je tiež ukázané v príkladoch.

Alternatívne možno gén detegovať pomocou testov vychádzajúcich z fyzikálnych, chemických alebo imunologických vlastností analyzovaných expresných produktov. Napríklad možno selektovať klony cDNA alebo klony DNA produkujúce proteín a hybridizujúce s náležitými mRNA, podľa podobnosti so známymi modulátorovými peptidmi predkladaného vynálezu, napr. majú blízku alebo identickú elektroforetickú pohyblivosť, blízke alebo identické vlastnosti pri izoelektrickej fokusácii, proteolytické mapovanie, tyrozín fosfatázovú aktivitu alebo antigénne vlastnosti. Napríklad protilátky predkladaného vynálezu možno pohodlne použiť na vyhľadávanie homológových modulátorových peptidov z iných zdrojov.

Gén kódujúci predkladaný modulátorový peptid môže byť identifikovaný taktiež na základe mRNA selekcie, t. j. hybridizáciou nukleových kyselín a následnou transláciou *in vitro*. Pri tomto postupe sa fragmenty používajúce na izoláciu komplementárnych mRNA pomocou hybridizácie. Tieto fragmenty DNA predstavujú dostupnú purifikovanú modulátorovú DNA. Imunoprecipitačná alebo funkčná analýza (napr. test tyrozín fosfátovej aktivity) produktov translácie *in vitro,* produktov izolovaných molekúl mRNA umožňuje identifikovať mRNA a teda komplementárne fragmenty DNA s hľadanou sekvenciou. Špecifické mRNA možno tiež selektovať absorpciou polyzómov izolovaných z buniek na imobilizované protilátky špecifické na modulátorový peptid.

Rádioaktívne označenú cDNA modulátorového peptidu možno syntetizovať na templáte selektovanej mRNA (z absorbovaných polyzómov). Rádioaktívne označená mRNA alebo cDNA sa potom využíva ako próba na vyhľadávanie homológových fragmentov DNA modulátorového peptidu medzi ostatnými fragmentmi genómovej DNA.

Sekvenciu DNA kódujúcu peptidové modulátory hmotnosti je vhodnejšie pripraviť synteticky než klonovaním. Sekvenciu DNA možno naplánovať podľa kodónov zodpovedajúcich sekvencií aminokyselín peptidu modulátora hmotnosti. Tento prístup umožňuje výber výhodnejších kodónov s ohľadom na zvoleného expresného hostiteľa. Celá sekvencia je zložená z presahujúcich oligonukleotidov pripravených štandardnými postupmi a spojená do úplnej kódujúcej sekvencie. Pozri napr. Edge, *Nature,* 292: 756 (1981); Nambair *et. al., Science,* 223: 1299 (1984); Jay *et. al., J. Biol. Chem.,* 259: 6311 (1984).

Syntetické DNA uľahčujú konštrukciu génov, ktoré môžu exprimovať analógy modulátorov hmotnosti. Alternatívne DNA kódujúce analógy môžu byť pripravené cielene špecifickou mutagenézou natívnych *OB* génov alebo cDNA, analógy možno taktiež pripraviť priamo bežnou peptidovou syntézou.

Všeobecný postup pre cielene špecifickú inkorporáciu neprirodzených aminokyselín do proteínu je opísaný v Noren *et. al., Science,* 244: 182 - 188 (1989). Týmto postupom možno pripravovať analógy OB polypeptidu obsahujúce neprirodzené aminokyseliny.

Nekódujúce nukleové kyseliny

Predkladaný vynález zahŕňa aj prípravu anti-sense nukleotidov a ribozýmov zasahujúcich do expresie proteínov modulátoru hmotnosti na úrovni translácie. Anti-sense nukleovej kyseliny a rybozýmy blokujú transláciu špecifickej mRNA tým, že ju buď maskujú, alebo štiepia ribozýmom.

Anti-sense nukleové kyseliny sú molekuly DNA alebo RNA komplementárne aspoň k časti špecifickej molekuly mRNA [pozri Weintraub, *Sci. Am.,* 262: 40 - 46 (1990)]. V bunke s touto mRNA hybridizujú za vzniku dvojvláknového komplexu. Bunka nie je schopná prekladať mRNA vytvárajúcu takýto dvojvláknový komplex. Týmto spôsobom zasahujú anti-sense nukleové kyseliny v mieste mRNA do expresie proteínu. Najmä účinné sú oligoméry dĺžky 15 nukleotidov a molekuly hybridizujúce s iniciačným kodónom AUG, lebo sú ľahko syntetizovateľné a predstavujú menší problém pri zavádzaní do buniek produkujúcich moduláto-

ry telesnej hmotnosti, než veľké molekuly. Anti-sense postupy boli použité pri inhibovaní expresie mnohých génov *in vitro* [Marcus-Sekura, (1988); Hambor *et. al., J. Exp. Med.,* 168: 1237 - 1245 (1988)].

Ribozými sú molekuly RNA, ktoré špecificky štiepia iné jednovláknové molekuly RNA, podobne ako reštrikčné endonukleázy štiepia DNA. Ribozýmy boli objavené na základe pozorovania, že určité mRNA vystupujú svoje vlastné intróny. Modifikáciou nukleotidovej sekvencie takýchto mRNA dokázali vedci zostrojiť molekuly, ktoré rozpoznávajú a štiepia špecifické nukleotidové sekvencie RNA [Cech, *J. Am. Med. Assoc.,* 260: 3030 - 3034 (1988)]. Vďaka sekvenčnej špecifickosti dochádza teda k inaktivácii len určitých sekvencií mRNA.

Vynálezci identifikovali dva typy ribozýmov, typ *Tetrahymena* a typ „hammerhead". Ribozými typu *Tetrahymena* rozpoznávajú sekvenciu štyroch báz, rybozýmy „hamerhaed" rozpoznávajú sekvencie 11 až 18 báz. Čím dlhšia je rekogničná sekvencia, tým je pravdepodobnejšie, že sa bude vyskytovať výlučne v cieľovej mRNA. Preto sú na inaktiváciu špecifických mRNA výhodnejšie ribozýmy „hamerhead" než *Tetrahymena* a 18-nukleotidové rekogničné sekvencie sú výhodnejšie než kratšie.

Predkladané sekvencie DNA možno teda použiť na prípravu anti-sense molekúl k mRNA proteínov modulátora hmotnosti a ich ligandov a na prípravu ribozýmov, ktoré túto mRNA štiepia; a tak inhibovať expresiu *OB* génu a indukovať nárast hmotnosti a adipozity.

Iné uskutočnenie predkladaného vynálezu poskytuje krátke oligonukleotidy komplementárne ku kódujúcim a komplementárnym vláknam nukleovej kyseliny *OB,* alebo k nekódujúcim oblastiam 5', 3', alebo krátke oligonukleotidy z kódujúcej oblasti. Tieto oligonukleotidy slúžia ako próby, buď ako priamo označené oligonukleotidické próby, alebo ako priméry na polymerázovú reťazovú reakciu, na vyhodnocovanie mutácií v *OB* géne alebo úrovne expresie *OB* mRNA. Nekódujúce nukleové kyseliny predkladaného vynálezu pochádzajú výhodne z ľudského *OB* génu.

V inom uskutočnení predkladaného vynálezu slúžia nekódujúce nukleové kyseliny pri homológovej rekombinácii na integráciu amplifikovateľného génu a/alebo iných regulačných sekvencií do blízkosti *OB* génu, napr. kvôli dosiahnutiu vyššej hladiny expresie OB polypeptidu, alebo kvôli zatieneniu mutácie v regulačnej sekvencii *OB* génu, ktorá bráni patričnej úrovni expresie OB polypeptidu (pozri Medzinárodná patentová publikácia WO 91/06666, vyd. 16. 5. 1991, „Skoultchi; Medzinárodná patentová publikácia WO 90/14092, vyd. 29. 11. 1990, Kucherlapati, Campbell).

Produkcia OB polypeptidu: expresia a syntéza

Transkripčné a translačné kontrolné sekvencie sú regulačné sekvencie DNA, napr. promótory, zosilňovače, terminátory a pod., ktoré zaisťujú expresiu kódujúcej sekvencie v hostiteľskej bunke. Eukaryontné bunky obsahujú polyadenylátové signálne kontrolné sekvencie.

Kódujúca sekvencia je v bunke „regulovaná" transkripčnou a translačnou regulačnou sekvenciou vtedy, keď je kódujúca sekvencia prepísaná RNA-polymerázou do mRNA, mRNA je zostrihaná a preložená do proteínu kódovaného kódujúcou sekvenciou.

„Signálna sekvencia" sa vyskytuje na začiatku kódujúcej sekvencie proteínu, ktorý má byť na povrchu bunky syntetizovaný. Táto sekvencia kóduje signálny polypeptid, ktorý sa nachádza na N-konci maturovaného polypeptidu a riadi translokáciu polypeptidu v hostiteľskej bunke. V súvislosti s uvedeným typom signálnej sekvencie býva používaný aj pojem „translokačná signálna sekvencia". Translokačné signálne sekvencie možno nájsť v mnohých rôznych prirodzených eukaryontných a prokaryontných proteínoch a často sú funkčné v obidvoch typoch organizmov.

Sekvencia DNA je „operatívne pripojená" k expresnej kontrolnej sekvencii vtedy, ak expresná kontrolná sekvencia reguluje transkripciu a transláciu tejto DNA. Pojem „operatívne pripojená" zahŕňa aj to, že sekvencia DNA určená na expresiu má na začiatku vhodný štartovací signál (napr. ATG), aj to že zostane zachovaný správny čítací rámec dovoľujúci expresiu sekvencie DNA za regulácie expresnou kontrolnou sekvenciou a produkcie požadovaného produktu kódovaného touto sekvenciou. Pokiaľ je nutné inzertovať do rekombinantnej DNA molekuly gén, ktorý neobsahuje vhodný štartovací signál, možno tento signál zaviesť do génu v protismere (5') a spolu s génom inzertovať do čítacieho rámca.

„Promótorová sekvencia" je regulačná oblasť DNA, ktorá v bunke zaisťuje väzbu RNA polymerázy a iniciuje transkripciu kódujúcej sekvencie po smere (smer 3'). Na účely definovania predkladaného vynálezu je promótorová sekvencia ohraničená na 3' konci transkripčným inicializačným miestom a v protismere (smer-5') zahŕňa len minimálny počet báz, ktorý postačuje na inicializáciu detegovateľnej hladiny transkripcie nad pozadím. Promótorová sekvencia obsahuje transkripčné inicializačné miesto (príhodne definovateľné napr. mapovaním nukleázou S1) a väzbovej domény pre proteín (súhlasné sekvencie) zodpovedné za väzbu RNA polymerázy.

Predkladaný vynález sa taktiež týka expresie uvedených sekvencií DNA. Ako je v oblasti techniky známe, podmienkou expresie sekvencií DNA je ich operatívne pripojenie k expresnej kontrolnej sekvencii vo vhodnom expresnom vektore a využití tohto vektora na transformáciu príslušného jednobunkového hostiteľa.

Podmienkou operatívneho pripojenia predkladanej sekvencie DNA k expresnej kontrolnej sekvencii je samozrejme zaistenie inicializačného kodónu ATG, ak nie priamo časti DNA sekvencie, v správnom čítacom rámci v protismere DNA sekvencie.

Na expresiu predkladaných sekvencií DNA možno použiť rôzne kombinácie hostiteľov a expresných vektorov. Použiteľné expresné vektory sú napríklad segmenty chromozomálnych, nechromozomálnych a syntetických sekvencií DNA. Vhodnými vektormi sú deriváty SV40 a známe bakteriálne plazmidy, napr. plazmidy *E. coli* col E1, pCR1, pBR322, pMB9, pUC alebo deriváty pUC, napr. vektory pGEX, pET, pmal-c, pFLAG atď. a deriváty uvedených vektorov ako plazmid RP4; fágové DNA, napr. mnohé deriváty fágu lambda, napr. NM989, a iné fágové DNA napr., M13 a filamentózny jednovláknový fág DNA; kvasinkové plazmidy ako napr. plazmid 2*u* a jeho deriváty; vektory použiteľné v eukaryontných bunkách, napr. bunkách hmyzu alebo cicavcov; vektory odvodené od kombinácií plazmidovej a fágovej DNA, ako sú plazmidy využívajúce expresné kontrolné sekvencie fágovej alebo inej DNA; a pod. Výhodné uskutočnenie vynálezu využíva expresiu OB v metylotrofných kvasinkách, napr. *Pichia pastoris* (pozri Medzinárodná patentová publikácia WO 90/03431, vyd. 5. 4. 1990, Brierly *et. al.;* Medzinárodná patentová publikácia WO 90/10697, vyd. 20. 9. 1990, Siegel *et. al.).* V uvedenom uskutočnení vynálezu, bol konštruovaný vektor na expresiu OB riadenou signálnou sekvenciou α-párovacieho faktora.

Z veľkého množstva expresných kontrolných sekvencií -t. j. sekvencií, ktoré regulujú expresiu operatívne pripojenej predkladanej DNA - možno pre vektor exprimujúci predkladanú sekvenciu DNA zvoliť ľubovoľnú expresnú kontrolnú sekvenciu. Vhodné expresné kontrolné sekvencie sú napr. včasné alebo neskoré promótory SV40, CMV, vakcínie, polyómy alebo adenovíru, *lac* systém, *trp* systém, *TAC* systém, *TRC* systém, *LTR* systém, hlavné operátorové a promótorové oblasti fágu lambda, kontrolné oblasti fd coat proteínu, promótor pre 3-fosfoglyrerát kinázu alebo iné glykolytické enzými, promótory kyslej fosfatázy (napr. Pho5), promótor A0X1 metylotrofných kvasiniek, promótory kvasinkového α-párovacieho faktora a iné známe sekvencie, ktoré riadia expresiu génov prokaryontných alebo eukaryontných buniek alebo ich vírusov a rôzne kombinácie uvedených promótorov.

Na expresiu predkladaných sekvencií DNA možno využiť mnoho rôznych jednobunkových hostiteľských buniek. Vhodnými hostiteľmi sú známe eukaryontné a prokaryontné bunky ako napr. kmene *E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces;* huby ako napr. kvasinky *(Saccharomyces* a metylotrofné kvasinky ako *Pichia, Candida, Sansenula a Torulopsi* s); a živočíšne bunky ako CHO, R1.1, B-W a LM, ľadvinové bunky z africkej Green Monkey (napr. COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 a BMT10), hmyzie bunky (napr. Sf9) a ľudské a rastlinné bunky v tkanivových kultúrach.

Je zrejmé, že nie všetky vektory, expresnej kontrolnej sekvencie, ani hostiteľské bunky, budú exprimovať predkladané sekvencie DNA rovnakým spôsobom. Taktiež je zrejmé, že nie všetky hostiteľské bunky budú pracovať rovnako s jedným expresným systémom. Odborník v odbore je však schopný zvoliť vhodné vektory, expresné kontrolné sekvencie a hostiteľa na dosiahnutie požadovanej úrovne expresie v rámci predkladaného vynálezu bez toho, aby musel neprimerane experimentovať. Napríklad pri voľbe vektora musí byť uvažovaný konkrétny hostiteľ, pretože vektor musí v tomto hostiteľovi fungovať. Taktiež musí byť uvažované množstvo kópií vektora, možnosť ovplyvňovať množstvo kópií a expresiu iných proteínov kódovaných vektorom, ako sú napr. antibiotické markery.

Pri voľbe expresnej kontrolnej sekvencie je zvyčajne uvažovaných mnoho faktorov, ako napr. relatívna sila systému, možnosť jeho regulácie, kompatibilita systému s konkrétnou sekvenciou DNA alebo génu určených na expresiu, najmä s ohľadom na možné sekundárne štruktúry. Vhodných jednobunkových hostiteľov možno voliť na základe úvah ako napr. kompatibilita hostiteľa so zvoleným vektorom, sekrečné vlastnosti hostiteľa, schopnosť hostiteľa vytvárať správne priestorové usporiadanie proteínov, fermentačné podmienky pre rast hostiteľa, rovnako ako prípadná toxicita produktu kódovaného sekvenciami DNA určenými na expresiu voči hostiteľovi a obtiažnosť purifikácie expresných produktov.

S ohľadom na tieto a ďalšie faktory je odborník v odbore schopný zostrojiť mnoho kombinácií vektor/expresná kontrolná sekvencia/hostiteľ, ktoré budú exprimovať predkladané sekvencie DNA fermentačné, alebo vo veľkom meradle v živočíšnych kultúrach.

V konkrétnom uskutočnení vynálezu bol exprimovaný fúzny proteín OB. Fúzny proteín OB obsahuje minimálne najmenšiu funkčnú časť proteínu, ktorý nie je OB proteínom, spojenú s peptidickou väzbou s minimálne najmenšou funkčnou časťou OB polypeptidu. Ne-OB sekvencie môžu byť pripojené k amino-alebo karboxylovému koncu OB. Z hľadiska rezistencie fúzneho OB proteínu proti proteolýze je výhodnejšie, pokiaľ sú ne-OB sekvencie pripojené peptidickou väzbou na amino-koniec OB proteínu. Rekombinantná molekula DNA kódujúca fúzny proteín obsahuje sekvenciu kódujúcu minimálnu funkčnú sekvenciu ne-OB časti pripojenú v čítacom rámci k sekvencii kódujúcej OB a výhodne ešte k sekvencii kódujúcej štiepne miesto na špecifickú proteázu, napr. trombín alebo Faktor Xa, výhodne v mieste spoja OB s ne-OB. V tomto konkrétnom uskutočnení bol fúzny proteín exprimovaný v *Escherichia coli* alebo v *P. pastoris.*

V konkrétnom uskutočnení boli pripravené vektory na expresiu myšacieho a ľudského *OB* génu, s kodónom a bez kodónu pre gln-49, v bakteriálnych a kvasinkových *(Pichia)* expresných systémoch vedúcich k

expresii fúznych proteínov. Do *OB* génu bolo zavedené štiepne miesto na endonukleázu, napr. pomocou PCR a nových primárov. Sekvencie pripravené PCR je vhodné overovať, lebo pri tomto postupe je vyššia pravdepodobnosť vzniku bodových mutácií. Vhodné je použiť plazmid obsahujúci His-tag a proteolytické štiepne miesto. Prítomnosť histidínu umožňuje selektívnu izoláciu rekombinantných proteínov na Ni-chelatačnej kolóne alebo afinitnou purifikáciou. Špecifické proteolytické miesto, v konkrétnom uskutočnení štiepne miesto na trombín, je do proteínu zavádzané preto, aby štiepenie proteázou napr. trombínom uvoľnilo plnú dĺžku maturovaného OB polypeptidu (t. j. bez signálnej sekvencie).

V inom uskutočnení bol použitý vektor pGEX [Smith *et. al., Gene* 67: 31 - 40 (1988)]. Tento vektor spája cDNA kódujúcu schistozoma japonicum glutathion S-transferázu s predkladanými sekvenciami DNA. Od bakteriálnych proteínov možno rekombinantné proteíny ľahko oddeliť na redukované glutathion-afinitnej kolóne. GST nosič sa potom z fúzneho proteínu odštiepi špecifickými proteázami. Po štiepení sa nosič a nerozštiepený fúzny protein odstráni absorpciou na glutatiónovej agaróze. Nevýhodou tohto systému môže byť prípadná nerozpustnosť kódovaného proteínu vo vodnom prostredí.

Rekombinantné proteíny exprimované v bakteriálnych systémoch môžu mať chybné priestorové usporiadanie vyžadujúce opravu. Rekombinantný protein možno znovu priestorovo usporiadať pred štiepením alebo po štiepení na funkčný OB polypeptid. Preusporiadanie OB polypeptidu sa uskutočňuje (i) inkubáciou proteínu v denaturačnom pufri s redukčným činidlom a potom (ii) inkubáciou proteínu v pufri s oxidačným činidlom a výhodne tiež s činidlom stabilizujúcim protein alebo chaotropným činidlom, prípadne s obidvoma. Vhodnými pármi redoxných činidiel sú, nie výhradne, redukovaný glutatión/glutatión disulfid, cystín/cysteín, cystamín/cysteamín a 2-merkaptoetanol/2-hydroxyetyldisulfid. V niektorom prípade možno fúzny protein rozpustiť pôsobením denaturačného činidla, ako je močovina. Podľa výhodného uskutočnenia možno protein pred zavedením do redukčného pufra tiež purifikovať napr. ionexovou alebo Ni-chelatačnou chromatografiou. Vhodnými denaturačnými činidlami sú, nie výhradne, močovina a guanidín hydrochlorid. Rekombinantný protein sa ďalej 10x, výhodnejšie 100x rozriedi do oxidačného pufra obsahujúceho, nie výhradne, 0,1 $mol.l^{-1}$ Tris-HCl pH 8,0; 0,1 $mmol.l^{-1}$ EDTA; 0,15 $mol.l^{-1}$ NaCl; 0,1 $mol.l^{-1}$ oxidovaného glutatiónu. Fúzny protein sa potom inkubuje 1 až 24 h, výhodne 2 až 16 h v oxidačnom pufri pri laboratórnej teplote. Oxidačný pufer môže obsahovať činidlo stabilizujúci protein, napr. cukor, alkohol alebo síran amónny. Oxidačný pufer môže ďalej obsahovať v nízkej koncentrácii chaotropné činidlo destabilizujúce chybné intermolekulárne interakcie a napomáha tak tvorbe správneho priestorového usporiadania. Vhodnými chaotropnými činidlami sú, nie výhradne, detergenty, polyoly, L-arginín, guanidín hydrochlorid a polyetylénglykol (PEG). Podstatné je zvoliť dostatočne nízku koncentráciu chaotropného činidla, aby nedochádzalo k denaturácii proteínu. Novousporiadaný protein možno zahustiť najmenej 10x, výhodne toľkokrát, koľkokrát bol rozriedený do oxidačného pufra.

Bakteriálnou fermentáciou môže taktiež vznikať rekombinantný protein sprevádzaný neprijateľným množstvom endotoxínov. Preto sa predkladaný vynález zaoberá odstraňovaním endotoxínov, napr. pomocou protilátok špecifických na endotoxín alebo molekúl, ktoré endotoxín viaže. Prítomnosť endotoxínu možno určiť štandardnými postupmi, napr. s využitím reagencií E-TOXATE (Sigma, St. Louis, Missouri) alebo biologickými testami.

Okrem uvedených postupov uvažuje predkladaný vynález expresiu OB proteínov v baculovírových, cicavčích a kvasinkových expresných systémoch. Napríklad v baculovírových expresných systémoch možno využiť nefúzne aj fúzne transferové vektory; nefúzne transferové vektory sú, nie výhradne, pVL941 (klonovacie miesto *Bam*H1; Summers), PVL1393 (klonovacie miesto *Bam*H1, *Sma*I, *Xba*I, *EcoR*I, *Not*I, *Xma*III, *Bg*III a *Pst*I; Invitrogen), pVL1392 (klonovacie miesto *BamE*I, *Sma*I, *Xba*I, *EcoR*I, *Not*I, *Xma*III, *Bg*II a *Pst*I; Summers a Invitrogen) a pBlue*Bac*III (klonovacie miesto *Bam*H1, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I a *Hind*III, s možnosťou rekombinantného skríningu modrá/biela; Invitrogen) a fúzne transferové vektory sú, nie výhradne, pAc700 (klonovacie miesto *BamE*I a *Kpn*I, kde rekogničné miesto *Bam*H1 začína s inicializačným kodónom; Summers), pAc701 a pAc702 (ako pAc700, s odlišnými čítacími rámcami), pAc360 (klonovacie miesto *Bam*H1 36 pb po smere od polyhedrínového inicializačného kodónu; Invitrogen(195)) a pBlueBacHis A, B, C (tri odlišné čítacie rámce, klonovacie miesto *Bam*H1, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I a *Hind*III, N-terminálny peptid pre ProBond purifikáciu a s možnosťou rekombinantného skríningu modrá/ biela plakov; Invitrogen(220)).

Expresné systémy cicavcov vhodné pre predkladaný vynález zahŕňajú vektory s indukovateľnými promótormi, ako je napr. dihydrofolát reduktázový (DHPR) promótor, napr. ľubovoľný expresný vektor s *DHPR* expresným vektorom alebo ko-amplifikačný vektor -*DHFR*/metotrexát ako pED (klonovacie miesto *Pst*I, *Sal*I, *Sba*I, *Sma*I a *Eco*RI, vektorom exprimuje klonovaný gén aj *DHFR;* pozri Kaufman, *Current Protocols in Molecular Biology,* 16.12 (1991)). Alternatívne, ko-amplifikačný vektor glutamín syntetáza/metionín sulfoximín, ako je pEE14 (klonovacie miesto *Hind*III, *Xba*I, *Sma*I, Sba*I, *Eco*RI a *Bcl*I, vektor exprimuje glutamín syntetázu a klonovaný gén; Celltech). Podľa iného uskutočnenia možno použiť vektor, ktorý riadi epizomálnu expresiu v systéme s vírusom Epstein-Barrovej (EBV), napr. pREP4 (klonovacie miesto *Bam*H1, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II a *Kpn*I, konštitutívny promótor RSV-LTR, hygromycínový selekčný marker; Invitrogen), pCEP4 (klonovacie miesto *Bam*H1, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II a *Kpn*I,

najbližší konštitutívny gén hCMV, hygromycínový selekčný marker; Invitrogen), pMEP4 (klonovacie miesto *Kpn*I, *Pvu*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, *Bam*H1, indukovateľný promótor génu pre metalotioneín IIa, hygromycínový selekčný marker; Invitrogen), pREP8 (klonovacie miesto *Bam*H1, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, a *Kpn*I, promótor RSV-LTR, hystidínový selekčný marker; Invitrogen), pREP9 (klonovacie miesto *Kpn*I, *Nhe*I, *Hin-dIII*, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I a *Bam*H1, promótor RSV-LTR, selekčný marker G418; Invitrogen) a pEBVHis (promótor RSV-LTR, hygromycínový selekčný marker, N-terminálny peptid purifikovateľný na nosiči ProBond a odštiepiteľný enterokinázou; Invitrogen). Selekčné expresné vektory cicavcov vhodné pre predkladaný vynález zahŕňajú pRc/CMV (klonovacie miesto *Hind*III, *Bst*XI, *Not*I, *Sba*I a *Apa*I, selekcia G418; Invitrogen), pRc/RSV (klonovacie miesto *Hind*III, *Spe*I, *Bst*XI, *Not*I, *Xba*I, selekcia G418; Invitrogen) a ďalšie. Expresné vektory cicavcov vírusu Vakcínie (pozri Kaufman, *Current Protocols in Molecular Biology*, 16.12 (1991)) vhodné pre predkladaný vynález sú, nie výhradne, pSC11 (klonovacie miesto *Sma*I, selekcia TK-a βgal), pMJ601 (klonovacie miesto *Sal*I, *Sma*I, *Afl*II, *Nar*I, *Bsp*HII, *Bam*HI, *Apa*I, *Nhe*I, *Sac*II, *Kpn*I *a Hind*III, selekcia TK- a βgal) a pTKgpF1S (klonovacie miesto -*Eco*RI, *Pst*I, *Sal*I, *Acc*I, *Hind*II, *Sba*I, *Bam*H1 *a Hpa*, selekcia TK alebo XPRT).

Podľa predkladaného vynálezu možno na expresiu OB polypeptidu použiť taktiež kvasinkové expresné systémy. Napríklad možno zvoliť nefúzny vektor pYES2 (klonovacie miesto *Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Not*I, *Gst*XI, *Eco*RI, *Bst*XI, *Bam*H1, *Sac*I, *Kpn*I *a Hind*III; Invitrogen) alebo fúzny pYESHis A, B, C (klonovacie miesto *Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Not*I, *Bst*XI, *Eco*RI, *Bam*H1, *Sac*I, *Kpn*I *a Hind*III, N-terminálny peptid purifikovateľný na nosiči ProBond a odštiepiteľný enterokinázou; Invitrogen).

Peptidické modulátory telesnej hmotnosti možno syntetizovať na základe nukleotidových sekvencií odvodených v rámci predkladaného vynálezu.

Vedľa rekombinantnej expresie, predkladaný vynález počíta aj so syntetickou prípravou OB polypeptidu a jeho fragmentov, využívajúce známe a vysoko vyvinuté postupy syntézy peptidov na pevnej fáze. Vynález zahŕňa prípravu OB polypeptidu a jeho fragmentov s využitím stratégie chrániacich skupín Boc a Fmoc a iných. V oblasti techniky sú tiež známe rôzne postupy na úpravu priestorového usporiadania polypeptidu a oxidáciu postranných cysteínových reťazcov na disulfidickú väzbu.

Protilátky k OB polypeptidu

Predkladané OB polypeptidy, pripravované rekombinantne alebo chemickou syntézou, ich fragmenty a iné deriváty a analógy vrátane fúznych proteínov, možno použiť ako imunogény pri generovaní protilátok rozpoznávajúcich OB polypeptid. Medzi tieto protilátky patria, nie výhradne, polyklonálne, monoklonálne, chimérne a jednoreťazcové protilátky, Fab fragmenty a Fab expresná knižnica.

Molekula je „antigénna", pokiaľ interaguje špecificky s molekulou imunitného systému rozpoznávajúceho antigén, ako je napr. imunoglobulín (protilátka) alebo receptor antigénu T-bunky. Antigénny polypeptid je tvorený najmenej 5, výhodne najmenej 10 aminokyselinami. Antigénnou časťou molekuly je tá časť, ktorá je pre rozpoznávanie protilátky alebo receptora T-bunky imunodominantná, alebo časť molekuly, ktorá bola konjugovaná k nosiču pri imunizačnom generovaní. Antigénna molekula nemusí byť sama osebe imunogénna, t. j. vyvolávajúca imunitnú odpoveď bez nosiča.

„Protilátka" je ľubovoľný imunoglobulín vrátane protilátok a ich fragmentov, ktorý sa viaže na špecifický epitop. Termín zahŕňa polyklonálne, monoklonálne a chimérne protilátky, posledne menovanými sa podrobnejšie zaoberá U. S. Patent č. 4 816 397 a 4 816 567, ktorý sa ďalej zaoberá väzbovými miestami pre antigén a časťami Fab, $F(ab')_2$ a F(v) (vrátane jednoreťazcových protilátok). Termín „molekula protilátky" v rôznych tvaroch, ako je tu používaný, teda zahŕňa intaktnú molekulu imunoglobulínu a imunologicky aktívnu časť molekuly imunoglobulínu s väzobným miestom. „Väzobné miesto protilátky" je štruktúrna časť molekuly protilátky tvorená hypervariabilnou oblasťou ťažkého a ľahkého reťazca, ktorá špecificky viaže antigén.

Protilátky sú napríklad intaktné molekuly imunoglobulínov, v podstate intaktné molekuly imunoglobulínov a časti molekúl imunoglobulínov zahŕňajúce paratop, vrátane častí označovaných Fab, Fab', $F(ab')^2$ a F(v), čo sú dôležité časti molekuly protilátky z hľadiska terapeutických postupov predkladaného vynálezu.

Fab a $F(ab')_2$ časti molekúl protilátok možno pripraviť proteolýzou papaínom alebo pepsínom vykonanou na v podstate intaktných molekulách protilátok, známymi postupmi. Pozri napr. U. S. Patent č. 4 342 566, Theofilopolous *et. al.* Fab' časti molekuly protilátky sú tiež známe a možno ich pripraviť z častí $F(ab')_2$ redukciou disulfidických väzieb spájajúcich dva ťažké reťazce napr. merkaptoetanolom a alkyláciou vzniknutého proteín merkaptánu napr. jódacetamidom. Na predkladané účely sú výhodné intaktné molekuly protilátok.

„Monoklonálna protilátka" je protilátka, ktorá má len jeden typ väzbových miest schopných imunitne reagovať s určitým antigénom. Monoklonálna protilátka typicky vykazuje jednotnú väzbovú afinitu ku všetkým antigénom, s ktorými imunitne reaguje. Monoklonálna protilátka môže byť tvorená molekulou protilátky, ktorá má veľa väzbových miest, každé imunošpecifické k inému antigénu; napr. bišpecifická (chimérna) monoklonálna protilátka.

Výraz „adjuvans" sa vzťahuje na zlúčeninu alebo zmes, ktorá zvyšuje imunitnú odpoveď na antigén. Adjuvans môže slúžiť ako tkanivový depot pomaly uvoľňujúci antigén a tiež ako aktivátor lymfatického systému, ktorý nešpecificky posilňuje imunitnú odpoveď [Hood *et. al., Imunology,* 384, 2. vyd., Benjamin/Cummings, Menlo Park, California (1984)]. Primárny účinok samotného antigénu bez prítomnosti adjuvans často nestačí na vyvolanie humorálnej alebo bunkovej imunitnej odpovede. Adjuvans zahŕňajú, nie výhradne, kompletné Freudovo adjuvans, nekompletné Freudovo adjuvans, saponín, minerálne gély, ako je hydroxid hlinitý, povrchovo aktívne látky, ako je lyzolecitín, plurónové polyoly, polyanionty, peptidy, olejové alebo uhľovodíkové emulzie, keyhole limpet hemocyanín, dinitrofenol a potenciálne využiteľné humánne adjuvans ako BCG *(bacille Calmette-Guerin)* a *Corynebacterium parvum.* Adjuvans je výhodne farmaceuticky prijateľné.

V oblasti techniky existuje mnoho spôsobov príprav polyklonálnych protilátok k OB polypeptidu, jeho fragmentu, derivátu alebo analógu. Tvorbu protilátok možno vyvolať imunizáciou rôznych živočíšnych hostiteľov injekciou OB polypeptidu alebo jeho derivátu (napr. fragmentu alebo fúzneho proteínu). Vhodnými hostiteľmi sú, nie výhradne, králiky, myši, krysy, ovce, kozy atď. Podľa uskutočnenia vynálezu možno OB polypeptid alebo jeho fragment konjugovať s imunogénnym nosičom, napr. bovinným sérum albumínom (BSA) alebo keyhole limpet hemocyanínom (KLH). Podľa druhu hostiteľa možno na zvýšenie imunitnej odpovede použiť rôzne adjuvans, napr. (nie výhradne) kompletné aj nekompletné Freudovo adjuvans, minerálne gély, ako je hydroxid hlinitý, povrchovo aktívne látky, ako je lyzolecitín, plurónové pololy, polyanionty, peptidy, olejové emulzie, keyhole limpet hemocyaníny, dinitrofenol a potenciálne využiteľné humánne adjuvans ako BCG *(bacille Calmette-Guerin)* a *Corynebacterium parvum.*

Pri príprave monoklonálnych protilátok proti OB polypeptidu, jeho fragmentu, analógu alebo derivátu, možno použiť ľubovoľný spôsob využívajúci produkciu molekúl protilátok v kultúrach kontinuálnych bunkových línií. Vhodné postupy zahŕňajú, nie výhradne, hybridómový postup pôvodne vyvinutý Kohlerom *et. al. , Nature,* 256: 495 - 497 (1975), triómový postup, hybridómový postup na ľudských B-bunkách [Kozbor *et. al., Immunology Today,* 4: 72 (1983)] a EBV-hybridómový postup produkujúci ľudské monoklonálne protilátky [Cole *et. al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,* 77 - 96, Alan R. Liss, Inc., (1985)]. Nesmrteľné bunkové línie produkujúce protilátky možno vytvoriť aj inými postupmi než fúziou, napríklad priamou transformáciou B lymfocytov onkogénnej DNA alebo transfekciou vírusom Epstein-Barrovej. pozri napr. Schreier M.,et. *al.,* „*Hybridoma Techniques*" (1980); Hammerling et. *al.,* „*Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas*" (1981); Kennett *et. al.,* „*Monoclonal Antibodies*", (1980); pozri tiež U. S. Patent č. 4 341 761, 4 399 121, 4 427 783, 4 444 887, 4 451 570, 4 466 917, 4 472 500, 4 491 632 a 4 493 890.

V konrétnom uskutočnení predkladaného vynálezu boli monoklonálne protilátky produkované na bezmikróbnych zvieratách nedávno vypracovaným postupom (PCT/US90/02545). Podľa vynálezu možno použiť ľudské protilátky a získať ich na ľudských hybridómoch [Cote *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 80: 2026 - 2030 (1983)] alebo transformáciou ľudských B-buniek EBV vírusom [Cole *et. al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,* 77 - 96, Alan R. LIss, Inc., (1985)]. podľa citovaného vynálezu možno využiť postupy vyvinuté na produkciu „chimérnych protilátok" [Morrison *et. al., J. Bacteriol.,* 159 - 870 (1984); Takeda *et. al., Nature,* 314: 452 - 454 (1985)]. Tieto postupy vychádzajú z génov pre molekuly myších protilátok špecifických k OB polypeptidu a z génov pre molekuly ľudských protilátok príslušnej biologickej aktivity, upravených zostrihom; takéto protilátky patria taktiež do rámca predkladaného vynálezu. Ľudské alebo humanizované chimérne protilátky sú výhodnejšie na terapiu ľudských chôrob alebo porúch (opísané skôr), pretože ľudské alebo humanizované protilátky budú samy osebe menej pravdepodobne vyvolávať imunitnú odpoveď, najmä alergickú v porovnaní s cudzorodými protilátkami.

Predkladaný vynález ďalej využíva adaptovaný postup na prípravu jednoreťazcových protilátok (U. S. Patent 4 946 778) na prípravu jednoreťazcových protilátok špecifických k OB polypeptidu. Konkrétne uskutočnenie vynálezu využíva opísaný postup na konštrukciu Fab expresnej knižnice (Huse *et. al., Science,* 246: 1275 - 1281 (1989)], ktorá umožňuje rýchle a ľahké vyhľadanie monoklonálnych Fab fragmentov s požadovanou špecifitou k OB polypeptidu, jeho derivátom alebo analógom.

Fragmenty protilátok, ktoré obsahujú idiotyp molekuly protilátky možno pripravovať známymi postupmi. Takýmito fragmentárni sú, napr. fragment $F(ab')_2$, ktorý vzniká pepsínovým štiepením molekuly protilátky; Fab' fragmenty pripravené redukciou disulfidických mostíkov fragmentu $F(ab')_2$ a fragmenty Fab vznikajúce papaínovým štiepením molekuly protilátky a následnou redukciou.

Na výrobu protilátok sa vyhľadávanie žiadanej protilátky vykonáva známymi postupmi oblasti techniky, napr. rádioimunoesejou, postupom ELISA (imunosorbentný test s naviazaným enzýmom), „sendvičovou" imunoesejou, imunorádiometrickými testami, gélovou difúznou precipitačnou reakciou, imunodifúznymi testami, imunoesejou *in situ* (napr.: s koloidným zlatom, enzýmovým alebo rádioizotopovým značením), westernovým blotovaním, precipitačnou reakciou, aglutinačným testom (napr. gélový aglutinačný test, hemaglutinačný test), komplementačným testom, imunofluorescentným testom, testom s proteínom A, imunoelektroforetickým testom atď. Podľa uskutočnenia vynálezu možno väzbu protilátky stanoviť na základe detekcie označenej primárnej protilátky. Podľa iného uskutočnenia možno primárnu protilátku stanoviť na základe de-

tekcie väzby sekundárnej protilátky alebo reagencie k primárnej protilátke. Podľa ďalšieho uskutočnenia možno sekundárnu protilátku označiť. Oblasť techniky poskytuje mnoho prostriedkov detekcie väzby pre imunoesej, ktoré vyhovujú predkladanému vynálezu. Napríklad pri selekcii protilátok, ktoré rozpoznávajú špecifický epitop OB polypeptidu, možno testovať generované hybridómy podľa produktu, ktorý viaže fragment OB polypeptidu nesúci tento epitop. Selekciu protilátok špecifických k OB polypeptidu z určitého živočíšneho druhu možno vykonať na základe pozitívnej väzby s OB polypeptidom exprimovaným alebo izolovaným z buniek tohto živočíšneho druhu.

Uvedené protilátky možno použiť na lokalizáciu a stanovenie aktivity OB polypeptidu známymi postupmi oblasti techniky, ako je napr. westernové blotovanie, stanovenie OB polypeptidu *in situ,* stanovenie hladiny OB polypeptidu vo fyziologických vzorkách atď.

V konkrétnom uskutočnení vynálezu boli generované protilátky agonizujúce alebo antagonizujúce aktivitu OB polypeptidu. Tento typ protilátok možno testovať uvedenými postupmi na základe identifikácie ligandov.

V konkrétnom uskutočnení vynálezu boli vyvinuté protilátky produkované na králikoch, ktoré boli imunizované syntetickými peptidmi s vopred stanovenou aminokyselinovou sekvenciou alebo rekombinantnými proteínmi pripravenými s využitím bakteriálnych expresných vektorov. Výber syntetických peptidov bol vykonaný na základe podrobnej analýzy predpovedanej štruktúry proteínu. Konkrétne boli vybrané peptidové sekvencie medzi predpokladanými štiepnymi miestami. Syntetické peptidy boli konjugované k nosiču, napr. KLH hemocyanín alebo BSA, reakciou s karbodiimidom a boli použité vo Freudovom adjuvans na imunizáciu králikov. Rekombinantný proteín bol pripravený s využitím vektoru pGEX [Smith *et. al. , Gene* 67: 31 - - 40 (1988)]. Alternatívne možno generovať fúzny proteín s použitím hydrofilných domén. Proteín bol exprimovaný v potrebnom množstve na imunizáciu vo Freudovom adjuvans.

V inom konkrétnom uskutočnení vynálezu bol použitý OB polypeptid na imunizáciu kuriat a z vaječného žĺtka boli izolované kuracie anti-OB protilátky, napr. afinitnou purifikáciou na OB-kolóne. Kurčatá určené na imunizáciu boli výhodne udržované v špecifických podmienkach bez patogénov (SPF).

V inom konkrétnom uskutočnení vynálezu bola tvorba protilátok proti leptínu vyvolaná u *OB/OB* myší, u ktorých sa dala očakávať anti-OB odpoveď, pretože OB polypeptid vzhľadom na jeho neprítomnosť v obehu netolerujú; tvorba protilátok bola vyvolaná taktiež u myšacieho divokého typu. Slezinné bunky od obidvoch skupín boli fúzované s myelomovými bunkami za vzniku hybridómov pre monoklonálne protilátky.

V inom konkrétnom uskutočnení vynálezu bol použitý rekombinantný polypeptid na imunizáciu králikov a polyklonálne protilátky boli pred ďalším použitím imunopurifikované. Purifikované protilátky sú vhodné najmä pre semi-kvantitatívne testy, zvlášť na stanovenie cirkulujúceho OB polypeptidu v plazme alebo sére.

Prehľadanie súboru monoklonálnych protilátok vyprodukovaných proti modulátorovým peptidom možno uskutočniť na základe rôznych vlastností, ako sú izotyp, epitop, afinita atď. Obzvlášť významné sú monoklonálne protilátky neutralizujúce aktivitu modulátorových peptidov. Tieto monoklonálne protilátky možno ľahko identifikovať postupom testujúcim aktivitu modulátoru hmotnosti. Taktiež vhodné sú protilátky s vysokou afinitou, pokiaľ možno uskutočniť imunoafinitnú purifikáciu prirodzeného alebo rekombinantného modulátoru.

Ako anti-modulátorové protilátky na diagnostické a terapeutické účely predkladaného vynálezu sa výhodne používajú afinitne purifikované polyklonálne protilátky, výhodnejšie monoklonálne protilátky (mAb). Ďalej je na predkladané účely výhodné, pokiaľ sú molekuly anti-modulátorových protilátok tvorené časťami celých molekúl protilátok, síce časťami Fab, Fab', $F(ab')_2$ alebo F(v).

Diagnostické využitie

Predkladaný vynález sa ďalej týka mnohých diagnostických aplikácií vrátane postupov na detekciu podmienok a/alebo stimulov, ktoré vyvolávajú abnormálnu telesnú hmotnosť alebo adipozitu, s ohľadom na ich pôsobenie sprostredkovávané prítomnými modulátormi hmotnosti. Ako už bolo uvedené, existuje mnoho postupov využívajúcich peptidové modulátory hmotnosti na generáciu protilátok, ktoré možno potom izolovať a použiť napr. pri zisťovaní konkrétnej transkripčnej aktivity pri suspektných cieľových bunkách. Alternatívne možno predkladané nukleové kyseliny použiť diagnosticky.

Diagnostika založená na protilátkach

Diagnostické postupy predkladaného vynálezu využívajú pri testovaní bunkových vzoriek alebo vzoriek média efektívne množstvo antagonistov modulátorového proteínu, ako je napr. anti-modulátorová protilátka, výhodne afinitne purifikovaná polyklonálna protilátka, výhodnejšie mAb. Ďalej je pre predkladané účely výhodné, pokiaľ sú molekuly anti-modulátorových protilátok tvorené časťami celých molekúl protilátok, síce časťami Fab, Fab', $F(ab')_2$ alebo F(v). Ako už bolo uvedené, predkladané postupy pomáhajú pacientom trpiacim rakovinou, AIDS, obezitou alebo inými stavmi, pre ktoré je charakteristická abnormálna telesná hmotnosť. Z oblasti techniky sú známe postupy na izoláciu modulátorov hmotnosti a na indukciu anti-modulá-

torových protilátok, taktiež postupy na stanovenie anti-modulátorových protilátok a na optimalizáciu využitia anti-modulátorových protilátok pri vyšetrovaní cieľových buniek.

Diagnostické využitie majú ďalej polyklonálne a monoklonálne protilátky, liečivá regulujúce produkciu alebo aktivitu modulátorov hmotnosti a iné rekogničné faktory a/alebo ich podjednotky. Tieto látky možno napr. využiť pri detekcii a/alebo kvantifikácii podmienok rozvinutej abnormálnej telesnej hmotnosti, či rizikových podmienok pre jej rozvoj. Napríklad možno použiť modulátorové peptidy alebo ich aktívne fragmenty na vyvolávanie produkcie polyklonálnych a monoklonálnych protilátok v mnohých bukových médiách s využitím známych postupov, ako je napríklad hybridómový postup pracujúci napr. s myšími slezinnými lymfocytmi fúzovanými s myelómovými bunkami. Tieto postupy sú podrobnejšie opísané ďalej. Podobne možno nájsť alebo syntetizovať malé molekuly napodobňujúce alebo antagonižujúce aktivitu receptorových rekogničných faktorov predkladaného vynálezu a použiť ich v diagnostických a/alebo terapeutických postupoch.

Prítomnosť modulátorov hmotnosti možno potvrdiť zvyčajnými imunologickými postupmi. Existuje mnoho vhodných postupov. Tri obzvlášť vhodné postupy využívajú buď receptorový rekogničný faktor detegovateľne označený, detegovateľne označenú protilátku Ab_1 alebo detegovateľne označenú protilátku Ab_2. Tieto postupy možno zhrnúť do nasledujúcich rovníc, kde hviezdička znamená detegovateľné označenie a „WM" je modulátor hmotnosti:

A. $WM^* + Ab_1 = WM^*Ab_1$

B. $WM + Ab_1^* = WMAb_1^*$

C. $WM\ \%\ Ab_1 + Ab_2^* = Ab_1WMAb_2^*$

Spomínané postupy a aplikácie sú v oblasti techniky známe a použiteľné v rámci predkladaného vynálezu. „Kompetetívny" postup, postup A, je opísaný v U. S. patentoch č. 3 654 090 a 3 850 752. Postup B predstavuje dobre známe kompetetívne testy. Postup C, „sendvičový", je opísaný v U. S. patentoch č. RE 31,006 a 4 016 043. Iné vhodné postupy sú „double antibody (dvojitá protilátka)" alebo „DASP".

Vo všetkých prípadoch vytvára modulátor hmotnosti komplex s jednou alebo niekoľkými protilátkami či väzobnými partnermi, pričom jedna zložka komplexu je detegovateľne označená. Vytvorenie komplexu a prípadne jeho množstvo možno stanoviť známymi postupmi na základe detekcie označení.

Z uvedeného vyplýva, že charakteristickým rysom Ab_2 je jeho reaktivita s Ab_1. Príčinou tejto reaktivity je postup, pri ktorom Ab_1 vypestované na jednom druhu cicavcov boli použité ako antigény na vyvolanie produkcie Ab_2 u iného druhu. Napríklad produkcia Ab_2 bola vyvolaná u kôz s využitím králičích protilátok ako antigénov. Ab_2 sú teda proti-králičie protilátky vypestované na kozách. Na účely opisu a nárokov predkladaného vynálezu sú Ab_1 označované ako primárne protilátky alebo protilátky proti modulátoru hmotnosti a Ab_2 sú označované ako sekundárne alebo anti-Ab_1 protilátky.

Najčastejšie volené označenie je rádioaktívne, enzýmové, UV-fluorescentnými chemikáliami a pod.

Je známych veľa fluorescentných látok, vhodných na označenie. Sú to napríklad zlúčeniny fluorescín, rhodamín a auramín. Konkrétne anti-králičie protilátky produkované na kozách boli konjugované cez izotiokyanát s fluorescínom.

Pre modulátory hmotnosti alebo ich väzbových partnerov možno ďalej voliť rádioaktívne alebo enzýmové označenie. Rádioaktívne označenie je detegovateľné bežným scintilačným postupom. Výhodné označenie možno voliť z izotopov ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I a ^{188}Re.

Enzýmové označenie je taktiež vhodné a detegovateľné zvyčajnými postupmi: kolorimetricky, spektrofotometricky, fluórospektrofotometricky, ampérometricky alebo gazometricky. Enzým možno ku zvolenej zložke konjugovať pomocou „mostíkovej" zlúčeniny, ako je karbodiimid, diizokyanát, glutaraldehyd a pod. Na tento postup existuje mnoho použiteľných enzýmov, vhodné sú napr. peroxidáza, β-glukuronidáza, β-D-glukozidáza, β-D-galaktozidáza, ureáza, glukózová oxidáza s peroxidázou a alkalická fosfatáza.

Alternatívne označenia a postupy sú uvedené v U. S. Patentoch č. 3 654 090; 3 850 752 a 4 016 043.

V konkrétnom uskutočnení vynálezu boli pripravené testovacie súpravy na lekárske účely, určené na potvrdenie alebo vylúčenie predpokladanej transkripčnej aktivity alebo predpokladanej kapacity transkripčnej aktivity vo vyšetrovaných cieľových bunkách. Podľa uvedených testovacích postupov obsahuje súprava minimálne označený modulátor hmotnosti alebo inú zložku komplexu, napr. protilátku špecifickú k modulátoru hmotnosti, a návod na použitie podľa zvoleného testovacieho postupu, napr. „kompetetívny", „sendvič", „DASP", a pod. Súpravy môžu ďalej obsahovať okrajové reagencie, ako sú pufre, stabilizátory atď.

Testovacie súpravy na potvrdenie alebo vylúčenie predpokladanej transkripčnej aktivity alebo predpokladanej kapacity transkripčnej aktivity buniek obsahujú:

(a) vopred stanovené množstvo aspoň jednej imunochemicky reaktívnej zložky pripravenej priamym alebo nepriamym detegovateľným označením modulátoru hmotnosti alebo jeho väzbovej zložky;

(b) ďalšie reagencie; a

(c) návod na použitie súpravy.

Diagnostická testovacia súporava konkrétne obsahuje:

(a) modulátor hmotnosti (alebo jeho väzbový partner) v známom množstve, ako je uvedené, naviazaný na pevný nosič za vzniku imunosorbentu, alebo alternatívne naviazaný na vhodný koncový produkt alebo na niekoľko takýchto koncových produktov atď. (alebo ich väzbovým partnerom) z každého jeden;
(b) prípadne iné reagencie; a
(c) návod na použitie súpravy.

Ďalšou možnosťou je testovacia súprava, ako je uvedené, ktorá pracuje podľa vopred stanoveného postupu (napr. „kompetetívny", „sendvičový", „double antibody", atď.), a ktorá obsahuje:
(a) označenú zložku získanú naviazaním modulátoru hmotnosti na detegovateľnú zlúčeninu;
(b) jednu alebo niekoľko ďalších imunoreagencií, z ktorých aspoň jedna je ligand alebo imobilizovaný ligand volený zo skupiny obsahujúcej:
(i) ligand, ktorý môže viazať označenú zložku (a);
(ii) ligand, ktorý môže viazať väzbového partnera označenej zložky (a);
(iii) ligand, ktorý môže viazať aspoň jednu stanovovanú zložku; a
(iv) ligand, ktorý môže viazať aspoň jedného väzbového partnera stanovovanej zložky; a
(c) návod na detekciu a/alebo stanovenie jednej alebo niekoľkých zložiek imunochemickej reakcie medzi modulátorom hmotnosti a príslušným špecifickým väzbovým partnerom.

Diagnostika založená na nukleových kyselinách

Ako vyplýva z uvedeného, možno predkladané nukleové kyseliny použiť na detekciu porúch súvisiacich s OB polypeptidom, ktoré vedú k obéznym fenotypom. Napríklad próby nukleových kyselín možno použiť (napr. pri northernovej analýze alebo analýze RT-PCR) na stanovenie súvislosti obézneho fenotypu s nedostatočnou expresiou *OB* mRNA alebo s expresiou nefunkčnej *OB* mRNA, napr. ako u myší *DB/DB* (kde príčinou poruchy je chýbajúci OB receptor), alebo na zistenie, že mutácia neprepisuje mRNA. Navyše diagnostické postupy založené na nukleových kyselinách predkladaného vynálezu spolu s postupmi vychádzajúcimi z protilátok môžu napomôcť ďalšiemu porozumeniu problematiky obézneho a anorektického fenotypu na molekulárnej úrovni.

Ako je tu uvedené, boli stanovené sekvencie nedávno izolovaných klonov ľudskej cDNA. To uľahčuje určenie kompletnej sekvencie ľudského génu (pozri SEQ ID č. 22, obr. 20 (A až C)). Ďalej boli získané sekvencie DNA intrónov ľudského *OB* génu (obr. 20) a boli použité na prípravu PCR primárov na PCR amplifikáciu kódujúcej sekvencie *OB* génu z ľudskej genómovej DNA a na identifikáciu mutáciou alebo alelických variant *OB* génu. Postupy už boli podrobnejšie uvedené skôr. Konkrétne primáry PCR na amplifikáciu ľudskej genómovej *OB* DNA sú uvedené v príkladoch.

Podľa súčasnej hypotézy súvisí heterozygótna mutácia *OB* génu s miernou/strednou obezitou, zatiaľ čo homozygótna mutácia súvisí podľa niekoľkých diagnostických testov založených na sekvencii DNA s obezitou. Ak je to naozaj tak, umožní uvedený postup diagnostikovať pacientov s rizikom rozvoja obezity a včas zaviesť liekovú liečbu a/alebo zmenu životného štýlu, skôr než sa plne rozvinie nárast telesnej hmotnosti.

Alternatívne možno na diagnostiku využiť mikrosatelity segregujúce s mutantnými formami ľudského *OB*. Sú to napríklad rôzne PCR priméry vrátane sekvencií uvedených na obr. 20 (A až C).

OB gén možno tiež využiť na stanovenie kódovanej RNA a proteínu pri diagnostike nutričných porúch. Dôležité je zistiť, či je pri určitej nutričnej poruche produkcia *OB* RNA a/alebo kódovaného proteínu neregulovaná alebo znížená. Pokiaľ je u obéznej osoby zvýšená hladina OB, je naďalej problém, ale ak je hladina znížená, môže byť toto príčinou obezity (*OB* gén môže aj nemusí byť defektný). Naproti tomu, ak má pacient s rakovinou alebo AIDS, u ktorého došlo k úbytku hmotnosti, zvýšené hladiny OB, možno vyvodiť, že príčinou úbytku hmotnosti je nevhodne vysoká hladina expresie OB.

Pri stanovení hladín ľudskej *OB* RNA možno použiť klonovanú ľudskú cDNA. Navyše možno pripraviť rekombinantný ľudský proteín v tuku a plazme.

Terapeutické využitie

Polypeptidy, nukleové kyseliny a protilátky predkladaného vynálezu majú významné terapeutické využitie. Výhodne sa podáva terapeuticky účinné množstvo účinnej látky vo farmaceuticky prijateľnom nosiči, riedidle či excipiente.

Pojem „farmaceuticky prijateľný" označuje látky a zlúčeniny, ktoré sú fyziologicky tolerované a nevyvolávajú pri podaní pacientovi alergické alebo podobne nevhodné reakcie, ako je nevoľnosť alebo závrat a pod. Pojem „farmaceuticky prijateľný" výhodne znamená schválený regulačným federálnym alebo štátnym úradom alebo zahrnutý v zozname *U. S. Pharmacopeia* či inom všeobecne uznávanom liekopise pre zvieratá a najmä pre ľudí. Výraz „nosič" zahŕňa riedidlo, adjuvans, excipient alebo prísadu, v ktorých je účinná zlúčenina podávaná. Farmaceutickými nosičmi sú sterilné kvapaliny, ako je voda a oleje,, vrátane olejov ropného, živočíšneho, rastlinného či syntetického pôvodu, napr. arašidový olej, sójový olej, minerálny olej, sezamový olej a pod. Výhodnými nosičmi, najmä na injekčné použitie sú voda, roztoky, soľné roztoky, vodná dextróza

a glycerolové roztoky. Vhodné farmaceutické nosiče sú opísané v Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 18. vyd., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

Výraz „terapeuticky účinné množstvo" je tu používaný v zmysle dostatočného množstva, ktoré zníži najmenej o 15 %, výhodne o 50 %, výhodnejšie o 90 % a najvýhodnejšie celkom predíde klinicky významnej nedostatočnosti v aktivite, funkcii a reaktivite pacienta. Alternatívne terapeuticky účinné množstvo je také množstvo, ktoré postačuje na zlepšenie klinicky významného stavu pacienta.

Podávanie rekombinantného polypeptidu vedie k úbytku hmotnosti, najmä k úbytku tukových tkanív. OB polypeptid sa pripravuje pomocou štandardných bakteriálnych a/alebo cicavčích expresných vektorov, syntetický alebo purifikáciou z plazmy alebo séra, ako už bolo uvedené skôr. Alternatívne možno indukovať vyššiu expresiu prirodzeného OB polypeptidu homológovými rekombinantnými postupmi, ako už bolo taktiež uvedené.

Zníženie aktivity OB polypeptidu (pôsobením antagonistov, inhibítorov, neutralizujúcich protilátok alebo anti-sense molekúl) by malo viesť k prírastku hmotnosti, ako je vhodné napríklad pri liečbe úbytku hmotnosti pri rakovine, AIDS alebo mentálnej anorexii. Moduláciu aktivity OB možno využiť tak na zníženie telesnej hmotnosti (zvýšením aktivity), ako aj na zvýšenie telesnej hmotnosti (znížením aktivity).

Terapia využívajúca polypeptidy

Zjednodušene možno tvrdiť, že *OB* gén určuje telesnú hmotnosť cicavcov, konkrétne myší a ľudí. Produkty *OB* génu a príbuzné molekuly sú súčasťou signálnej komunikačnej cesty medzi adipóznym tkanivom, mozgom a ďalšími orgánmi. Možno predpokladať, že OB Polypeptid je sám osebe signálnou molekulou, t. j. hormónom.

OB polypeptid, jeho funkčné fragmenty alebo antagonisty môžu byť podávané perorálne alebo parenterálne, výhodne parenterálne. Pretože metabolická homeostáza prebieha kontinuálne, je výhodné podávať OB polypeptid vo forme liečiva s riadeným uvoľňovaním. Polypeptid možno napríklad podávať intravenóznou infúziou, pomocou implantovanej osmotickej pumpy, transdermálnou náplasťou, v lipozómoch a pod. V konkrétnom uskutočnení vynálezu bola použitá pumpa [*Langer et. al.,* vyd., *Medical Applications of Controlled Release,* CRC Press., Boca Raton, Florida (1974); Sefton, *CRC Crit. Biomed. Eng.,* 14: 201 (1987); Buchwald *et. al ., Surgery,* 88: 507 (1980); Saudek *et. al., N. Engl. J. Med.,* 321: 574 (1989)]. V inom uskutočnení vynálezu boli zvolené polymérne materiály [*Langer et. al.,* vyd., *Medical Applications of Controlled Release,* CRC Press., Boca Raton, Florida (1974); Sefton, *CRC Crit. Biomed. Eng.,* 14: 201 (1987); Smolen *et. al.,* vyd., *Controlled Drug Bioavaillability, Drug Product Design and Performance,* Wiley, New York (1984); Ranger *et. al., J. Macromol. Sci. Rec. Macromol. Chem.,* 23: 61 (1983); Levy *et. al.. Science,* 228: 190 (1985); During *et. al., Ann. Neurol.,* 25: 351 (1989); Howard et. *al., J. Neurosurg.,* 71: 105 (1989)]. V inom uskutočnení bol systém s riadeným uvoľňovaním umiestnený do blízkosti terapeutického cieľa, napr. v prípade mozgu je dostačujúci len zlomok systémovej dávky [Goodson, *Medical Applications of Controlled Release,* diel 2, str. 115 - 138 (1984)]. Ďalšie systémy s riadeným uvoľňovaním liečiva sú diskutované v prehľadnom článku [Langer, *Science* 249: 1527 - 1533 (1990)]. Podľa iného uskutočnenia bola terapeuticky účinná látka podávaná vo vezikule, konkrétne v lipozóme [Langer, *Science* 249: 1527 - 1533 (1990); Treat et. *al., Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,* Lopez-Berestein a Fidler vyd., Liss, New York, (1989)].

Podľa iného prístupu boli pacientovi s nedostatkom OB polypeptidu transplantované rekombinantné bunky transformované *OB* génom s vysokou hladinou expresie OB polypeptidu. Kvôli zabráneniu rejekcii je výhodné transplantovať autológne bunky transformované *OB* génom; alebo alternatívne vypracovať postup ochrany, pri ktorom neautológne bunky produkujú rozpustné faktory vnútri polymérnej matrice, ktorá ich ochraňuje pred rozpoznaním imunitným aparátom a rejekciou.

Ob polypeptid možno podávať intravenózne, intraarteriálne, intraperitoneálne, intramuskulárne alebo subkutánne. Alternatívne možno OB polypeptid vo vhodnom prípravku podávať nazálne či perorálne. Konštantné dodávanie OB polypeptidu možno zaistiť poskytovaním terapeuticky účinnej dávky (t. j. dávky, ktorá účinne indukuje metabolické zmeny u pacienta) v nutných intervaloch, napr. denne, po 12 hodinách atď. Podmienky podávania záležia na vážnosti stavu liečenej choroby a iných okolnostiach, napr. predpísanej diéte, hmotnosti, veku, pohlaví a pod., ako stanoví ošetrujúci lekár podľa štandardnej lekárskej praxe.

Farmaceutické prípravky

Predkladaný vynález sa ďalej týka farmaceutických prípravkov, ktoré obsahujú uvedené účinné zlúčeniny. Farmaceutické prípravky sú určené na injekčné, perorálne, pulmonálne, nazálne a iné formy podávania. Vynález zahŕňa prípravky obsahujúce účinné množstvo proteínových produktov predkladaného vynálezu alebo ich derivátov a farmaceuticky prijateľné riedidlá, konzervačné činidlá, solubilizátory, emulzifikátory, adjuvans a/alebo nosiče. Prípravky obsahujú riedidlá s rôznymi puframi (napr. Tween 80, Polysorbate 80), anti-oxidanty (napr. kys. askorbová, metabisulfid sodný), konzervačné činidlá (napr. Thimerzol, benzylalkohol) a plnidlá (napr. laktóza, manit). Zložky prípravkov možno inkorporovať vo forme častíc do polymérnych

zlúčenín, ako sú polymérna kys. mliečna, polyglykolová atď. alebo do lipozómov. Taktiež možno použiť kys. hylaurónovú. Pri takýchto prípravkoch možno ovplyvňovať fyzikálne vlastnosti a stabilitu, riadiť rýchlosť uvoľňovania liečiva alebo odstraňovanie nadbytočných proteínov a derivátov *in vivo*.

Pozri Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 18. vyd., Mack Publishing Co., Easton, PA, 18042 (1990) str. 1435 - 1712. Prípravky môžu mať formu kvapalín alebo práškov napr. lyofilizátov.

Perorálne podávanie

Perorálne pevné dávkové formy vhodné na predkladané účely sú všeobecne opísané v kap. 89, Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 18. vyd., Mack Publishing Co., Easton, PA, 18042 (1990). Pevné liekové formy sú tablety, kapsuly, dražé, trošé, pastilky, tobolky alebo peletky. Predkladané prípravky možno taktiež enkapsulovať do proteínov (ako sú napr. protenoidné mikrosféry opísané v U. S. Patente č. 4 925 673). Taktiež možno použiť lipozomálnu enkapsuláciu, prípadne lipozómy derivatizovať rôznymi polymérmi (napr. U. S. Patent č. 5 013 556). Vhodné pevné liekové formy sú opísané v Marshall, *Modern Pharmaceutics,* kap. 10, Banker a Rhodes (ed.), (1979). Prípravky zvyčajne obsahujú proteín (alebo chemicky modifikovaný proteín) a inertné prísady, ktoré ochraňujú biologicky účinné látky pred žalúdočným prostredím a uvoľňujú ich v čreve.

Špecifický význam majú perorálne liekové formy derivatizovaných proteínov. Proteín možno chemicky modifikovať s ohľadom na účinnosť pri perorálnom podávaní. Chemickou modifikáciou sa zvyčajne rozumie naviazanie najmenej jednej chemickej skupiny na molekulu proteínu (alebo peptidu), pričom táto chemická skupina (a) inhibuje proteolýzu a (b) umožňuje prechod liečiva zo žalúdka alebo čreva do krvi. Žiaducou vlastnosťou je taktiež zvýšená stabilita proteínu a predĺžený čas zotrvania v telesnom obehu. Príkladom vhodných skupín sú: polyetylénglykol, kopolyméry etylénglykolu s propylénglykolom, karboxymetylcelulóza, dextrán, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidón a polyprolín [Abuchowski et. *al.,* „Soluble Polymer-Enzyme Adducts" v *Enzymes as Drugs,* str. 367 - 383, Holcenberg, Roberts vyd., Wiley-Interscience, New York, NY, (1981); Newmark et. *al., J. Appl. Biochem.,* 4: 185 - 189 (1982)]. Iné použiteľné polyméry sú napr. poly-1,3-dioxolán a poly-1,3,6-trioxocán. Na farmaceutické účely sú výhodné chemické skupiny na báze polyetylénglykolu.

Proteín (alebo jeho derivát) môže byť uvoľňovaný v žalúdku, v tenkom čreve (duodenum, jejunum, ileum) alebo v hrubom čreve. Odborník v odbore pozná receptúry prípravkov, ktoré nie sú rozpustné v žalúdku a pritom uvoľňujú zložky v duodéne alebo kdekoľvek inde v čreve. Uvoľňované liečivo je výhodné pred ničivým žalúdočným prostredím chrániť, a to na úrovni samotného proteínu (alebo derivátu) alebo smerovaním uvoľňovania biologicky aktívnych látok mimo žalúdočných prostredí, napr. do čreva.

Úplnú ochranu pred žalúdočným prostredím zaistí poťahovanie obalom nepriepustným do pH 5,0. Bežné inertné zložky enterosolventných obalov sú napríklad celulóza acetát trimellitát (CAT), hydroxypropylmetylcelulóza ftalát (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, polyvinylftalát (PVAP), Eudragit L30D, Aqueric, celulóza acetát ftalát (CAP), Eudragit L, Eudragit S a Shellac. Tieto poťahy možno použiť ako zmesové filmy.

Poťahy alebo zmesové poťahy možno tiež aplikovať na tablety, ale v tomto prípade poťahy neplnia funkciu ochrany v žalúdočnom prostredí. Sú na cukrovej báze alebo uľahčujú prehĺtanie. Kapsuly s tvrdým obalom (napr. želatina) slúžia na práškové formy liečiva, kapsuly s mäkkým želatínovým obalom sú vhodné na kvapalné formy liečiva. Obal toboliek môže byť tvorený silnou vrstvou škrobu alebo iného požívateľného papieru. Pre dražé, pastilky, formované alebo rozdrvené tablety možno použiť postupy agregácie za vlhka.

Terapeuticky účinná látka môže byť v prípravku obsiahnutá ako jemné častice vo forme granúl alebo peletiek s veľkosťou 1 mm. Prípravok možno teda podávať ako prášok uzavretý v kapsulách, ako ľahko komprimované čapíky a ako tablety. Liekovú formu možno pripraviť komprimáciou.

Prípravok ďalej môže obsahovať farbivá a aromatické prísady. Napríklad proteín (alebo derivát) v liekovej forme (napr. v lipozóme alebo v mikrosférach) môže byť zložkou požívateľného výrobku, ako je napr. chladený nápoj obsahujúci farbivá a aromatické prísady.

Taktiež možno liečivo zriediť alebo zväčšiť jeho objem inertným materiálom. Vhodnými riedidlami sú uhľovodíky, najmä manit, α-laktóza, bezvodná laktóza, celulóza, sacharóza, modifikované dextrány a škrob. Ako plnidlá možno použiť tiež niektoré anorganické soli ako fosforečnan vápenatý, uhličitan horečnatý a chlorid sodný. Komerčne dostupné riedidlá sú Fast-Flo, Emdex, STARx 1500, Emcompress a Avicell.

Pevné liekové formy môžu obsahovať disintegrátory. Vhodnými disintegrátormi sú napríklad, nie výhradne, škrob a komerčný disintegrátor na báze škrobu Explotab. Taktiež možno použiť sodnú soľ škrobového glykolátu, Amberlit, sodnú soľ karboxymetylcelulózy, ultramylopektín, alginát sodný, želatínu, pomarančové šupky, kyslú karboxymetylcelulózu, prírodnú hubu a bentonit. Iným typom disintegrátorov sú nerozpustné katiónové ionexové živice. Ako disintegrátory a spojivá možno taktiež použiť práškové živice ako napr. agar, Karaya alebo tragant. Ako disintegrátory sú tiež vhodné kys. algínová a jej sodná soľ.

Ako spojivá spevňujúce tvar pevných tabliet možno do terapeutického prípravku začleniť prírodné materiály, ako je arabská guma, tragant, škrob a želatína. Inými vhodnými spojivami sú metylcelulóza (MC), etyl-

celulóza (EC) a karboxymetylcelulóza (CMC). Pri granulácii prípravku sa používajú alkoholické roztoky polyvinylpyrrolidínu (PVP) a hydroxypropylmetylcelulózy (HPMC).

Prípravok môže ďalej obsahovať činidlá znižujúce trenie, ktoré bránia lepivosti liekových foriem počas výroby. Prípravok možno od povrchu matrice oddeliť vrstvou maziva, ako sú, nie výhradne, kys. stearová a jej horečnaté či vápenaté soli, polytetrafluóretylén (PTFE), kvapalný parafín, rastlinné oleje a vosky. Taktiež vhodné sú rozpustné mazivá ako laurylsulfát sodný, laurylsulfát horečnatý, polyetylénglykol s rôznymi molekulovými hmotnosťami a Carbowax 4000 a 6000.

Prípravok môže ďalej obsahovať glidanty, t. j. činidlá zlepšujúce tekutosť a usporiadanie práškov pri komprimácii liekových foriem počas výroby. Vhodnými glidantmi sú škrob, talok, pyrogénny kremík a hydratovaný hlinitokremičitan.

Ako zvlhčovadlo uľahčujúce rozpustnosť prípravku vo vodnom prostredí možno použiť povrchovo aktívne látky. Sú to napr. aniónové detergenty, ako laurylsulfát sodný, dioktylsulfosukcinát sodný a dioktylsulfonát sodný; katiónové detergenty benzalkónium chlorid alebo benzetómium chlorid. Ako povrchovo aktívne látky možno ďalej použiť neiontiové detergenty, ako sú lauromacrogol 400, polyoxyl 40 stearát, polyoxyetylén hydrogénovaný kastorový olej 10, 50 a 60, glycerol monostearát, polysorbát 40, 60, 65 a 80, estery sacharózy s mastnými kyselinami, metylcelulóza a karboxymetylcelulóza. Povrchovo aktívne látky môžu byť v prípravkoch obsahujúcich proteín alebo jeho derivát použité individuálne a v zmesiach rôznych pomerov.

Prísadami, ktoré zvyšujú vstrebávanie proteínu (alebo derivátu), sú napríklad mastné kyseliny ako kyselina olejová, linolová a linolénová.

V prípade prípravku s regulovaným uvoľňovaním liečiva, je vhodné liečivo inkorporovať do inertnej matrice, ktorá ho uvoľňuje buď difúziou, alebo vylúhovaním, napr. do živice. Prípravok môže byť taktiež obsiahnutý v matrici, ktorá je pomaly degradovaná. Iný spôsob regulácie uvoľňovania liečiva je založený na Oros terapeutickom systéme (Alza Corp.), t. j. liečivo je uzavreté v semipermeabilnej membráne, ktorá dovnútra prepúšťa vodu a vďaka osmóze uvoľňuje malými otvormi molekuly liečiva. Niektoré enterosolvetné poťahy taktiež spomaľujú uvoľňovanie liečiva.

Na prípravok možno voliť aj iné poťahové materiály, napríklad cukry používané v poťahovacích panvách. Lieková forma môže ďalej mať podobu tablety potiahnutej filmom; vhodné poťahové materiály sú v tomto prípade dvoch typov. Neenterosolventné poťahy ako metylcelulóza, etylcelulóza, hydroxyetylcelulóza, metylhydroxyetylcelulóza, hydroxypropyl celulóza, hydroxypropylmetylcelulóza, sodná soľ karboxymetylcelulózy, povidón a polyetylénglykoly; druhým typom poťahov sú enterosolventné poťahy, napr. bežné estery kyseliny ftálovej.

Optimálne vlastnosti poťahu možno dosiahnuť zmesovými materiálmi. Poťahovanie filmom možno uskutočniť v poťahovacej panvici, vo fluidnom lôžku alebo kompresným postupom.

Pulmálne podávanie

Predkladané proteíny (a deriváty) možno ďalej podávať pľúcnou cestou. Proteín (alebo derivát) je inhalovaný do pľúc cicavcov a cez pľúcny epitel je dopravovaný do krvi.

Odkazy na pulmonálne podávanie liečiv: Adjei *et. al., Pharmaceutical Research,* 7(6): 565 - 569 (1990); Adjei *et. al., International Journal of Pharmaceutics,* 63: 135 - 144 (1990) (leuprolid acetát); Braquet *et. al., Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13(suppl. 5): 143 - 146 (1989) (endotelín-1); Hubbard *et. al., Annals of Internal Medicine,* 3(3): 206 - 212 (1989) (α1-antitrypsín); Smith et. *al. , J. Clin. Invest.,* 84: 1145 - - 1146 (1989) (α1-proteináza); Oswein et. *al., „Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II,* Keystone, Colorado, (marec 1990) (rekombinantný ľudský rastový hormón); Debs et. *al., J. Immunol.,* 140: 3482 - 3488 (1988) a Platz *et. al.,* U. S. Patent č. 5 284 656 (faktor stimulujúcej kolónie granulocytov). Z praktického hľadiska možno na podávanie predkladaných prípravkov uviesť najrôznejšie mechanické zariadenia na pulmonálnu aplikáciu liečiv, ako sú napríklad, nie výhradne, nebulizátory, dávkovacie inhalátory a práškové inhalátory, odborníkom v odbore známe.

Komerčne dostupné zariadenia vhodné pre predkladaný vynález sú nebulizátor Utravent, vyrábaný firmou Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; nebulizátor Acorn II, vyrábaný firmou Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; dávkovací inhalátor Ventolin, vyrábaný firmou Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; a práškový inhalátor Spinhaler, vyrábaný firmou Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Všetky uvedené zariadenia vyžadujú prípravky, ktoré umožňujú rozptyľovanie proteínu (alebo derivátu). Každý typ zariadenia vyžaduje špecifický prípravok, ktorý vedľa bežne používaných riedidiel, adjuvans a/alebo nosičov obsahuje vhodnú nosnú látku. Pri tomto spôsobe podávania možno použiť aj lipozómy, mikrokapsuly a mikrosféry, inklúzne komplexy a iné typy nosičov. Proteíny možno tiež chemicky modifikovať podľa typu prípravku alebo zvoleného zariadenia na aplikáciu.

Prípravky určené pre nebulizátory, vystrekovacie a ultrazvukové, typicky obsahujú proteín rozpustený vo vode v koncentrácii 0,1 až 25 mg biologicky aktívneho proteínu v 1 ml roztoku. Prípravok môže ďalej obsahovať pufer a jednoduchý cukor (napr. pre stabilizáciu proteínu a reguláciu osmotického tlaku). Prípravky

pre nebulizátory tiež obsahovať povrchovo aktívnu látku, ktorá znižuje alebo bráni povrchovo indukovanému zhlukovaniu proteínu pri rozprašovaní roztoku na aerosól.

Prípravky určené na dávkovacie inhalátory zvyčajne obsahujú jemný prášok proteínu (alebo derivátu) suspendovaný v nosnom prostredí pomocou povrchovo aktívnej látky. Nosné prostredie môže byť ľubovoľný bežne používaný materiál, ako sú zmesové plne chlórované a fluórované uhľovodíky, zmesové chlórované a fluórované uhľovodíky, fluórované uhľovodíky vrátane trichlórfluórmetánu, dichlórdifluórmetánu, dichlórtetrafluóretanolu, a 1,1,1,2-tetrafluóretánu a ich zmesí. Vhodné povrchovo aktívne látky sú trioleát kys. sorbovej a sójový lecitín. Vhodnou povrchovo aktívnou látkou je tiež kys. olejová.

Prípravky určené na rozptyľovanie z práškového inhalátoru obsahujú jemný prášok proteínu (alebo derivátu) a plnivo, ako je laktóza, sorbit, sacharóza alebo manit v množstve uľahčujúcom rozptyľovanie rozptyľovanie prášku z prístroja., napr. 50 % až 90 % hmotn. prípravku. Je výhodné pripraviť proteín (alebo derivát) vo forme malých častíc s priemernou veľkosťou do 10 μm, z hľadiska najefektívnešieho dosiahnutia vzdialených pľúcnych lalokov najvýhodnejšie s veľkosťou 0,5 až 5 μm.

Nazálne podávanie

Predkladané prípravky možno podávať aj nazálnou cestou. Nazálne podávanie umožňuje prechod proteínu do krvi priamo po aplikácii do nosa, bez ukladania produktu v pľúcach. Medzi prípravky určené na nazálne podávanie sú prípravky obsahujúce dextrán alebo cyklodextrán.

Spôsoby liečby, spôsoby prípravy liečiva

Predkladaný vynález sa ďalej týka liečebných postupov a spôsobov prípravy liečiv. Podávanie predkladaných derivátov môže zmierniť či upraviť niektoré zdravotné stavy pacientov, ako je uvedené ďalej.

Dávkovanie

Informácie o dávkovaní všetkých uvedených molekúl vyplývajú z pokračujúcich štúdií týkajúcich sa dávkovania v rôznych podmienkach a pre rôznych pacientov, takže skúsený lekár bude schopný stanoviť vhodné dávkovanie v súvislosti s celkovým postupom liečby, s ohľadom na vek a celkový zdravotný stav pacienta. Injekčné alebo infúzne dávky sa spravidla pohybujú v rozmedzí 0,01 μg až 10 mg biologicky účinného proteínu na 1 kg telesnej hmotnosti (hmotnosť sa vzťahuje na samotný nemodifikovaný protein). Rozvrh dávkovania je variabilný a závisí od polčasu proteínu alebo derivátu v obehu, od typu dávkovania (či ide o veľké jednorazové množstvo alebo o kontinuálnu infúziu) a od zvoleného prípravku.

Podávanie spoločne s inými zlúčeninami

Pri terapii obezity možno podávať predkladané proteíny (alebo deriváty) spolu s jedným alebo niekoľkými ďalšími farmaceutickými prípravkami určenými na liečbu klinických komplikácií obezity, ako sú prípravky na liečbu diabetes (napr. inzulín), vysokého krvného tlaku, zvýšenej hladiny cholesterolu a ďalších nepriaznivých stavov súvisiacich s obezitou. Taktiež možno spolu s predkladanými proteínmi podávať látky potláčajúce chuť do jedla, napr. amfetamíny. Podávanie môže byť simultánne (napr. podávanie zmesi predkladaného proteínu s inzulínom) alebo oddelené.

Terapia využívajúca nukleové kyseliny

Génovú terapiu obezity možno vyvolať zavedením *OB* génu do ľudských tukových buniek. Možno predpokladať, že povedie k zníženiu telesnej hmotnosti. Naopak zavedenie anti-sense konštrukcií do ľudských tukových buniek, by malo znížiť hladinu aktívneho OB polypeptidu a zvýšiť telesnú adipozitu.

V konkrétnom uskutočnení vynálezu bol gén kódujúci OB polypeptid vnesený *in vivo* do vírusového vektoru. Takéto vektory obsahujú DNA oslabených alebo defektných vírusov, ako sú napr., nie výhradne, herpes simplex vírus (HSV), papillomavírus, vírus Epstein-Barrovej (EBV), adenovírus, Adeno-asociovaný vírus (AAV), a pod. Výhodné sú defektne vírusy, ktoré celkom alebo takmer neobsahujú vírusové gény. Defektný vírus nie je po vnesení do bunky infekčný. Preto možno podávať vektory defektných vírusov špecificky do buniek vo vybraných oblastiach, bez obáv z možnej infekcie ďalších buniek. Účinok možno teda špecificky zamerať na adipózne tkanivá. Príkladom konkrétnych vektorov sú, nie výhradne, vektor z defektného herpes vírusu 1 (HSV1) (Kaplitt *et. al., Molec. Cell. Neurosci.*, 2: 320 - 330 (1991)], vektor z oslabeného adenovírusu, napr. vektor opísaný v Stratford-Perricaudet *et. al., J. Clin. Invest.*, 90: 626 - 630 (1992) a vektor z defektného adeno-asociovaného vírusu [Samulski *et. al., J. Virol.*, 61: 3096 - 3101 (1987); Samulski et. *al., J. Virol.*, 63: 3822 - 3828 (1989)].

V inom uskutočnení vynálezu bol gén zavedený do vektoru retrovírusu, napr. Anderson *et. al.*, U. S. Patent č. 5 399 346; Mann *et. al., Cell*, 33: 153 (1983); Temin *et. al.*, U. S. Patent č. 4 650 764; Temin *et. al.*, U. S. Patent č. 4 980 289; Markowitz *et. al.*, J. *Virol.*, 62: 1120 (1988); Temin *et. al.*, U. S. Patent č. 5 124 263; Medzinárodná patentová prihláška č. WO 95/07358, vyd. 16. 3. 1995, Dougherty *et. al.*; Kuo et. *al., Blood*, 82: 845 (1993).

Alternatívne možno vektory *in vivo* zavádzať lipofekciou. V posledných desiatich rokoch sa rozšírilo používanie lipozómov na enkapsuláciu a transfekciu nukleových kyselín *in vitro*. Syntetické katiónové lipidy naplánované tak, aby znižovali ťažkosti a riziká spojené s lipozomálne médiovanou transfekciou, boli použité na prípravu lipozómov pre *in vivo* transfekciu génu kódujúceho marker [Felgner *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 84: 7413 - 7417 (1987); Mackey *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 85: 8027 - 8031 (1988)]. Katiónové lipidy napomáhajú enkapsulácii nukleových kyselín s negatívnym nábojom a uľahčujú priechod negatívne nabitými bunkovými membránami [Felgner *et. al., Science,* 337: 387 - 388 (1989)]. Vnášanie exogénnych génov do určitých orgánov lipofekciou *in vivo* prináša praktické výhody. Výhodná je možnosť molekulárneho nasmerovania lipozómov do konkrétnych cieľových buniek. Je zrejmé, že nasmerovanie transfekcie do konkrétnych typov buniek je výhodné najmä v heterogénnych bunkových tkanivách, ako sú slinivka, pečeň, ľadviny a mozog. Na účely cieleného účinku možno lipidy chemicky naviazať na iné molekuly [Mackey et. *al., Proc. Natl. Sci. USA,* 85: 8027 - 8031 (1988)]. Lipidy možno chemicky naviazať na cielené peptidy, napr. hormóny alebo neurotransmitery, proteíny napr. protilátky alebo nepeptidické molekuly.

Ďalej možno vektor zavádzať *in vivo* ako nahý DNA plazmid. Nahé DNA vektory pre génovú terapiu sa do cieľových hostiteľských buniek zavádzajú známymi postupmi oblasti techniky, ako sú napr. transfekcia, elektroporácia, mikroinjekcia, transdukcia, bunková fúzia, DEAE dextrán, kalcium fosfátová precipitácia, génová puška alebo prenášač DNA vektoru [Wu et. *al., J. Biol. Chem.,* 267: 963 - 967 (1992); Wu *et. al., J. Biol. Chem.,* 263: 14621 - 14624 (1988); Hartmut *et. al.,* kanadská patentová prihláška č. 2 012 311, podaná 15. 3. 1990].

Poľnohospodárske využitie

OB gén možno taktiež izolovať z domácich zvierat a následne získať zodpovedajúci OB polypeptid. Podľa uvedeného príkladu próba odvodená od myšacieho *OB* génu hybridizuje so zodpovedajúcimi kódujúcimi sekvenciami mnohých živočíšnych druhov. Podobne ako pri humánnej terapii, možno pripraviť rekombinantné proteíny určené pre domáce zvieratá. Podávaním polypeptidu chovným zvieratám možno dosiahnuť výrobu lepšieho mäsa, napr. hovädzieho, bravčového, hydinového atď. Výhodnejšie je podávanie autológového polypeptidu, aj keď predkladaný vynález uvažuje aj podávanie neautológového polypeptidu. Vzhľadom na to, že OB polypeptid obsahuje približne 160 aminokyselinových zvyškov, nemusí byť príliš imunogénny. Podávanie neautológového polypeptidu by teda nemuselo vyvolávať imunitnú reakciu.

Alternatívne zavedenie klonovaných génov do transgénnych domácich zvierat môže pri nadmernej expresii *OB* transgénu viesť k podstatnému zníženiu telesnej hmotnosti a adipozity. Najjednoduchším prostriedkom na dosiahnutie tohoto cieľa je nasmerovanie *OB* transgénu do tukového tkaniva s využitím jeho vlastného promótora alebo iného promótora špecifického pre tukové tkanivo.

Naopak v niektorých prípadoch, ako napr. pri výrobe hovädzieho „Kobe beef" alebo tučnej pečene na prípravu paštéty, je žiaduce zvýšené množstvo telesného tuku. Toto možno dosiahnuť cieleným anti-sense *OB* transgénu do tukových tkanív alebo využitím knockoutovej génovej technológie. Alternatívne možno zvýšenie podielu tuku vyvolať podaním inhibítora alebo antagonistu OB polypeptidu. Medzi inhibítory a antagonisty patria, nie výhradne, protilátky reagujúce s polypeptidom a fragmenty polypeptidu, ktoré sa viažu na OB receptor, ale nevedú k aktivácii, t. j. antagonisty OB polypeptidu.

Kozmetické využitie

OB polypeptid má vedľa terapeutického využitia aj zvláštny význam z kozmetického hľadiska. Vďaka tomu, že OB polypeptidy predkladaného vynálezu, ich deriváty a agonistné analógy môžu modulovať rýchlosť ukladania tuku a jeho množstvo u zvierat, možno nimi vyvolať zmenšenie nevzhľadných tukových tkanív napr. tukových zásob na bruchu, bokoch, stehnách, krku a brade, ktoré nemusia nutne súvisieť so sklonom k obezite, ale poškodzujú vzhľad. Zníženie hmotnosti je čiastočne vyvolané zmenšením chuti do jedla, t. j. zmenšeným príjmom potravy, zvýšením bazálneho metabolizmu alebo obidvoma spôsobmi. Preto možno podávaním predkladaného polypeptidu, jeho derivátov alebo agonistných analógov vyvolať kozmetické zmeny v tukových tkanivových depozitoch, a to moduláciou ukladania tuku, znížením chuti do jedla alebo obidvoma spôsobmi.

Predkladané prípravky a postupy použitia môžu byť súčasťou rôznych ďalších postupov, napr. kozmetickej chirurgie ovplyvňujúcej celkový vzhľad (ako je napr. liposukcia, laserová chirurgia znižujúca telesnú hmotnosť odsávaním alebo odnímaním tukového tkaniva), telocviku (najmä beh a vzpieranie), nízkokalorickej diéty, hypnózy, biofeedback, čo sú príklady spôsobov, ktorými možno znižovať podiel tukového tkaniva a zlepšovať telesný vzhľad.

Predkladaný vynález sa teda týka spôsobov ovplyvňujúcich kozmetickú moduláciu tukových tkanív, ktoré zahŕňajú podávanie modulačného množstva OB polypeptidu alebo jeho derivátu či agonistného analógu jedincovi, ktorý si praje kozmeticky modulovať tukové tkanivá a zlepšiť svoj telesný vzhľad. Modulácia tukového tkaniva je do určitej miery ovplyvnená zníženou chuťou do jedla. Výhodná je modulácia zmenšujúca tukové tkanivá.

Podľa ďalšieho uskutočnenia sa vynález týka spôsobu vyvolania kozmetického úbytku tukového tkaniva, ktorý kombinuje postupy ovplyvňujúce zmenu telesného vzhľadu s podávaním modulačného množstva OB polypeptidu alebo jeho derivátu či agonistného analóga jedincovi, ktorý si praje kozmeticky modulovať tukové tkanivá a zlepšiť svoj telesný vzhľad.

OB receptor

Vývoj malých agonistných a antagonistných molekúl OB faktoru možno výrazne uľahčiť po izolácii príslušného receptoru. Pre izoláciu príslušného receptoru je nutné pripraviť aktívny OB polypeptid a na jeho základe prehľadať štandardným postupom expresnú knižnicu. Väzba na receptor v expresnej sa testuje podaním rekombinantného polypeptidu vyprodukovaného bakteriálnymi alebo cicavčími expresnými vektormi bunkám expresnej knižnice a sledovaním účinkov krátkodobého a kontinuálneho podávania alebo priamo detekovaním väzby OB polypeptidu na bunky.

Pretože sa v súčasnosti všeobecne predpokladá, že sa OB receptor nachádza v hypotalame a možno v pečeni, je výhodné konštruovať cDNA knižnicu štandardných expresných klonovacích vektorov najmä z týchto tkanív. Klony cDNA sa ďalej spoločne vnesú do COS buniek a medzi výslednými transformovanými bunkami sa COS bunky exprimujúce OB receptor vyhľadajú pomocou testu s aktívnym ligandom. Z vyizolovaných pozitívnych klonov možno potom získať OB receptor. Naklonovaný receptor sa ďalej využíva spolu s OB ligandom (pravdepodobne ide o hormón) na vývoj ďalších zložiek nevyhnutných na vyhľadávanie malých molekúl modulátorov OB.

Zvláštny testovací systém vhodný pre predkladaný vynález je známy ako receptorový test. V tomto teste je testovaný materiál príslušne označený a testované bunkové kolónie naočkované určitým množstvom označeného aj neoznačeného materiálu. Potom sa vykonajú väzbové štúdie určujúce rozsah naviazania označeného materiálu na bunkové receptory. Postup umožňuje stanoviť rozdiely v afinite materiálov.

Väzbové štúdie sa teda vykonávajú na určitom množstve purifikovaného modulátoru hmotnosti kombinovaného napr. s protilátkami alebo inhibítormi. Sú pripravené roztoky obsahujúce rôzne množstvá označeného aj neoznačeného nekombinovaného modulátoru hmotnosti, ďalej sú naočkované bunkové vzorky a inkubované. Výsledný bunkový jednovrstvový porast je potom opláchnutý, rozpustený a počítaný na gama počítadle počas doby postačujúcej na výslednú chybu < 5 %. Zo získaných údajov je uskutočnená Scatchardova analýza, z ktorej možno vyvodiť závery týkajúce sa aktivity materiálov. Tento uvedený príklad ilustruje spôsob uskutočnenia a použitia receptorového testu, kde väzbová schopnosť testovaného materiálu na bunky slúži ako rozlišujúci rys. Na druhej strane môže byť receptorový test veľmi užitočný pre identifikáciu špecifických receptorov pre predkladané modulátory, napr. DB receptorov.

Ďalší vhodný test uvažovaný v súvislosti s predkladaným vynálezom je známy ako „cis/trans" test. Stručne, tento test pracuje s dvoma genetickými konštrukciami, jedna je zvyčajne plazmid, ktorý po transfekcii do zvolenej bunkovej línie kontinuálne exprimuje určitý študovaný receptor a druhá konštrukcia je plazmid exprimujúci pod kontrolou komplexu receptor/ligand referenčnú látku ako je napr. luciferáza. Ak je teda napr. určitá zlúčenina hodnotená z hľadiska schopnosti ligandovej väzby na určitý receptor, je jednou konštrukciou plazmid exprimujúci vo zvolenej bunkovej línii tento receptor a druhý plazmid obsahuje promótor operatívne pripojený k luciferázovému génu, pričom do tohto promótora sa už skôr začlení prvok reagujúci na študovaný receptor. Pokiaľ je testovaná zlúčenina agonistom receptoru, bude ligand s receptorom vytvárať komplex a tento komplex väzbou na reagujúci prvok bude iniciovať transkripciu luciferázového génu. Výslednú chemiluminiscenciu možno stanoviť fotometricky a krivku dávkovej závislosti možno prirovnať ku krivkám známych ligandov. Postup tohto testu je podrobne uvedený v U. S. Patente č. 4 981 784 a v medzinárodnej publikácii PCT č. WO 88/03168.

Akonáhle je identifikovaný rekombinant exprimujúci sekvenciu génu pre OB receptor, možno analyzovať rekombinantný OB receptor. Analýzu možno uskutočniť na základe fyzikálnych alebo funkčných vlastností OB receptoru, vrátane rádioaktívneho označenia receptoru a následnej gélovej elektroforézy, imunotestu, ligandovej väzby, atď. Taktiež možno generovať protilátky k OB receptoru, ako už bolo vyššie uvedené.

Štruktúru *OB* génu možno analyzovať rôznymi postupmi z oblasti techniky. Je výhodné analyzovať štruktúru rôznych domén, najmä OB väzbového miesta. Štruktúrnu analýzu možno uskutočniť stanovením sekvenčnej podobnosti s inými známymi proteínmi, najmä hormónmi a receptormi proteínov. Stupeň podobnosti (alebo homológia) môže byť podkladom pre predpoveď štruktúry a funkcie OB receptoru alebo jeho domény. V konkrétnom uskutočnení vynálezu bolo vykonané sekvenčné porovnávanie so sekvenciami GenBanky s pomocou napr. programov FASTA a FASP [Pearson *et. al.* , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 85: 2444 - 48 (1988)].

Sekvenciu proteínu možno ďalej charakterizovať pomocou analýzy hydrofility [napr. Hopp *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 78: 3824 (1981)]. Z profilu hydrofility vyplývajú hydrofóbne a hydrofilné oblasti OB receptorového proteínu a následne extracytoplazmatické, väzbové membránové a intracytoplazmatické oblasti.

Ďalej možno uskutočniť analýzu sekundárnej štruktúry [napr. Chou *et. al., Biochem.,* 13: 222 (1974)], ktorá umožní určiť oblasti OB receptora určujúce špecifické sekundárne štruktúrne rysy.

S využitím počítačových programov dostupných v oblasti techniky možno taktiež vykonať manipuláciu, transláciu a predpoveď sekundárnej štruktúry rovnako ako predpoveď a zakreslenie otvoreného čítacieho rámca.

Predkladaný vynález poskytuje výdatný zdroj OB polypeptidu a spôsob izolácie OB receptora, a tým umožňuje kvantitatívne štruktúrne stanovenie aktívnej konformácie OB polypeptidu a OB receptora alebo ich domén. Vynález poskytuje dostatočné množstvo materiálu pre spektroskopické analýzy, ako je nukleárna magnetická rezonancia (NMR), infračervená spektroskopia (IR), Ramanova spektroskopia, ultrafialová spektroskopia (UV) a najmä cirkulárny dichroizmus (CD). NMR je veľmi účinným nástrojom štruktúrnej analýzy molekúl v roztoku, čo je prostredie veľmi blízke prirodzeným podmienkam [Marion *et. al., Biochim Biophys. Res. Comm.,* 113: 967 - 974 (1983); Bar *et. al., J. Magn. Reson.*, 65: 355 - 360 (1985); Kimura *et. al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 77: 1681 - 1685 (1980)]. Štruktúrnu analýzu možno vykonať aj inými spôsobmi, ako je napr., nie výhradne, röntgenová kryštalografia [Engstom, *Biochem. Exp. Biol.,* 11: 7 - 13 (1974)].

Výhodnejšie je študovať zmesové kryštály OB polypeptidu a OB receptora. Analýza zmesových kryštálov poskytuje podrobnú informáciu o väzbe, čo ďalej umožňuje racionálne navrhovanie ligandových agonistov a antagonistov. Ďalej možno uskutočňovať modelovanie na počítači, najmä v spojení s NMR a röntegenovou analýzou [Fletterick *et. al.,* vyd., „Computer Graphics and Molecular Modeling", v *Current Communications in Molecular Biology,* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1986)].

Identifikácia a izolácia génu kódujúceho OB receptor predkladaného vynálezu umožňuje exprimovať väčšie množstvo receptora než je množstvo izolovateľné z prírodných zdrojov alebo exprimovať receptor v indikátorových bunkách, ktoré sú špeciálne zostrojené tak, aby indikovali aktivitu exprimovaného receptora po transfekcii alebo transformácii buniek. Vedľa racionálneho navrhovania agonistov a antagonistov OB, ktoré vychádza zo štruktúry OB polypeptidu, uvažuje predkladaný vynález aj alternatívny postup, identifikáciu ligandov OB receptora na základe rôznych prehľadávacích testov oblasti techniky.

Vynález je ďalej podrobnejšie vysvetlený na nasledujúcich ilustratívnych príkladoch, ktoré v žiadnom smere nie sú jeho obmedzením.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasledujúca časť v hlavných rysoch naznačuje spôsoby identifikácie genetického materiálu uvádzaného v príkladoch. Identifikácia zahŕňa štyri postupné kroky: A) genetické mapovanie, B) fyzické mapovanie, C) výber génu na izoláciu, D) detekcia mutácií. Najprv bol izolovaný myší gén (krok D), bola potvrdená jeho totožnosť a potom bol vyhľadaný homológový ľudský gén. Obidva gény, ľudský a myší a predpokladané proteíny boli charakterizované. Tieto kroky sú podrobnejšie rozvedené ďalej.

A) Genetické mapovanie

Genetickým krížením bola segregovaná OB mutácia a bola stanovená poloha mutácie vzhľadom na RFLP (polymorfizmus dĺžok reštrikčných fragmentov) štandardnou väzbovou analýzou. Podľa zistených údajov sa *OB* gén nachádza v 5 cM intervale v blízkosti myšacieho chromozómu 6. (5 cM je miera genetickej vzdialenosti zodpovedajúca 5 zreteľným skríženiam na 100 zvierat.) Bolo generovaných celkom 771 informatívnych meióz a použitých pre genetické mapovanie [Friedman *et. al., Genomics,* 11: 1054 - 1062 (1991)]. Genetické miesta, ktoré boli mapované vzhľadom na *OB,* boli všetky publikované už skôr. Dva najbližšie opísané RFLP boli definované pomocou sond odvodených od onkogénových génov *carboxypeptidázového* a *met.*

Genetické vyriešenie opísaných experimentov bolo nedostačujúce pre klon *OB,* pretože žiadny z genetických markerov sa nedostal do tesnej väzby. Na identifikáciu tesne naviazaných RFLP boli izolované ďalšie próby a bolo rozšírené genetické kríženie. Náhodné časti DNA z blízkosti myšacieho chromozómu 6 boli izolované mikrodisekciou chromozómu [Bahary et. *al., Mammalian Genome,* 4: 511 - 515 (1993)]. Jednotlivé klonované próby boli testované z hľadiska tesnosti väzby s *OB.* Na základe týchto štúdií bola vytypovaná jedna próba, D6Rck13, tiež označovaná ako psd3 a pre svoju genetickú blízkosť k *OB* bola zvolená pre ďalšiu analýzu.

Táto próba bola použitá na stanovenie genotypu u 835 *OB* potomkov z interšpecifických a intersubšpecifických krížení, z čoho vyplynulo, že D6Rck13 je nonrekombinantný u všetkých 835 zvierat, ako opísal Bahary *et. al.* V priebehu fyzického mapovania bol identifikovaný nový polymorfný marker z kozmidového subklónu odvodeného od YAC 53A6. Tento nový marker bol umiestnený medzi D6Rckl3 a *OB* gén a bol použitý na stanovenie genotypu ďalších 771 informatívnych meióz z intrašpecifických interkrosov a backkrosov. Bolo identifikované jediné zviera # 167, nesúce rekombinantné kríženie medzi *OB* a D6Rck13. Štúdie naznačili, že D6Rck39/D6Rck13 je 0,06 cM od *OB.* Ďalšia identifikovaná próba, *Pax4,* bola 0,12 cM od *OB. Pax4* bola rekombinantná u dvoch zvierat # 111 a # 420. *Pax4* je pseudogén, ktorý bol už skôr mapova-

ný do blízkosti myšacieho chromozómu 6 [Gruss *et. al., Genomics,* 11: 424 - 434 (1991)]. Na tomto základe bolo stanovené, že *OB* gén sa nachádza v 0,2 cM intervale medzi Pax4 a D6Rck13. Toto zistenie viedlo k snahe klonovať vsunutú DNA so zámerom izolovať *OB* gén.

B) Fyzické mapovanie

Na klonovanie DNA z uvedeného intervalu boli použité umelo konštruované kvasinkové chromozómy (YAC), YAC je relatívne nový klonovací vektor umožňujúci klonovanie dlhých vlákien súvislej DNA, často dlhších ako jeden milión párov báz.

Umelé kvasinkové chromozómy boli izolované s využitím D6Rck13 a *Pax4*. Najprv boli pripravené purifikované DNA próby a boli použité na izoláciu zodpovedajúcich YAC. Izolované YAC (#8, #16, # 107 a # 24) boli najprv charakterizované a bolo zistené, že najďalej zasahoval # 16, t. j. dosahoval najbližšie k *OB*. Potom bol odobraný kľúčový koniec YAC # 16 a bolo zistené, že tento koniec bol bližšie k *OB* než *Pax*4. Koniec bol označený ako 16M(+). Tento záver umožnilo zistenie, že študovaná próba nebola rekombinantná u zvieraťa # 420 (na rozdiel od próby *Pax*4*)*. Koniec 16M(+) bol sekvenovaný a použitý do PCR testu. Pomocou PCR testu bol uskutočnený skríning knižnice YAC. Boli izolované štyri pozitívne klony. Následná charakterizácia týchto klonov, pomocou uvoľnení koncov, reštrikčného mapovania, pulznej gélovej elektroforézy a southernového blotovania s genetickými kríženiami, určila dva YAC dôležité pre ďalšie štúdie, *adu* a *aad.* YAC *aad* je 550 kB dlhý nechimérny YAC dosahujúci najďalej. Preto bol najvzdialenejší koniec tohto YAC, *aad*(pICL) použitý na skompletizovanie fyzickej mapy. YAC *adu* je 370 kB dlhý nechimérny YAC a bolo zistené, že jeho najvzdialenejší koniec, *adu*(+), je nonrekombinantný u všetkých *OB* potomkov genetického kríženia vrátane zvierat # 111 a # 167, čo naznačuje, že sa *OB* gén môže nachádzať v tomto YAC.

Pre tieto dva konce, aad(pICL) a *adu*(+), bol vyvinutý PCR test a bol použitý na izoláciu ďalších YAC a P1 klonov na doplnenie fyzickej mapy. Boli izolované významné klony P1 vrátane 498, 499, 500 (izolované próbou odvodenou od aad(pICL) a 322, 323 a 324 (izolované próbou odvodenou od *adu*(+)).

Medzitým boli charakterizované YAC izolované pomocou D6Rck13 (53A6, 25A8, 25A9, 25A10). Z týchto štúdií vyplynulo, že najbližšie k *aad* YAC zasahuje 53A6. Bola stanovená dĺžka medzery medzi 53A6 a *aad* 70 kB. Potom bol kľúčový koniec 53A6, 53(pICL) použitý na prehľadávanie troch dostupných knižníc YAC a knižnice P1. Bol izolovaný kritický klon P1, 325. Tento P1 klon presahoval do P1 klonov izolovaných pomocou *aad*(pICL), a preto preklenul medzeru medzi 532(pICL) a *aad*(pICL). Vďaka tomuto výsledku mohla byť klonovaná celá sada obsahujúca YAC a P1 klony, dĺžky 2,5 milióna párov báz a zahŕňajúca Pax4, 16M(+), *adu*(+), *aad*(pICL), 53(pICL), D6Rck39 a D6Rck13. Presným mapovaním miest rekombinácie zrejmých u zvierat # 11 a # 167 bolo vyvodené, že sa *OB* gén nachádza v intervale 400 kB. Kvôli získaniu funkčného zdroja DNA na izoláciu *OB* génu bolo izolovaných 500 kB pokrývajúcich túto nerekombinantnú oblasť v 24 klonoch P1. Tieto P1 klony vrátane 322 a 323, ktoré, ako bolo neskôr zistené, boli najvhodnešie, boli použité na zachytenie exónu.

Fyzická mapa časti chromozómu s *OB* je uvedená na obr. 7A. Obr. 7B predstavuje sadu YAC. Obr. 7C predstavuje sadu P1.

C) Izolácia vybraných génov

Na izoláciu génov v uvedenom intervale bol zvolený postup zachytávania exónu. Tento postup využíva komerčný vektor na identifikáciu exónov DNA (t. j. kódujúcich sekvencií) tak, že vyhľadáva funkčne zostrihané akceptorové a donorové sekvencie v genómovej DNA, ktoré boli zavedené do testovaných konštrukcií. DNA z klonov P1 vypestovaná a subklonovaná do vektora zachytávajúceho exón. Tieto klony potom tvorili krátke inzerty naklonované do Bluescript vektora. Každý klon bol rozmnožený PCR s využitím primárov so sekvenciami zodpovedajúcimi plazmidovým sekvenciám ohraničujúcim inzert. PCR rozmnoženie bolo uskutočnené priamo v baktériách obsahujúcich plazmid. Reakcie boli uskutočňované v robote Biomek. Produkty PCR boli rozdelené elektroforézou na 1 % agarózovom géli v TBE pufri s etídium bromidom. Postup zachytávania exónu bol modifikovaný tak, aby eliminoval kontaminujúcu DNA z *E. coli* od klonov P1, a aby odfiltroval veľké množstvo artefaktných exónov presahujúce 80 až 90 % hľadaných exónov. Vektor zachytávajúci exóny obsahoval HIV sekvencie; krátke úseky sekvencií tohto vektora sú artefaktné.

Experiment so zachytávaním exónu bol uskutočnený na rôznych klonoch P1. Zachytené produkty bolo rozmnožené PCR, selektované a sekvenované. Sekvencie predpokladaných exónov boli porovnané so sekvenciami Genbanky pomocou počítačového programu Blast. Pre ďalšie testovanie RT-PCR, northernovú analýzu a zoo blot bolo vybratých 15 exónov a bola sledovaná prítomnosť zodpovedajúcich sekvencií RNA alebo konzervatívnych sekvencií. Bolo zistené, že sedem z pätnástich predpokladaných exónov kódovalo RNA transkript, 325-2, 323-9, 322-5, D1-F7, 1H3 2G7. 325-2 je špecifický testikulárny gén; 323-8 a 323-9 pravdepodobne pochádzajú z rovnakého génu exprimovaného hlavne v mozgu a ľadvinách. IH3 a 322-5 sú nekvalitné mozgové transkripty. D1-F7 je exón z predchádzajúceho klonovaného génu *inozín monofosfát dehydroqenázy (IMPDH)*, ktorý slúžil ako všadeprítomný expresný model. Žiadny z týchto génov nekódoval OB. 2G7, exón *OB,* je spomínaný neskôr.

Po troch neúspešných pokusoch zachytiť exón *OB* génu, bol uskutočnený iný pokus zložiť DNA zo všetkých P1 z kritickej oblasti *OB*. Z klonov P1 boli zvolené: 258, 259, 322, 323, 324, 325, 498, 499, 500, 653, 654 a ďalšie. Na to klony P1 258, 260, 322, 498 a 499 boli subklonované do vektora zachytávajúceho exón a následne bolo pripravených niekoľko platní s bakteriálnymi klonmi, z ktorých každý obsahoval predpokladaný exón. Bolo získaných 192 klonov predstavujúcich kandidátov *OB*. Pri mnohých izolátoch boli pozorované zhodné artefakty, ako už bolo pozorované skôr, lebo obsahovali dva zachytené exóny odvodené z vektora. Tieto artefakty boli identifikované na základe veľkostí a na základe faktu, že DNA próby zodpovedajúce týmto artefaktom hybridizovali s príslušnými pásmi southernového blotu z gélu. Týmto postupom bolo z ďalšieho hodnotenia vylúčených 185 zo 192 klonov. Artefakty nebolo možné vylúčiť len na základe veľkostí, lebo taký prístup by mohol v dôsledku vylúčiť aj exóny zodpovedajúce *OB*.

Zo 192 exónov bolo teda pre ďalšie štúdie zvolených sedem exónov. Boli pripravené templáty pre sekvenovanie siedmich exónov a exóny boli sekvenované. Sekvencie siedmich exónov boli analyzované a bolo zistených sedem identických sekvencií a jeden zrejmý artefakt. Konkrétne to bol klon 1D12 obsahujúci HIV sekvenciu, t. j. artefaktný pás. Do ďalšej analýzy postúpili tri exóny: 1F1, 2G7 a 1H3. 1F1 bol vylúčený, lebo sa nachádzal mimo kritickú oblasť. Boli vybrané a syntetizované priméry PCR pre 1H3 a 2G7.

Bola stanovená sekvencia exónu na 2G7, ako je uvedené na obr. 10 (SEQ ID č. 7). Boli vybrané a syntetizované priméry PCR pre 2G7. Úseky sekvencií zodpovedajúce PCR primárom sú podčiarknuté. Sekvencie použitých primérov:

5' CCA GGG CAG GAA AAT GTG (Tm = 60,0 °C)
(SEQ ID č. 8)
3' CAT CCT GGA CTT TCT GGA TAG G (Tm = 60,0 °C)
(SEQ ID č. 9)

S týmito primérmi bol amplifikovaný genóm DNA v nasledujúcich podmienkach pre PCR: 25 - 30 cyklov pri 55 °C anelácie 2', pri 72 °C extenzie 2', pri 94 °C denaturácie 1' v štandardnom PCR pufri. Tieto priméry boli taktiež použité na prípravu označenej próby; do PCR reakcie bol zavedený ^{32}P-dCTP pri súčasnom znížení obsahu neoznačeného dCTP.

Test RT-PCR bol uskutočnený na vzorkách RNA z mnohých rôznych tkanív a bolo zistené, že k expresii 2G7 dochádzalo výlučne v bielom tukovom tkanive (obr. 11A). Označený ^{32}P-2G7 bol hybridizovaný k northernovému blotu tkanivových RNA (obr. 11B) a boli zistené vysoké hladiny expresie RNA v tukovom tkanive a nízke alebo nulové hladiny expresie vo všetkých ostatných tkanivách (príčinou signálov mohla byť kontaminácia tkanivových preparátov). 10 µg totálnej RNA z každého uvedeného tkaniva bolo rozdelených elektroforézou na agarózovom géli s formaldehydom. Próba bola hybridizovaná k blotu pri 65 °C v štandardnom hybridizačnom pufri Rapid Hybe (Amersham). RNA mala veľkosť približne 4,9 kB. V tomto bode bolo potvrdené, že 2G7 pravdepodobne obsahuje gén *OB*, a boli uskutočnené ďalšie analýzy.

D) Detekcia mutácií

Kvôli potvrdeniu, že 2G7 skutočne kóduje *OB* gén, bolo nutné preukázať rozdielnu hladinu expresie sekvencie DNA tohto génu v mutantných zvieratách, proti expresii u zvierat divokého typu. Štúdia bola uskutočnená na dvoch dostupných separátnych mutáciách *OB* génu, C57B1/6J *OB/OB* (1j) a Ckc/smj *OB/OB* (2J) (ďalej označované ako 1J resp. 2J). Študované myšacie kmene sú ďalej označované neformálnou nomenklatúrou. V opise a obrázkoch platí, že C57B1/6J je C57B1/6J +/+; CKC/smj je SM/Ckc-+^{Dac}-+/+; CKC/smj *OB/OB* je SM/Ckc-+^{Dac}-ob^{2J}/ob^{2J}. RNA bola izolovaná z tukových tkanív zvierat 1J, 2J a kontrolnej skupiny. Totálna RNA z každej jednotlivej vzorky bola štiepená DNázou a reverzne prepísaná s využitím oligo-dT ako primáru a reverznej transkriptázy. Výsledná jednovláknová cDNA bola potom amplifikovaná PCR s 2G7 ako primérom (podmienky pozri skôr) pre nižší pás alebo s komerčne dostupným aktínovým primérom pre vyšší pás. Produkty RT-PCR boli rozdelené na 1 % agarózovom TBE géli a zafarbené etídium bromidom (obr. 12 A). Z výsledkov RT-PCR bolo zistené, že 2G7 mRNA bola exprimovaná vo zvieratách 1J a všetkých ostatných kontrolných myšiach a celkom chýbala u 2J myší. Po 30 amplifikačných cykloch nebol zaznamenaný jediný signál. Tento pokus priamo dokázal, že 2G7 zodpovedá exónu *OB* génu.

Mutácia 2J je relatívne nová, je udržiavaná ako koizogénny kmeň a získaný výsledok bol prvým dostupným dokladom, že 2G7 je exónom *OB* génu. Mutácia sa pravdepodobne nachádza v promótorovej oblasti a celkom ruší syntézu mRNA. Pozitívny signál u myší 1J v TR-PCR experimente naznačuje, že 1J môžu niesť bodovú mutáciu, ktorá nepôsobí viditeľnú zmenu vo veľkosti RNA. Navyše podľa RT-PCR testov chýbala mRNA 2G7 u ďalších štyroch 2J zvierat.

Tento výsledok bol potvrdený northernovým blotovaním (obr. 12 B). Z tukových buniek jednotlivých kmeňov (C57B1/6J, 1J,CKS/smj a 2J) bola izolovaná RNA. 10 µg RNA z každej vzorky bolo rozdelené a blotované. Bloty boli hybridizované s PCR-značenou próbou 2G7, ktoré boli pripravené PCR amplifikáciou materiálu, t. j. pásu na obr. 11, v prítomnosti ^{32}p-dCTP. Ako kontrola na nanesené množstvo RNA bol použitý aktín. Aktínový signál bol pri všetkých vzorkách rovnaký. Signál *OB* chýbal vo vzorke mozgového tkaniva, pretože mRNA je špecifikovaná na tukové bunky.

Výsledky northernovej analýzy potvrdzujú, že RNA špecifická pre 2G7 sa nevyskytuje u 2J myší. RNA *OB* sa nevyskytuje u CKC/smj *OB/OB* myší, pretože tento kmeň obéznej mutácie má porušený gén a nedochádza k syntéze RNA. Navyše u 1J aj tlstých *DB/DB* je 10- až 20-násobne zvýšená hladina 2G7 RNA. Tieto výsledky podporujú hypotézu, že *OB* buď kóduje obehový hormón, alebo zodpovedá za vznik signálu z tukových buniek, ktorý moduluje telesnú hmotnosť. Výsledky potvrdzujú, že 2G7 je *OB* gén a predpovedajú, že u 1J myší je bodová, pravdepodobne nonsens mutácia vedúca k prematurovanej terminácii translácie.

Výsledky northernovej analýzy boli reprodukované na preparátoch RNA z tukových buniek zo štyroch rôznych 2J zvierat (obr. 13). V tomto teste bol ako kontrola, podobne ako aktín na obr. 12B, použitý transkript *ap2* špecifický pre tukové tkanivo. Intenzita pruhov *ap2* sa prakticky nemení. *Ap2* bol PCR-označovaný pri využití primárov z publikovanej sekvencie *ap2*. Produkty RT-PCR RNA z tukových buniek boli označované rovnakým postupom PCR-označenia. Uskutočnená analýza ukázala, že *OB* mRNA je bežne prítomná u homozygótnych i heterozygótnych zvierat a neprítomná u 2J mutatných zvierat.

U 1J zvierat bola identifikovaná mutácia. Ide o zámenu báz C na T, ktorých dôsledkom je vznik prematurovaného stop kodónu v polohe 108 na mieste arginínu, čo je pravdepodobne podstatou mutácie 1J (obr. 14), nehľadiac na vysoké expresné hladiny *OB* mRNA (pozri obr. 12 a 13, dráhy C57B1/6J *OB/OB).*

Nedávno bolo southernovým blotovaním potvrdené, že 2J mutácia je dôsledkom detekovanej zmeny v DNA na 5'konci *OB,* ktorá zrejme celkom ruší expresiu RNA. Presnú povahu tejto zmeny je ešte potrebné objasniť.

Určenie, či mutácia *OB* vedie k jednotnému charakteru fragmentov (obr. 15 A), bolo vykonané southernovým blotovaním genómovej DNA z CKC/smj (SM/Ckc-+^{Dac}) a C57B1/6J myší pri vyžití štyroch rôznych reštrikčných endonukleáz. Približne 10 μg DNA (odvodené z genómovej DNA z pečene, ľadvín alebo sleziny) bolo štiepených uvedenými reštrikčnými enzýmami. DNA bola rozdelená elektroforézou na 1 % agarózovom TBE géli. Potom bola DNA prenesená na imobilónovú membránu a hybridizovaná s PCR-označenou próbou 2G7. Kľúčovým pásom bol vrchný pás v *Bgl*II digestu u CKC/smj *OB/OB* (SM/Ckc-+^{Dac} OB^{2J}/OB^{2J}) DNA. Tento pás zodpovedá fragmentu s vyššou molekulovou hmotnosťou oproti ostatným kmeňom a naznačuje prítomnosť mutácie.

Obr. 15 B predstavuje southernové blotovanie *Bql*II digestu genómovej DNA potomkov kríženia ob^{2J}/+ x ob^{2J}/+. Pri niektorých DNA bol prítomný len vrchný pás, pri niektorých len nižší pás, niektoré DNA obsahovali oba pásy. Zvieratá, u ktorých bol pozorovaný len vrchný pás, sú allo-obézne, t. j. ob^{2J}/ob^{2J}. Z uvedených údajov vyplýva, že polymorfizmus (t. j. mutácia) na obr. 15 A vedie k segregácii v genetickom zmysle.

Príklad 1:

Klonovanie cDNA a určenie sekvencie *OB*

Pri využití PCR-označenej próby 2G7 bolo izolovaných celkom 50 myšacích cDNA klonov z knižnice cDNA z myšacích tukových buniek *lambda*gt11 (Clonetech 5'-STRETCH cDNA z testikulárnych tukových tkanív švajčiarskych myší #ML3005b) a 30 krížových hybridizujúcich ľudských cDNA klonov z knižnice cDNA z ľudských tukových buniek *lambda*gtl0 (Clonetech 5'-STRECH abdominálna cDNA #HL1108a). Prehľadanie knižnice bolo vykonané postupom plak lift. Filtre s plakmi boli denaturované v autokláve. Filtre boli duplicitne hybridizované s PCR-označenou próbou 2GF (pufor Rapid Hybe, 65 °C, cez noc). Po 2 - 4 hodinách prehybridizácie boli filtre premyté dvakrát po 30 min., 65 °C roztokmi 2 x SSC, 2 % SDS a bola exponovaná röntgenová snímka. Pásy pozitívne v obidvoch pokusoch boli plakovo purifikované. Plakovo purifikované fágy boli amplifikované PCR s využitím komerčných vektorových vzorov, napr. *lambda*qt10 a *lambda*gt11. Výsledné PCR produkty zodpovedali cDNA inzertom na každý fág s malým množstvom vektorovej sekvencie na obidvoch koncoch. Pásy boli gélovo purifikované a sekvenované s využitím automatického sekvenátora, ABI a vektorových primérov na sondovanie DNA polymerázy.

Primárne sekvenčné údaje boli prekontrolované manuálne, bázu za bázou, a boli opravené presluchy z počítačového programu. Podľa správnej sekvencie boli v smere syntetizované primáry a využité na ďalšie sekvenovanie. Tieto pokusy boli opakované tak dlho, až kým boli všetky dostupné cDNA klony sekvenované a syntetizované do sady. Dosiaľ bolo zostavených asi 3000 párov báz od 5'konca mRNA. Jeden cDNA klonov dosahujúci k 5'konci mRNA mal identickú sekvenciu s 5'RACE produktom RNA z tukového tkaniva (údaje nie sú uvedené).

Podľa sekvenčných údajov bol vynájdený 167 aminokyselín dlhý otvorený čítací rámec (obr. 1). Bola vynájdená sekvencia rovnaká s Kozakovou translačnou iniciačnou sekvenciou, obsahujúcou adenozín troch báz oproti smeru od ATG. Boli vynájdené dve triedy cDNA líšiace sa prítomnosťou alebo neprítomnosťou jedného glutamínovaného kodónu. Tento zvyšok sa nachádza na 3' strane hneď za zostrihaným akceptorovým miestom pre 2G7 exón. Pretože CAG kodón glutamínu je pravdepodobne zahrnutý v AG zostrihanej akceptorovej sekvencii, zdá sa, že v zostrihanej akceptorovej sekvencii došlo ku šmyku, so zreteľným deletovaním troch pár báz v podskupine cDNA, ako je uvedené.

```
    gln ser val
ag CAG TCG GTA (s glutamínom) (SEQ ID č. 17)
   |
(zostrihané akceptorové miesto)

       ser val
ag CAG TCG GTA (bez glutamínu)
       |
(zostrihané akceptorové miesto)
```

Sekvencia „ag" je predpokladaná intronová sekvencia v protismere od glutamínového kodónu, AG je predpokladané alternatívne miesto zostrihu. Tento glutamínový zvyšok sa nachádza vo vysoko konzervatívnej oblasti molekuly a jeho význam pre biologickú aktivitu nie je dosiaľ známy.

Ďalej bola detegovaná predpokladaná N-koncová signálna sekvencia, ktorej signálne štiepne miesto je predpokladaným karboxylovým koncom alanínového zvyšku v polohe 21. Táto predpokladaná signálna sekvencia bola potvrdená pomocou počítačového algoritmu v postupe von Heijneho. V polypeptidovej kódujúcej oblasti bola tak identifikovaná najpravdepodobnejšia signálna sekvencia ako oblasť aminokyselín 1 až 23, teda sekvencia:

MCWRPLCRFLWLWSYLSYVQA | VP (SEQ ID č. 10),

v ktorej zvislá čiara označuje predpokladanú signálnu sekvenciu štiepneho miesta. Zvyšok aminokyselinovej sekvencie je vysoko hydrofilný a vedľa N-koncovej sekvencie nevytvára žiadne ďalšie významnejšie štruktúrové tvary alebo klenuté membránové domény. Konkrétne neboli vynájdené zodpovedajúce sekvencie pre N-glykoziláciu alebo dibázické aminokyselinové sekvencie naznačujúce miesta štiepenia proteínu pri predpokladanom spracovaní proteínu Sabatini *et al., The metabolic basis of inhertited disease,* str. 177 - 223, C. V. Scriver *et al.* vyd., McGraw-Hill, New York). Prehľadávanie databázy pri využití programov Blast a Block neviedlo k objavu žiadnych homológových sekvencií.

RNA z ľudského tukového tkaniva bola analyzovaná northernovým blotovaním a boli degekované druhy RNA podobnej veľkosti ako myšací *OB* gén. Sekvenovanie a analýza cDNA klonov ukázali, že ľudský *OB* rovnako kóduje 167 aminokyselín dlhý polypeptid (obr. 2A a 2B a obr. 3) Rovnako boli v ľudskej RNA vynájdené dve triedy cDNA zahŕňajúce i nezahŕňajúce deletovanie troch párov báz (obr. 6). Obidva *OB* gény, myšacie aj ľudské, boli v predpokladanej kódujúcej oblasti vysoko homológové, ale dostupné 3' a 5' neprekladanej oblasti boli homológové iba z 30 %. Ľudský OB polypeptid obsahuje rovnako N-koncovú signálnu sekvenciu. Porovnanie sekvencie ľudského a myšacieho OB polypeptidu ukázalo, že obidve molekuly sú na úrovni aminokyselín z 83 % identické (obr. 4). N-konce maturovaných proteínov obidvoch druhov zdieľajú ešte vyššiu homológiu, v jednej stovke N-koncových aminokyselín bolo nájdených len šesť substitúcií konzervatívnych aminokyselín a tri substitúcie nekonzervatívnych aminokyselín.

Genómové DNA izolované z myši, krysy, králika, hraboša, mačky, kravy, ovca, prasaťa, človeka, kurčaťa, úhora a z drozofil boli štiepené reštrikčným enzýmom *Eco*R1. Digesty boli rozdelené elektroforézou na 1 % agarózovom TBE géli. DNA bola prenesená na imobilónovú membránu a hybridizovaná s PCR-označenou próbou 2G7. Filter bol hybridizovaný pri 65 °C a premytý dvakrát počas 20 minút roztokmi 2 x SSC, 2 % SDS, t. j. došlo k dvom zmenám pufra. Výsledky naznačujú, že *OB* je medzi stavovcami konzervatívny (obr. 16). Poznámka: DNA úhora obsahuje 2+ signál; úhor je ryba.

Z dostupných dát sa dá súhrne vyvodiť, že telesná hmotnosť a adipozita je riadená fyziologicky. Pred siedmimi rokmi začali štúdie zamerané na identifikáciu dvoch kľúčových zložiek tohto systému: *OB* a *DB* génov. Ako ukazuje príklad 1, *OB* gén bol teraz identifikovaný ako gén špecifický pre tukové tkanivo, ktorý má kľúčovú úlohu v regulácii telesnej hmotnosti. Produkt tohto génu, najpravdepodobnejšie sekretorický hormón, je významný na diagnostiku a liečbu nutričných porúch u ľudí a zvierat.

Príklad 2:

Expresia OB v baktériách

Myšacie aj ľudské cDNA kódujúce *OB* boli klonované do pET-15b expresného vektora (Novagén). Tento vektor obsahuje promótor T7 v spojení s lac operátorom a exprimuje fúzny proteín obsahujúci histidínový tag (His-tag) a trombínové štiepne miesto v protismere hneď za inzertným miestom kódujúcim sekvenciu (SEQ ID č. 11 a 12; obr. 17).

Myšacie a ľudské cDNA boli modifikované, takže alanín na konci signálnej sekvencie bol premenený na *Nde*I miesto, rovnako ako separátne sekvencie v 3' oblasti. Inzercia NdeI miesta bola uskutočnená postupom PCR pri využití nových primérov:

Mnde-5' (myšací päť s čiarkou primér):

CTTATGTTCA TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC (SEQ ID č. 13)

Mnde-3' (myšací tri s čiarkou primér):

TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC (SEQ ID č. 14)

Hnde-5' (ľudský päť s čiarkou primér):

TCTATGTCCA TATGGTGAAG ATCCAAAAAG TC (SEQ ID č. 15)

Hnde-5' (ľudský tri s čiarkou primér):

TTCCTTCCCA TATGGTACTC CTTGCAGGAA GA (SEQ ID č. 16)

Priméry obsahujú v prostriedku 6 nesúhlasných párov báz, ktoré zavádzajú *Nde*I reštrikčné miesta na obidva konce PCR fragmentu. S využitím týchto primérov boli amplifikované postupom PCR fágy obsahujúce myšacie alebo ľudské cDNA. Produkty PCR boli štiepené *Nde*I a gélovo purifikované na 1 % nízkotopiacom sa agarózovom géli. Purifikované pásy boli subklonované do pET vektora. Vzniknuté plazmidy boli sekvenované, aby bolo potvrdené, že v priebehu PCR amplifikácie nedošlo k vzniku mutácií. Boli pripravené konštrukty z ľudskej a myšacej cDNA kódujúcej a nekódujúcej glutamín 49. Konkrétne s využitím PCR klonovacieho postupu boli pripravené pET 15b konštrukty obsahujúce ľudskú alebo myšaciu *OB* kódujúcu sekvenciu bez signálnej sekvencie, napojenú na His-tag. Konštrukty boli sekvenované, aby bolo potvrdené, že v priebehu PCR amplifikačného kroku neboli do kódujúcej sekvencie *OB* génu vnesené žiadne chyby.

Na transformáciu bakteriálneho expresného hostiteľa boli zvolené dve plazmidové konštrukty, pETM9 a pETH14. Po indukcii 1 mmol.l^{-1} IPTG za optimálnych podmienok produkovali transformované baktérie 100 až 300 μg/ml fúzneho OB. Väčšina OB fúzneho proteínu sa nachádzala vnútri buniek. Po rozpustení v 6 mol.l^{-1} guanidín hydrochloridu alebo močovine bol fúzny proteín purifikovaný na stĺpci (Ni-chelatačný) živice viažucej His. Podmienky purifikácie na kolóne (väzba, premývanie, elúcia) boli určené experimentálne. Fúzny proteín OB bol naviazaný k nosiču v zmesi 5mmol.l^{-1} imidazol/6 mol.l^{-1} guanidín hydrochlorid a zostal naviazaný až do 20 mmol.l^{-1} imidazol/6 mol.l^{-1} guanidín hydrochloridu. Proteín bol eluovaný pri 60 mmol.l^{-1} imidazol/6 mol.l^{-1} guanidín hydrochloridu (obr. 18 A,B). Potom boli obidva purifikované proteínmi, myšacími aj ľudskými, dialyzované proti PBS na odstránenie guanidín hydrochloridu a použité na vypestovanie polyklonálnych protilátok.

Kvôli testovaniu biologickej aktivity pripraveného fúzneho proteínu boli vyvinuté a vyskúšané podmienky na priestorové usporiadanie proteínu. Postup zahŕňa dialýzu fúzneho proteínu v 1 mol.l^{-1} guanídovom roztoku a zriedený 0,4 mol.l^{-1} arginínovým roztokom. Pred testovaním biologickej aktivity bol z fúzneho proteínu odstránený His-tag. Tag bol odštiepený z fúzneho proteínu trombínom z ľudskej placenty.

Kódujúce sekvencie ľudského a myšacieho *OB* génu bez signálnej sekvencie boli jednotlivo inzertované do pET 12c vektora PCR klonovacím postupom. Tieto konštrukty v bakteriálnom hostiteľovi smerujú syntetizovaný OB fúzny proteín do periplazmatického priestoru. Izolácia fúzneho proteínu z periplazmatického priestoru a jeho oddelenie od ostatných proteínov hostiteľa potom vyžaduje iba jednoduchú gélovú filtráciu, pri ktorej nedochádza k denaturácii.

Príklad 3:

Príprava protilátok proti OB polypeptidu

Okrem využitia rekombinantného proteínu na generovanie polyklonálnych protilátok bol vo vydedukovanej sekvencii myšacieho OB identifikovaný súbor štyroch peptidových sekvencií, pomocou softvéru imunogenitných závislostí (sada programov GCG). Tieto štyri fragmenty z karboxylového konca peptidu majú nasledujúce sekvencie:

(SEQ ID č. 18):

Val-Pro-Ile-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr

(SEQ ID č. 19):

Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala

(SEQ ID č. 20):

Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp

(SEQ ID č. 21):

Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys

Tieto peptidy boli konjugované ku KLH a konjugáty peptid-KLH použité na štandardnú imunizáciu králikov. Z králikov potom boli odobrané polyklonálne séra špecifické k jednotlivým peptidom.

Príklad 4:

Translokácia OB polypeptidu *in vitro*

Kvôli potvrdeniu prítomnosti funkčnej signálnej sekvencie boli ľudské cDNA obsahujúce celý otvorený čítací rámec subklonované do vektora pGEM. Tento pokus bol uskutočnený len s ľudskou cDNA, pretože vhodné myšacie subklony neboli izolované. Pozitívne vlákno ľudskej *OB* RNA bolo prepísané pomocou Sp6 polymerázy a použité na translačnú reakciu *in vitro* v prítomnosti a neprítomnosti psích pankreatických mikrosomálnych membrán. Primárny translačný produkt migroval spolu s molekulovou hmotnosťou 18 kD, čo je v súlade s predpokladanou sekvenciou cDNA. Mikrosomálne membrány inhibovali celkovú účinnosť translačnej reakcie 5 x. V prítomnosti membrán však bolo 50 až 70 % primárneho translačného produktu OB skrátených o 2 kD, čo naznačuje, že signálna sekvencia bola funkčná (obr. 19A). Veľkosť primárneho translačného produktu interleukínu-α RNA, ktorý nekóduje signálnu sekvenciu, ostala bezo zmeny aj pri reakcii v prítomnosti mikrosomálnych membrán. Kvôli overeniu, či prebehla translokácia OB proteínu, boli produkty *in vitro* translácie štiepené proteinázou-K. Proteolýza primárneho translačného produktu 18 kD prebehla úplne, ale opracovaný produkt 16 kD ostal neštiepený, čo naznačuje, že bol translokovaný do lumenu mikrozómov (obr. 19 B).

Po odštiepení signálnej sekvencie ostávajú v predpovedanom proteíne dva cysteínové zvyšky, ktoré umožňujú vznik disulfidického mostíka charakteristického aj pre iné sekretorické polypeptidy [Shen *et al.*, *Science*, 224: 168 - 171 (1984].

Príklad 5:

Charakterizácia *OB* génu

Kvôli zisteniu závislosti obezity od genetických zmien *OB* génu u ľudí, boli určené sekvencie ľudského génu SEQ ID č. 22 a 24 (obr. 20 A až C). Knižnica ľudských klonov P1 bola prehľadaná špecifickými primármi z ľudskej kódujúcej sekvencie. Boli vynájdené tri rôzne klony P1, napestované a amplifikované PCR s využitím primárov z oblastí ohraničujúcich miesta zostrihu medzi prvým a druhým kódujúcim exónom. Bola amplifikovaná a čiastočne sekvenovaná celá intronová oblasť 2 kD (pozri obr. 20 A a SEQ ID č. 22 a 24).

Štruktúra myšacieho i ľudského génu bola charakterizovaná PCR testami a ďalšími štandardnými postupmi. Myšací *OB* gén je tvorený tromi exónmi, druhý a tretí exón obsahuje kódujúcu sekvenciu (obr. 20 D). Kódujúca oblasť ľudského *OB* génu má rovnakú štruktúru; ale u ľudského génu chýba 5' exón a intrón (obr. 20 E).

Z intrónových sekvencií ľudského génu boli odvodené a pripravené dva rady primérov (obr. 20 A až C). Nasledujúce sekvencie primérov (F a R označujú smer tam a späť):

H*OB* 1gF 5'-CCCAAGAAGCCCACTCTG-3' (SEQ ID č. 29)

H*OB* 1gR 5'-GACTATCTGGGTCCAGTGCC-3' (SEQ ID č. 30)

H*OB* 2gF 5'-CCACATGCTGAGCACTTGTT-3' (SEQ ID č. 31)

H*OB* 2gR 5'-CTTCAATCCTGGAGATACCTGG-3' (SEQ ID č. 32)

Boli pripravené vzorky DNA zo štyroch rôznych zdrojov a uvedené rady primérov boli použité na amplifikáciu ľudskej genómovej DNA odohranej od ťažko obéznych ľudí. Produkty PCR boli rozdelené na 1 % nízkotaviacom agarózovom géli pásmi vyrezanými a štiepenými agarázou. Použitím sekvenátora DNA ABI 373 A a Taq dideoxy terminátorového kitu (ABI, Perkin Elmer) boli určené sekvencie produktov PCR. Dosiaľ bola vynájdená len jedna bodová mutácia *OB* génu vo vzorke jedného z pacientov. Táto mutácia je v prvom exóne a nemení aminokyselinovú sekvenciu. Vo vzorke od iného pacienta, ako naznačujú predbežné údaje, je prítomná inzertovaná sekvencia v prvom exóne.

Prehľadnejšie sekvencie na detekciu mutácií je možné získať z iného automatizovaného sekvenačného postupu, ktorý miesto Taq DNA polymerázy pracuje so sekvenázou.

Príklad 6:

Expresia OB v kvasinkách

Po pozičnom naklonovaní *OB* vznikla významná možnosť odhaliť fyziologický mechanizmus, ktorým OB proteín znižuje príjem potravy a telesnú hmotnosť. Prvým krokom tejto štúdie bola rekombinantná produkcia funkčného proteínu pri využití expresného systému. Okrem úspešného bakteriálneho expresného systému bol použitý aj kvasinkový expresný systém. Kvasinkový expresný systém má pre expresiu OB niekoľko výhod. Najdôležitejšia je vysoká pravdepodobnosť produkcie biologicky aktívnych eukaryontných proteínov. OB polypeptid je u všetkých cicavcov veľmi podobný, z čoho vyplýva, že kvasinkový sekretorický aparát je bližší sekretorickým cestám cicavcov ako bakteriálny sekretorický aparát. Konkrétne proteínové modifikácie OB prebiehajúce v bunkách cicavcov budú pravdepodobne prebiehať aj pri expresii v kvasinkovom sekretorickom systéme. Navyše k správnemu priestorovému usporiadaniu proteínu dochádza pri prechode sekretorickým aparátom a dá sa predpokladať, že prechodom kvasinkovým sekretorickým aparátom vznikne proteín s priestorovým usporiadaním a prirodzenou biologickou aktivitou. Pre OB polypeptid je tento rys veľmi významný vzhľadom na dva cysteínové zvyšky, ktoré môžu vytvárať disulfidickú väzbu. Na rozdiel od sekreto-

rických ciest redukujúce prostredie bunkovej cytoplazmy zabraňuje tvorbe disulfidických mostíkov; a preto je nevyhnutné, aby kvôli vzniku disulfidických väzieb *in vivo* OB prechádzal sekretorickými cestami. Ďalšími výhodami kvasinkového expresného systému je jednoduchá a rýchla manipulácia, dostupnosť vektorov a kmeňov a rozsiahle skúsenosti v oblasti kvasinkovéj rekombinantnej technológie.

Expresný systém *Pichia pastoris* bol zvolený z nasledujúcich štyroch dôvodov:

(1) vyššia hladina expresie heterológových proteínov v porovnaní s inými kvasinkovými systémami ako napr. *S. cerevisiae;*

(2) glykozylácia proteínu v systéme *Pichia pastoris* je podobnejšia expresnému systému cicavca, ako glykozylácia v systéme *S cerevisiae* (hoci pri počítačovej analýze neboli u OB vynájdené glykozylačné miesta, stále zostáva možnosť, že dochádza ku glykozylácii na neznámych miestach);

(3) *Pichia pastoris* sekrétuje veľmi málo vlastných proteínov, a preto je všeobecne veľmi jednoduché purifikovať exprimovaný cudzí proteín; a

(4) vektory a kvasinkové kmene sú komerčne dostupné (Invitrogen).

Na obr. 21 a 22 sú uvedené dve stratégie prípravy expresných vektorov.

Bol zvolený vektor pPIC.9. Tento vektor obsahuje klonovacie miesto v smere hneď vedľa prepro kódujúcej sekvencie α-párovacieho faktora, ktorý smeruje sekréciu proteínu kódovaného génom naklonovaným do tohto klonovacieho miesta do sekretorických ciest. Ďalším významným rysom vektora je *HISA* gén umožňujúci selektívne vstrebanie vektora auxotrófnym kmeňom kvasiniek, ktorý sa po transformácii pestuje v histidíndeficientnom médiu. Stratégia klonovania:

PCR amplifikácia *OB* cDNA s 5'primérom, ktorý na 3'konci obsahuje komplementárnu sekvenciu k sekvencii *OB* priamo nasledujúcu za predpokladaným hlavným štiepnym miestom peptidu a na 5'konci sekvenciu komplementárnu k vektorovej sekvencii α-párovacieho faktora. 5'primér rovnako obsahuje miesto *Xho*I. 3'primér je navrhnutý tak, aby obsahoval na 3' konci sekvenciu komplementárnu k niekoľkým aminokyselinám OB a na 5'konci miesto *Eco*RI. Produkt PCR amplifikácie bol štiepený *Xho*I *Eco*RI a klonovaný do rovnako štiepeného pPIC.9. Po naklonovaní myšacej aj ľudskej *OB* cDNA, v obidvoch prípadoch s i bez glutamínového kodónu 49, boli jednotlivé klony všetkých štyroch konštrúkt izolované a sekvenované, aby bolo potvrdené, že konštrukty boli klonované v správnej orientácii, do správneho čítacieho rámca a že neobsahujú žiadne mutácie eventuálne vzniknuté pri amplifikácii. Klony so správnou sekvenciou boli použité k transformácii *P. pastoris* kmeň GS115, histidínový auxotrof.

V prípade dvoch myšacích konštrúkt boli transformované klony kvasiniek testované na expresiu proteínu. Ako dôkaz, že transformované kvasinky obsahujú *OB,* bol vykonaný test DNA dot-blot a test hybridizácie kolónií; obidva testy potvrdili prítomnosť *OB* sekvencie v transformovaných bunkách a neprítomnosť *OB* sekvencie v bunkách netransformovaných. Transformované kvasinky sekrétovali proteín 16 kDa do kultivačného média, pri netransformovaných bunkách proteín tejto veľkosti nevznikal (obr. 23 A). 16 kDa je predpovedaná veľkosť OB. Bolo zistené, že jednotlivé klony obsahujúce myšacie konštrukty exprimujú vysoké hladiny OB a bola vyvinutá stratégia purifikácie vedúcej k homogénnemu OB. Bola vyskúšaná purifikácia OB na stĺpci katexu (obr. 23 B); podľa predbežných výsledkov je vhodný silný katex. Po katexovej chromatografii však nebol očakávaný OB produkt vynájdený, čo naznačuje prítomnosť proteáz vo vzorke.

Možným riešením tohto problému je príprava fúznych *OB*-His-tag a ich expresia v kvasinkách (obr. 22). OB polypeptid bez naviazaného His-tag sa afinitne viaže na Ni-chelatačnú kolónu. Purifikácia OB polypeptidu Ni-chelatáciou nasledovaná gélovou filtráciou viedla k produktu s dostatočnou čistotou na hmotnostnú spektroskopickú analýzu. Hmotnostné spektrum potvrdilo očakávanú molekulovú hmotnosť exprimovaného proteínu, čo je významný dôkaz úspešnej expresie OB v *P. pastoris.*

Postup Ni-chelatácia/gélová filtrácia však nevedie k dostatočne čistému OB polypeptidu. Ukázalo sa, že sú prítomné ešte malé molekuly. Zo zádrže Ni-chelatačnej kolóny bola zrejme eluovaná proteolitická aktivita. Preto bol navrhnutý trojstupňový purifikačný postup: Ni-chelatácia, katex (eliminujúci malé kontaminujúce molekuly) a gélová filtrácia.

Odhad hladiny expresie pomocou farbenia SDS-PAGE gélu Coomassieho modrou viedol k hodnote 10 mg/l pri pestovaní kvasiniek v trepačkách. Dá sa predpokladať, že vo fermentačných nádobách budú hladiny expresie vyššie, fermentácie vedúce k väčším množstvám proteínu sú už naplánované. V oblasti ľudských *OB* konštrúkt boli identifikované klony kvasiniek obsahujúce mnoho kópií *OB* génov, pri ktorých sa dá predpokladať expresia OB proteínov. Vyvinuté protilátky budú použité na potvrdenie identity sekrétovaného proteínu 16 kDa.

Príklad 7:

Vysoká hladina expresie OB fúzneho peptidu v baktériách

Príprava zmrazených zásobných kultúr

Do každého z dvoch 4 ml alikvótov sterilného média M9ZB bez zdroja uhlíka bolo pridaných 40 µl zásobného roztoku dextrózy (0,4 g/ml, sterilizované filtráciou), 10 µl zásobného roztoku ampicilínu (200 mg/ml)

a 5 µl zásobného roztoku chlóramfenikolu (34 mg/ml, etanol). Takto upravené médiá boli naočkované jednou kolóniou *E. coli* s naklonovanou myšacou alebo ľudskou *OB*1 DNA vo vektore pET-14b Novagen. Skúmavky boli cez noc inkubované pri 37 °C.

0,5 ml kultúry inkubovanéj cez noc bolo použitých na naočkovanie 50 ml média M9ZB obsahujúceho dextrózu, ampicilín a chlóramfenikol. Bola vykonaná inkubácia pri 30 °C a periodicky monitorovaná absorbancia pri 600 nm (A_{600}). Pri hodnote A_{600} 1 až 1,2 bol odohraný alikvót kultúry 175 µl zmiešaný s 25 µl 60 % glycerolu v 2 ml eppendorfovej skúmavke, rýchlo zmrazený v kvapalnom dusíku a uchovaný pri -80 °C.

Rast kultúry

50 ml média M9ZB obsahujúceho 0,5 ml 40 % dextrózy, 125 µl zásobného roztoku ampicilínu a 50 µl zásobného roztoku chlóramfenikolu bolo naočkovaných zmrazenou zásobnou kultúrou (1 ml) a inkubovaných pri 30 °C. Pri hodnote A_{600} 1 až 1,2 bolo odohraných 10 ml kultúry a použitých na naočkovanie každej zo štyroch 2 l baniek s 500 ml média M9ZB obsahujúceho dextrózu, ampicilín a chlóramfenikol. Médiá boli inkubované pri 30 °C na dosiahnutie hodnoty A_{600} 1 až 1,2 s konečnou koncentráciou 0,5 mmol.l^{-1} IPTG. Kultúry boli inkubované cez noc. Bunky boli izolované centrifugáciou pri 4000 ot./min., 20 min. Opísaný expresný systém viedol k výťažku rekombinantného OB polypeptidu v pomerne vysokom percentuálnom podieli z celkového množstva proteínov; rádovo gram/liter *E. coli*.

Bunková lýza a resuspendovanie bunkových tiel

Bunková pasta bola resuspendovaná v minimálnom objeme 20 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,2 10 % glycerol, 0,1 mol.l^{-1} KCL, 5 mmol.l^{-1} $MgCl_2$, 1 % aprotinín, 1 mmol.l^{-1} PMSF, 5 µg/ml leupeptín a 50 µg/ml DNaza I. Suspenzia bola trikrát zmrazená a rozohriata v kvapalnom dusíku a vlažnej vode. Lyzované bunky boli centrifugované pri 18 000 ot./min., 30 min. a resuspendované v 20 mmol.l^{-1} NaCl. Suspenzia bola sonifikovaná a bol pridaný Triton X100 na výslednú koncentráciu 2 %. Vzniknutá zmes bola centrifugovaná pri 18 000 ot./min., 15 min. Po dvoch takýchto cykloch bolo uskutočnené ešte trojnásobné pranie bez Tritonu. Výsledná paleta bola zriedená 6 mol.l^{-1} GdHCl (guanidín hydrochlorid), 20 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,5, zmes sonikovaná a centrifugovaná. Supernatant bol ďalej purifikovaný.

OB proteín v nesprávnom usporiadaní bol purifikovaný afinitnou chromatografiou na nosiči s imobilizovaným kovovým iónom (IMAC). Roztok bol nanesený na 40 ml chelatačného kolónu Pharmacia s rýchlo tečúcou chelatačnou sefarózou, kolóna premytá 5 x 40 ml mmol.l^{-1} $NiSO_4$ a ekvilibrovaná 6 mol.l^{-1} GdHCl, 20 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,5. Kolóna bola premytá 6 mol.l^{-1} GdHCl, 30 mmol.l^{-1} imidazol, 20 mmol.l^{-1} HEES, pH 7,5. Nakoniec bol eluovaný proteín rovnakým spôsobom s obsahom 0,2 mol.l^{-1} imidazolu. Proteín v nesprávnom priestorovom usporiadaní bol uchovaný v 6 mol.l^{-1} GdHCl pri 4 °C po pridaní octanu sodného na 10 mmol.l^{-1} a úprave pH na 4,5 kyselinou octovou.

Priestorové preusporiadanie proteínu purifikácie:

6 mol.l^{-1} GdHCl obsahujúci 100 mg proteínu sa nechal reagovať so 67 ul 1 mol.l^{-1} ditiotrietolu (DTT) a bol zriedený na 67 ml 6 mol.l^{-1} GdHCl, 10 mmol.l^{-1} NaAc, pH 4,5. Roztok bol miešaný pri laboratórnej teplote 1 h. Potom bol miešaním vliaty do 4 l 20 % glycerolu, 2,5 mmol.l^{-1} $CaCL_2$, 20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,4. Po dôkladnom premiešaní bol roztok ponechaný pri teplote bez ďalšieho miešania. Ďalej bolo pridaných 2000 jednotiek purifikovaného bovinného trombínu (trombostaty, Parke-Davia) a roztok bol jemne premiešavaný. Po 2,5 h bolo pridaných znova 2000 jednotiek trombínu a štiepenie histidine-tag pokračovalo ešte ďalšie tri hodiny. Štiepenie trombínom bolo ukončené prídavkom PMSF na výslednú koncentráciu 0,1 mmol.l^{-1}. Roztok bol prefiltrovaný a uchovaný pri 4 °C.

Štiepený proteín bol ďalej purifikovaný na rovnakej kolóne IMAC, ako bolo uvedené, ekvilibrovanej 1 mol.l^{-1} KCL, 20 % glycerolom a 20 mmol.l^{-1} pufrom HEPES, pH 8,4. Po nanesení roztoku proteínu bola kolóna premytá rovnakým pufrom, štiepený proteín eluovaný roztokom 1 mol.l^{-1} KCl, 20 % glycerol, 40 mmol.l^{-1} HEPES, pH 8,4. Nerozštiepený proteín bol eluovaný pri 0,2 mol.l^{-1} imidazolu.

Purifikovaný štiepený proteín bol zahustený, nechal sa reagovať s roztokom 50 až 100 mmol.l^{-1} EDTA a 10 mmol.l^{-1} kyanoželezitanom draselným (kvôli dokončeniu možná neúplná oxidácia) a prečistený gélovou filtráciou na kolóne superdex 75 16/60. Výťažok purifikácie sa blížil k 50 % vzhľadom na východiskový proteín.

Purifikovaný expresný proteín bol charakterizovaný niekoľkými postupmi. Fyzikálna charakterizácia sa vykonáva dynamickým rozptylom svetla, ktorá vypovedá o homogenite štruktúry a je používaná ako meradlo správneho priestorového usporiadania proteínu. Z rozptylových údajov vyplýva, že ľudský OB polypeptid je exprimovaný prevažne alebo výlučne ako monomér, myšací OB polypeptid ako dimér i monomér.

Testy s Ellmanovým činidlom a hmotnostnou spektroskopiou potvrdili, že cysteínové zvyšky vytvárajú v molekule proteínu disulfidický mostík. Táto oxidovaná forma polypeptidu bola biologicky aktívna pri testovaní na myšiach.

Cirkulárny dichroizmus bol použitý na hrubé určenie štruktúry proteínu. CD spektrá merané vo fyziologickom pufri (pH 8, fyziologická iónová sila roztoku) naznačujú, že ľudský OB polypeptid má zo 60 % α-helikálnu a zo 40 % náhodne zvinutú štruktúru. Myšací OB polypeptid má podľa CD spektier z 50 % α-helikálnu a z 50 % náhodne zvinutú štruktúru.

Identifikácia oblastí polypeptidu prístupných proteolýze bola vykonaná obmedzenou proteolýzou a následnou hmotnostnou spektroskopickou analýzou. Bola vynájdená flexibilná štruktúra slučky v oblasti aminokyselín 54 až 60 (obr. 4). Je pravdepodobné, že táto flexibilná slučka spája dve domény definované 2° štruktúry, napr. α-helix.

Biologická aktivita purifikovaného proteínu bola testovaná na hlodavcoch, podaním proteínu štíhlym i obéznym zvieratám osmotickou pumpou (napr. osmotická pumpa ALZET, Alza Corporation, Palo Alto, CA) alebo i. p. vo veľkých denných dávkach počas najmenej dvoch týždňov. Bol sledovaný účinok na stravovacích zvykoch s telesnou hmotnosťou zvierat.

Príklad 8:

Vplyv OB polypeptidu (leptínu) na zníženie telesnej hmotnosti

Produkt génu myšacieho *OB* lokusu má dôležitú úlohu pri regulácii telesnej hmotnosti. Uvádzané príklady dokazujú, že OB proteín sa nachádza v plazme v krvnom obehu myší, krýs a človeka. Obehová forma OB proteínu u týchto troch živočíšnych druhov má rovnakú molekulovú hmotnosť (podľa SDS-PAGE) ako vydedukovaná polypeptidová sekvencia bez signálnej časti, čo naznačuje, že po odštiepení signálnej sekvencie už proteín nie je *in vivo* ďalej spracovávaný. OB proteín nebol vynájdený v plazme myšacej C57/B16J *OB/OB,* vyskytoval sa v desaťnásobnom nadbytku v plazme myšacej *DB/DB* a dvadsaťnásobnom nadbytku v plazme krýs *FA/FA* oproti kontrole. Dá sa predpokladať, že tieto obézne mutácie sú proti OB rezistentné. V plazme odohranej v skupine šiestich štíhlych ľudí boli vynájdené až sedemnásobné rozdiely v hladinách OB proteínu. Denné injekcie rekombinantného myšacieho OB proteínu viedli k dramatickému zníženiu telesnej hmotnosti u *OB/OB* myší, významne ovplyvnili telesnú hmotnosť myšacieho divokého typu, ale nemali žiadny účinok na myši typu *DB/DB.* Z týchto údajov vyplýva, že produkt génu *OB* lokusu endokrinne reguluje telesnú hmotnosť.

Materiály a postupy

Králiky boli imunizované rekombinantným proteínom vo Freundovej adjuvans (HRP, Inc.). Imunopurifikované protilátky proti myšaciemu OB boli izolované z antiséra na kolóne sefarózy-4B s konjugovaným rekombinantným proteínom [Harlow *et al., Antibodies: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)]. Imunoprecipitácia myšacej plazmy: 0,5 ml vzorka plazmy myši, krysy a človeka obsahujúca 2,5 ml mmol.l^{-1} EDTA bola predčistená na nekonjugovanej sefaróze-4B pri laboratórnej teplote za stáleho kolísania počas 2 hodín. Sefaróza bola odstránená odstredením a bolo pridaných 50 ml 50 % suspenzie sefarózy s konjugovanou protilátkou obsahujúcou afinítívne purifikovanú protilátku v koncentrácii 1 mg/ml sefarózy (originálne balenie). Ďalej bolo pridaných 1 až 0,5 ml 2 x RIPA pufra a boli dosiahnuté nasledujúce výsledné väzbové podmienky: 50 mmol.l^{-1} Tris-HCl, pH 7,5, 100 mmol.l^{-1} NaCl, 1 % NP-40, 0,1 % SDS, 0,5 % deoxycholát sodný a 0,025 % azid sodný. Reakcia prebiehala cez noc pri teplote 4 °C za stáleho kolísania. Sefaróza konjugovaná s protilátkou bola osemkrát premytá pufrom RIPA, trikrát PBS a rozdelená na 15 % SDS-PAGE. Proteíny boli prenesené na nitrocelulózu a bolo vykonané westernové blotovanie s biotinylovanou imunopurifikovanou protilátkou proti rekombinantnému proteínu. Ako sekundárna protilátka bol použitý HRP-streptavidín a detekcia vykonaná ECL.

Kvantitatívne určenie množstva OB v myšacom sére: Ku vzorkám 100 *lambda* C57B1/6J *OB/OB* plazmy bolo pridané vzrastajúce množstvo priestorovo preusporiadaného myšacieho OB proteínu (0,01; 0,1; 0,5; 2,0; 15,0 ng) a vzorky inkubované pri 4 °C, 3 h s protilátkou konjugovanou na sefaróze s proteínom A. Po dôkladnom premytí pufrom A (10 mmol.l^{-1} sodný fosfátový pufer, pH 7,4; 100 mmol.l^{-1} NaCl; 1 % Tritón X-100, 5 mmol.l^{-1} EDTA, 1 mmol.l^{-1} PMSF) boli vzorky resuspendované v rovnakom pufri, rozdelené na 15 % SDS-PAGE a prenesené na nitrocelulózovú membránu. Bolo vykonané westernové blotovanie s imunopurifikovanou biotinylovanou protilátkou oproti amino-koncu ako primárnou protilátkou a HRP-streptavidínom ako sekundárnou protilátkou a ECL detekcia.

Cytoplazmatické extrakty boli pripravené homogenizáciou adipózneho tkaniva v NDS pufri (10 mmol.l^{-1} Tris, pH 7,5; 10 mmol.l^{-1} NaCl; 60 mmol.l^{-1} ICCI; 0,15 mmol.l^{-1} spermín; 0,5 mmol.l^{-1} spermidín; 14 mmol.l^{-1} β-merkaptoetanol; 0,5 mmol.l^{-1} EGTA; 2 mmol.l^{-1} EDTA; 0,5 % NP-40) polytrónovým a dounce postupom, jadrá boli odstránené centrifugáciou pri 700 g.

Imunoprecipitácie boli vykonávané uvedeným postupom, len s imunopurifikovanými protilátkami proti ľudskému OB. Pri teste ELISA bolo 100 ml roztoku 1 mg/ml imunopurifikovanej protilátky proti ľudskému OB rozpustených v roztoku PBS pufrované borátom, nanesených na mikrotitračné platne (Corning kat. #2595) a inkubovaných cez noc pri 4 °C. Potom boli platne premyté 4 x borátovým fyziologickým roztokom s obsahom 0,05 % Tween 20 a prebytok kvapaliny bol odstránený. Platne boli blokované 2h inkubáciou pri

laboratórnej teplote s borátovým fyziologickým roztokom obsahujúcim 0,3 % želatíny, 240 ml na jamku, premyté a sušené. V jednotlivých jamkách boli inkubované 100 ml roztoky obsahujúce známe množstvo ľudského OB proteínu v správnom priestorovom usporiadaní alebo vzorky plazmy, cez noc pri 4 °C. Po premytí boli platne inkubované so 100 ml roztoku imunopurifikovanej biotinylovanej protilátky oproti ľudskému OB (0,1 mg/ml) v želatínovom roztoku pufrovanom borátom, 4 h, pri laboratórnej teplote. Po premytí bol do platní pridaný HRP-Streptavidín (HRP je peroxidáza z chrenu) (0,1 mg/ml v borátovom pufri, 0,3 % želatíny). Na detekciu bol použitý roztok substrátu pre HRP (ABTS, 0,3 mg/ml a H_2O_2, 0,01 % kyselina citrónová), naviazanie protilátky bolo kvantitatívne určené z hodnoty O. D. pri 414 nm.

Myšacie a ľudské kódujúce sekvencie *OB* boli PCR amplifikovane z plazmidov obsahujúcich sekvencie *OB* cDNA a subklonované do plazmidov pPIC.9 (Invitrogén). Bol použitý ľudský 5'primér so sekvenciou:

5´GTATCTCTCGAGAAAAGAGTGCCCATCCAAAAAGTCCAAG 3´ (SEQ ID č. 34)

a 3´ primér so sekvenciou

5´GCGCGAATTCTCAGCACCCAGGGCTGAGGTC 3´SEQ ID č. 35).

Ďalej bol použitý myšací 5'primér so sekvenciou:

5´GTATCTCTCGAGAAAAGAGTGCCTATCCAGAAAGTCCAGG 3´ (SEQ ID č. 36)

a 3´ primér so sekvenciou:

5´GCGCGAATTCTCAGCATTCAGGGCTAACATC 3´(SEQ ID č. 37).

Obidva 5'priméry, myšacie aj ľudské, obsahujú *Xho*I miesto na 5'konci a kódujúce sekvencie pre minimálne 4 aminokyseliny signálnej sekvencie α-párovacieho faktora z vektora pPIC.9. Tento vektor smeruje sekréciou heterológovo exprimovaných génov z buniek do kultivačného média. 5'primér tiež obsahuje prvých 19 nukleotidov otvoreného čítacieho rámca *OB* génu nachádzajúceho sa za signálnou sekvenciou štiepneho miesta pred alanínom v polohe 21. 3'primér obsahuje miesto *Eco*RI na 5'konci a za ním hneď nasleduje sekvencia komplementárna k predpokladanému stop kodónu *OB*. Podmienky PCR: denaturácia 1 min. pri 94 °C, anelácia 1 min. pri 55 °C a extenzia 2,5 min. pri 72 °C. Počet mutácií vznikajúcich pri PCR bol obmedzený použitím polymerázy PFU (korekčná polymeráza, Stratagén) a malým počtom cyklov PCR (15). Produkty PCR boli štiepené *Xho*I a *Eco*RI a klonované do rovnako naštiepeného vektora pPIC.9. Všetky konštrukty boli sekvenované na obidvoch vláknach, aby bolo potvrdené, že neobsahujú žiadne PCR mutácie. Klony boli použité na transformáciu *Pichia pastoris* (His) sferoplastovým postupom a selektované v histidín--deficientnom médiu. Približne 200 myšacích a ľudských klonov bolo testovaných na prítomnosť veľkého počtu kópií integrovaných DNA postupom hybridizácie na kolóniách. U klonov s veľkým počtom kópií boli potom testované expresie *OB*, najprv Coomassieho farbením, ktoré prejaví prítomnosť nového proteínu 16 kD v kultivačnom médiu transformovaných kvasiniek. S využitím protilátok napestovaných proti OB exprimovanému v baktériách bolo dokázané, že pás 16 kD je OB. Rekombinantné proteíny boli dvojstupňovo purifikované uvedeným postupom. Bola vykonaná hmotnostná spektrálna analýza a reakcia s brómkyánom, ako je opísané v Beavis *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87: 6873 - 6877 (1990).

Celé kódujúce sekvencie myšacieho aj ľudského génu *OB* na C-konci od signálnej sekvencie boli subklonované do expresného vektora pET15b (Novagén) a exprimované v *E. coli* [BL21(DE3)plYsS] s využitím systému s T7 RNA polymerázou [Studier *et al., Meth. Enzymology,* 185: 80 - 89 (1990)]. Bunky napestované pri 30 °C do absorbancie 0,7 pri 595 nm a indukované cez noc 0,5 mmol.l^{-1} izopropyl-β-D-tiogalakto-pyranozidom boli izolované pomalou centrifugáciou. Bola vykonaná lýza tromi cyklami mrazenia a topenia a digescie DNA DNázouI. Membrány boli sonikované, rozpustené detergentom a peleta bunkových tiel bola rozpustená 6.mol.l^{-1} GdHCl, 20 mmol.l^{-1} HEPES, pH 8,4. Rekombinantné proteíny boli purifikovane v denaturačných podmienkach postupom IMAC na Ni-afinitnej kolóne, elúcia bola vykonaná rastúcou koncentráciou imidazolu. Purifikovaný denaturovaný OB proteín bol uchovaný v 6mol.l^{-1} GdHCl, 10 mmol.l^{-1} octanu sodnom (NaAc), pH 5 a redukovaný 1 mmol.l^{-1} DTT pri laboratórnej teplote, 1 h. Denaturácia bola vykonaná nariedením redukovaného proteínu do 20 % glycerolu, 5 mmol.l^{-1} $CaCl_2$, 5 mmol.l^{-1} NaAc, pH 5, za stáleho miešania a inkubácie pri laboratórnej teplote 8 až 12 h. Po denaturácii bolo adjustované pH na 8,4 pridaním Trisu na 10 mmol.l^{-1} a hexa-histidínový tag bol odštiepený trombínom. Odštiepený a renaturovaný proteín bol prečistený postupom IMAC, produkt bol oddelený od trombínu a nerozštiepeného fúzneho proteínu. Štiepený renaturovaný proteín bol eluovaný z Ni-afinitnej kolóny pri 40 mmol.l^{-1} imidazolu, trombín na kolóne zadržaný nebol a nerozštiepený fúzny proteín bol eluovaný 0,2 mol.l^{-1} imidazolom. Po zahustení sa produkt nechal reagovať s roztokom 100 mmol.l^{-1} EDTA a 10 mmol.l^{-1} kyanoželezitanom draselným a opäť bol purifikovaný gélovou filtráciou na kolóni superdex 75 16/60 (Pharmacia).

Bol uskutočnený Ellmanov test podľa Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.,* 82: 70 - 77 (1959). Ellmanove činidlo bolo pripravené rozpustením 39,6g 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoovej) kyseliny (DNTB) v 10 ml 0,05 mol.l^{-1} fosfátového pufra, pH 8. Bola konštruovaná kalibračná krivka v koncentračnom rozmedzí 10 až 120 mmol.l^{-1} voľného sulfhydrylu (z 1 mmol.l^{-1} zásobného roztoku redukovaného DTT) pri 412 nm. Každý test bol vyko-

naný s 0,2 ml Ellmanovho činidla a celým 0,5 ml množstvom reakčnej zmesi. Pre voľnú sulfhydrolovú skupinu bol určený extinkčný koeficient 12 974 mol^{-1} cm^{-1} (korelačný koeficient 0,99987), čo v rámci 5 % súhlasí so skôr publikovanou hodnotou 13 600 mol^{-1} cm^{-1}.

Ellmanov test bol uskutočnený s 50 ml 2 mg/ml čistého gélovo filtrovaného proteínu, čo zodpovedá možnej koncentrácii voľných sulfhydrylových skupín 24 $mmol.l^{-1}$ v reakčnej zmesi. Výsledný roztok mal hodnotu A_{412} z 0,02 čo znamená, že proteín obsahuje dva cysteínové zvyšky v oxidovanom stave ako cystín, alebo že cysteínové voľné sulfhydrylové skupiny sú celkom neprístupné ukryté v jadre priestorovo usporiadaného proteínu. Rovnaké výsledky boli získané z Ellmanovho testu na neusporiadanom proteíne v 6 $mol.l^{-1}$ GdHCl.

Myši boli jednotlivo umiestnené do klietok v nepatogénnom prostredí a aklimatizované na diétu obsahujúcu 35 % (obj/obj) Laboratory Rodent Diet 5001 (PMP Feeds, Inc,.), 5,9 % (obj/obj) zmesi tapiokového krému (general Foods) a 59,1 % vody s energetickým obsahom 1,3 kcal/g. Diéta bola sterilizovaná autoklávom a balená do 60 mm plastikových misiek, ktoré boli upevnené na vŕšky 100 mm Petriho misiek. Vplyvom tapioky získala potrava pastovitú konzistenciu, takže ju zvieratá nemohli roznášať po klietke. Zo 100 mm viečok bolo možné odobrať späť aj malé množstvo rozsypanej potravy. Každé ráno dostávali zvieratá čerstvú potravu a zvyšky potravy z minulého dňa boli odohrané a vážené. Hmotnostné rozdiely poskytli mieru denného príjmu potravy. Účinky rekombinantného proteínu na príjem potravy a telesnú hmotnosť boli testované, na troch myšacích kmeňoch: C57B1/6J *OB/OB,* C57 B1/Ks *DB/DB* a CBA/J +/+ z Jacksonovho laboratória. 30 myší z každého kmeňa bolo rozdelených do skupín po desať. Prvá skupina z každého kmeňa dostávala denne intraperitoneálnu (i. p.) injekciu bakteriálneho OB proteínu v správnom priestorovom usporiadaní v dávke 5 mg/g/deň v 300 *ul* PBS. Druhá skupina z každého kmeňa, kontrolná, dostávala denne intraperitoneálnu (i. p.) injekciu rovnakého objemu PBS. PBS pochádzal z dialyzátu rekombinantného OB proteínu. Z PBS bol odstránený endotoxín na kolóni Acticlean ETOX. Tretie skupiny zvierat nedostávali žiadne injekcie. Počas 3,5 týždňov bol denne zaznamenávaný príjem potravy a telesná hmotnosť. Pre párový experiment príjmu potravy bola zvláštna skupina *OB* myší kŕmená rovnakým množstvom potravy ako prijímala skupina *OB* myší s aplikovaným proteínom.

Výsledky

OB proteín cirkulujúci v myšacej, krysej a ľudskej plazme

Ľudský OB proteín bol pripravený s využitím pET 15b bakteriálneho expresného vektora (Novagén) naklonovaného do *Pichia pastoris* v kvasinkovom expresnom systéme, ktorý smeruje sekréciu rekombinantného proteínu priamo do kultivačného média. OB proteín exprimovaný v kvasinkách obsahuje 146 aminokyselín C-koncových k signálnej sekvencii. Králiky boli imunizované bakteriálnym proteínom (HRP, Inc.). Protilátky boli imunopurifikovane (Research Genetics) a použité na imunoprecipitáciu a westernové blotovanie proteínu z plazmy a adipózneho tkaniva.

Podľa SDS-PAGE migruje OB proteín z myšacej plazmy s molekulovou hmotnosťou 16 kD. Má rovnakú elektroforetickú pohyblivosť ako rekombinantný OB proteín sekrétovaný kvasinkami po odštiepení signálnej sekvencie (obr. 24A). Proteín nebol detegovaný v plazme C57B1/6J *OB/OB* myší, u ktorých bola v kodóne 105 vynájdená nonsence mutácia. Skrátený 105 zvyšok polypeptidického raťazca predpovedaného podľa sekvencie cDNA sa ani využitím niekoľkých rôznych antisér nepodarilo určiť.

Desaťnásobný vzrast hladiny cirkulujúceho proteínu oproti kontrolným zvieratám bol pozorovaný u *DB/DB* myší (obr. 24 A). Imunoprecipitácia plazmy z krýs divokého typu a krýs *FA/FA* odhalila dvadsaťnásobný vzrast hladiny OB proteínu v mutácii oproti divokému typu (obr. 24 b). Mutácia *DB* vedie k obéznemu fenotypu ako myšacia mutácia *OB* [Bahary *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87: 8642 - 8646 (1990)]. Tlsté krysy sú obézne následkom recesívnej mutácie v géne homológovom ku *DB* [Truett *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 88: 7806 - 7809 (1991)]. So zámerom kvantifikovať hladinu OB v myšacej plazme boli k séru pridávané rastúce množstvá rekombinantného proteínu a vykonané imunoprecipitácie. S rastúcim množstvom rekombinantného proteínu bol pozorovaný lineárny rast intenzity signálov na westernovom blote. Porovnanie intenzít prirodzeného proteínu v myšacej plazme a štandardov naznačilo, že cirkulačná hladina OB proteínu v myšiach divokého typu je približne 20 ng/ml. Imunoprecipitácia a westernové blotovanie boli teda vykonané v podmienkach s prebytkom protilátky. Vyššie hladiny OB proteínu sa dajú tiež pozorovať v proteínových extraktoch z adipóznych tkanív myší *DB/DB* proti kontrolám (obr. 24 D). Sekretorický proteín bol podľa predpokladu súčasťou surovej membránovej frakcie (údaje nie sú uvedené).

Vzorky plazmy odobraté od šiestich štíhlych ľudí s indexom telesnej hmotnosti MBI < 25 (BMI = hmotnosť/výška) boli imunoprecipitované s imunopurifikovanými protilátkami proti ľudskému proteínu. Imunoprecipitovaný materiál migroval na elektroforéze s ľudským proteínom 146 aminokyselín, ktorý bol pripravený expresiou v kvasinkách. Intenzita signálov sa v šiestich študovaných vzorkách výrazne líšila. Z denzitometrickej analýzy autorádiografu vyplynul až päťnásobný rozdiel v hladinách proteínu medzi HP1a HP6, hladiny u ostatných subjektov sa pohybovali uprostred. Bol vypracovaný test ELISA s využitím imunopurifikovanej protilátky a bakteriálnym proteínom v správnom priestorovom usporiadaní ako štandardom (pozri neskôr). Výsledná štandardná krivka je uvedená na obr. 25 B. Pomocou tohto testu bolo určené, že hladiny

OB proteínu u šiestich testovaných ľudí sa líšili v rozmedzí 2 až 15 ng/ml (obr. 25 C). Hladina OB proteínu v plazme HP6 s hodnotou ≥ 15 ng/ml presiahla lineárnu limitnú hranicu (obr. 25 C). Uvedené kvantitatívne rozdiely korelujú s rozdielmi v intenzitách signálov na westernových blotoch.

Z predbežných údajov vyplýva, že leptín môže cirkulovať aspoň čiastočne ako komplex s iným proteínom alebo niekoľkými proteínmi. Tento záver vychádza z heterogénneho tvaru titračnej krivky pre sérum v porovnaní s krivkou pre rekombinantný štandard. Analýza veľkého množstva leptínu imunopurifikovaného gélovo filtračnou HPCL na kolóni s naviazanými králičími anti-OB protilátkami v denaturujúcich a nedenaturujúcich podmienkach a monitorovaním postupom ELISA a SDS-PAGE naznačili, že sa OB polypeptid správa rovnako ako vysokomolekulárny komplex. Tieto údaje však majú len predbežný charakter, lebo proteín ktorý viaže OB, pokiaľ vôbec taký existuje, je potrebné najprv charakterizovať.

Štruktúrne rysy OB proteínu

Dva cysteínové zvyjsky v OB proteíne môžu v oxidačných podmienkach *in vivo* vytvárať intra- alebo intermolekulárne disulfidické mostíky. Westernové blotovanie bolo opakovane uskutočnené v prítomnosti i neprítomnosti redukčného činidla v pufri testovanej vzorky. V obidvoch prípadoch OB proteín ľudského séra migroval ako monomér (údaje nie sú uvedené). V neredukujúcich podmienkach proteín imunoprecipitovaný z *DB* myšacieho séra bol detekovaný s monomérom 16 kD a dimérom 32 kD (obr. 26 A). V redukčných vysokomolekulárna látka zmizla, čo znamená, že určitá časť myšacieho OB cirkuluje ako vysokomolekulárna látka viazaná intermolekulárnym disulfidickým mostíkom. Približne 80 % myšacieho OB cirkuluje ako proteín 16 kD a 20 % ako forma 32 kD.

Rovnaké molekulárne formy vznikajú pri expresii myšacieho a ľudského proteínu v *Pichia pastoris* [Abrams *et al., Immunol. Rev.,*: 5 - 24 (1992)]°. V týchto štúdiách boli klonované sekvencie DNA zodpovedajúce 146 aminokyselinám maturovaného OB proteínu v smere od kvasinkovej signálnej sekvencie α-párovacieho faktora do vektora pPIC.9 (Invitrogén). OB proteín bol purifikovaný z kvasinkového kultivačného média kmeňov exprimujúcich myšací a ľudský proteín a rozdelený elektroforézou v redukujúcich a neredukujúcich podmienkach (obr. 26 A). Myšací proteín bol v kvasinkách exprimovaný v neredukujúcich podmienkach prevažne ako dimér, v prítomnosti redukčného činidla len ako monomér. Rekombinantný ľudský proteín migroval do polohy monoméru v oboch prípadoch (údaje nie sú uvedené).

Podľa hmotnostnej spektroskopickej analýzy mal purifikovaný ľudský proteín exprimovaný v *Pichia* molekulovú hmotnosť 16 024± Da [Beavis *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87: 6873 - 6877 (1990)]. Táto hodnota je v súlade s molekulovou hmotnosťou aminokyselinovej sekvencie proteínu s intramolekulárnym disulfidickým mostíkom (16 024 Da). Laserová desorpčná hmotnostná spektroskopická analýza produktov brómkyánového štiepenia proteínu naznačuje, že cysteíny 117 a 167 sú spojené intramolekulárnym disulfidickým mostíkom (obr. 26 B). Bromkyán štiepi proteíny od C-konca v mieste metionínu.

Príprava a charakterizácia bioaktívneho rekombinantného proteínu

Myšací OB bol exprimovaný v *E. coli* z plazmidu pET 15b ako nerozpustný fúzny proteín obsahujúci 20 aminokyselín a N-koncový hexa-histidínový tag so štiepnym miestom pre trombín. Bakteriálne bunkové telá boli rozpustené guanidín hydrochloridom a purifikované v denaturujúcich podmienkach afinitnou chromatografiou na nosiči s imobilizovaným kovom (IMAC) (obr. 27). Purifikovaný denaturovaný fúzny proteín bol redukovaný, zriedený a ponechaný vo vodnom roztoku pri laboratórnej teplote aby vzniklo správne priestorové usporiadanie. Po trombínovom štiepení bol renaturovaný myšací OB proteín obsahujúci štyri dodatočné N-koncové zvyšky (Gly-Ser-His-Met; SEQ ID č. 38) opäť purifikovaný postupom IMAC na 98 % homogenite, podľa SDS-PAGE a hmotnostnej spektroskopickej analýzy. Laserová desorpčná hmotnostná spektroskopická analýza na matrici určila molekulovú hmotnosť 16 414± Da (vypočítaná hodnota = 16 415 Da). Na obidvoch SDS-PAGE géloch, redukujúcim aj neredukujúcim, bola zjavná jednotná látka s molekulovou hmotnosťou 16 kD (údaje neoverené).

Na detektore molekulovej hmotnosti typ DP801 (Proteín Solutions, Inc.), ktorý využíva dynamický rozptyl svetla, bolo zistené, že renaturovaný myšací OB proteín bol prevažne monomérový a obsahoval niekoľko agregátov vyššej rady. Proteín sa nechal reagovať s EDTA a bol chemicky oxidovaný.

Vysokomolekulárne proteíny boli potom odstránené gélovou filtráciou. Ďalší dynamický rozptyl svetla potvrdil, že purifikovaný, renaturovaný rekombinantný myšací OB proteín je monodisperzný. Po dialýze proti fyziologickému roztoku pufrovanému fosfátom (PBS) bol odstránený bakteriálny entodoxín na kolóni Acticlean ETOX (Sterogén Bioseparations, Inc). Výsledný výťažok proteínu bol bol 45 mg/l.

Na purifikovanom renaturovanom rekombinantnom myšacom OB proteíne bol Ellmanovým testom určený oxidačný stav [Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.,* 82: 70 - 77 (1959)]. V renaturovanom proteíne aj v proteíne, ktorý sa nechal reagovať so 6 $mol.l^{-1}$ GdHCl, bol určený obsah voľných sulfhydrylových skupín < 0,5 %, čo znamená, že monomérový produkt obsahuje intramolekulárny disulfidický mostík (obr. 26 B). Tento výsledok bol potvrdený aj hmotnostnou spektroskopickou analýzou produktov brómkyanového štiepenia správne priestorové usporiadaného bakteriálneho proteínu (údaje neuvedené).

Bioaktivita OB proteínu

Purifikovaný rekombinantný myšací OB proteín bol podávaný intraperitoneálnou injekciou denne v množstve 5 mg/kg/deň skupinám s desiatimi myšacími typmi C57Bl/6J *OB/OB* (vek 16 týždňov), C57 Bl/Ks *DB/DB* (vek 12 týždňov) a CBA/j +/+ (vek 8 týždňov). Rovnakému počtu zvierat bol denne injekčne podávaný PBS. PBS pre kontrolné injekcie pochádzal z dialyzátu po ekvilibrácii proteínu. Desať ďalších zvierat z každého kmeňa nedostávalo žiadne injekcie. U jednotlivých zvierat bol monitorovaný denný príjem potravy a v troj- až štvordenných intervaloch zaznamenávaná hmotnosť. Súhrnné výsledky príjmu potravy a telesnej hmotnosti pre každú z deviatich skupín zvierat sú uvedené na obr. 28 A až F, štatistický význam týchto údajov je uvedený v tabuľke 1. Príjem potravy u C57Bl/6J *OB/OB* myší, ktoré dostávali injekčne proteín, sa výrazne znížil po prvej injekcii a stále sa znižoval až do piateho piateho dňa. Potom sa príjem potravy ustálil na 40 % príjmu potravy zvierat, ktoré injekčne dostávali PBS ($p<0,001$). Myši, ktoré dostávali placebo, v priebehu trojtýždňového testu nestrácali hmotnosť. U C57Bl/6J *OB/OB* myší liečených proteínom došlo k 10 % úbytku telesnej hmotnosti po 5 dňoch ($p<0,001$). V priebehu trojtýždenného testu tieto *OB* zvieratá ďalej strácali hmotnosť priemerne až na 60 % vzhľadom na východiskovú telesnú hmotnosť (<0,0001). Zvláštna skupina zvierat bola kŕmená párovo, teda rovnakým množstvom potravy aké prijímali *OB* myši liečené proteínom. Údaje na obr. 29 B ukazujú, že u párovo kŕmených myší došlo k významne nižšiemu úbytku hmotnosti ako u zvierat liečených rekombinantným proteínom ($p<0,02$). Na fotografii dvoch myší injekčne liečených buď proteínom alebo len PBS je zjavný podstatne odlišný vzhľad myši liečenej proteínom (obr. 29 B). Ďalšie účinky proteínu boli zisťované na pitvách dvoch myší z každej pokusnej skupiny. Celková prehliadka *OB* myši liečenej proteínom preukázala dramatické zníženie obsahu telesného tuku i veľkosti pečene. Hmotnosť pečene u *DB* a divokých myší zostala pri proteínovej liečbe nezmenená. Pečeň *OB* myší liečených injekčné len PBS vážila 5,04 a 5,02 g oproti hodnotám 2,23 a 2,03 g u pečene *OB* myší liečených rekombinantným proteínom. Na rozdiel od bledých tučných pečení *OB* myší získala pečeň OB myší liečených proteínom tmavšiu farbu charakteristickú pre zdravú pečeň (obr. 29 c). Z histologického vyšetrenia pečene vyplynulo, že tučné pečene neliečených zvierat boli vplyvom proteínovej liečby podstatne zlepšené (údaje neuvedené).

Na rozdiel od myší *OB* typu neboli pozorované žiadne významnejšie rozdiely v telesnej hmotnosti alebo príjme potravy u myšacích typov C57Bl/Ks *DB/DB* liečených proteínom proti kontrolnej skupine dostávajúcej len nosič (obr. 28 A až F), tabuľka 1). Vo všetkých troch skupinách *DB/DB* myší došlo v priebehu pokusného obdobia k úbytku hmotnosti o 2 až 5 g. Bola meraná priemerná hodnota glukózy v krvi *DB/DB* myší glukometrom a u všetkých myší určená hodnota > 500 mg/dl, čo naznačuje, že u myší došlo vedľa obezity k sekundárnemu rozvoju diabetes. Injekcie myšiam *OB/OB* boli po dvoch týždňoch prerušené.

U divokých myší bolo pozorované malé, ale významné zníženie telesnej hmotnosti po podaní rekombinantného proteínu (obr. 28 A až F, tabuľka 1). Po piatich dňoch proteínovej liečby došlo u liečených myší k priemernému úbytku hmotnosti 0,5 g, u neliečených myší došlo k prírastku 0,4 g ($p<0,02$). Pri dvoch ďalších nasledujúcich kontrolách vážili zvieratá liečené proteínom zreteľne menej než zvieratá dostávajúce denne len injekcie PBS. Rozdiel v telesných hmotnostiach sa však postupom času zmenšoval. U zvierat s úbytkom hmotnosti nedochádzalo k podstatnejšiemu rozdielu v príjme potravy oproti neliečenej skupine. Injekcie PBS mali malý, ale významný vplyv na príjem potravy a telesnú hmotnosť u *OB, DB* i divokých myší oproti skupinám, ktoré nedostávali žiadne injekcie ($p<0,5$).

Tabuľka 1

		ZMENA HMOTNOSTI				
skupina zvierat	typ liečby	počet dní	n	stred	štd. chyba	p
OB/OB	proteín	1–5	10	−6,38000000	0,47628190	<0,001
	nosič		9	−0,14444444	0,24444444	
	proteín	1–12	10	−14,45000000	0,70793126	<0,001
	nosič		9	0,98888889	0,38058597	
	proteín	1–27	6	−24,28333333	0,69924563	<0,000
	nosič		5	4,30000000	0,79874902	
DB/DB	proteín	1–5	10	−1,47000000	0,36939891	0,240
	nosič		10	−2,00000000	0,23142073	
	proteín	1–12	10	−3,75000000	0,77348418	0,610
	nosič		10	−4,19000000	0,34655447	
CBA/J	proteín	1–5	10	−0,48000000	0,17876117	0,006
	nosič		10	0,38000000	0,21489015	
	proteín	1–12	10	0,12000000	0,45748103	0,015
	nosič		10	1,20000000	0,18378732	
	proteín	1–27	5	1,98000000	0,48723711	<0,651
	nosič		6	2,23333333	0,20763215	

Diskusia

Endokrinná funkcia proteínového produktu *OB* lokusu bola prvýkrát navrhnutá Colemanom, ktorý ukázal, že u *OB/OB* myší došlo ku zníženiu telesnej hmotnosti vplyvom parabiotického spojenia s normálnym alebo *DB* typom myší [Coleman *et al., Diabetologia,* 14: 141 - 148 (1978)]. Uvedené výsledky podporujú túto hypotézu lebo dokazujú, že PB proteín cirkuluje v krvnom obehu a že injekcia rekombinantného proteínu spôsobuje úbytok telesnej hmotnosti. Molekulová hmotnosť produktu kódovaného *OB* génom je 16 kD, čo zodpovedá 146 aminokyselinovej sekvencii carboxy-terminálnej k signálnej sekvencií. Rekombinantný OB proteín nie je modifikovaný pri expresii v *Pichia pastoris.* Expresia cicavčích génov v *Pichia* obvykle vedie k tvorbe správnej štruktúry proteínu [Cregg *et al., Bio/Technology,* 11: 905 - 914 (1993)]. Tieto zistenia naznačujú, že OB proteín nie je *in vivo* glykozylovaný ani posttranslačne spracovávaný. Údaje nevylučujú možnosť, že je OB proteín nekovalentne viazaný sám k sebe alebo iným proteínom, prítomným v plazme alebo adipóznom tkanive. Aj keď nie možné vylúčiť proteolýzu OB proteínu, neboli detegované nizkomolekulové formy OB žiadnym použitým antisérom vrátane štyroch anti-peptidových proti látok.

OB proteín, obsahujúci dva cysteínové zvyšky, cirkuluje u človeka ako monomér a u myší ako monomér aj dimér. Intramolekulový disulfidový mostík, typický pre sekretorické molekuly, sa našiel v ľudskom proteíne, exprimovanom v *Pichia pastoris,* čo naznačuje, že je pravdepodobne prítomný i v proteíne *in vivo.* Tomu zodpovedá aj bioaktivita rekombinantného bakteriálneho proteínu s intramolekulovým disulfidovým mostíkom. V myšej plazme sa OB proteín vyskytuje ako monomér aj dimér. Obidve tieto formy sa môžu nájsť pri expresii myšieho OB v kvasinkách. Sklon myšieho OB proteínu vytvárať dimér je pravdepodobne dôsledkom odlišností v primárnej sekvencií proti ľudskému OB. Bioaktivita monoméru je zrejmá, funkčná aktivita diméru nie je zatiaľ známa.

Účinok OB proteínov na príjem potravy a telesnú hmotnosť *OB* myší je dramatický. Po trojtýždňovom liečení nastalo u OB myší, liečených dennými injekciami rekombinantného proteínu, ku 40 % úbytku telesnej hmotnosti a 40 % príjmu potravy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Pritom v čase skončenia pokusu ešte nedošlo k stabilizácii hmotnosti liečených *OB* myší. Pokus s párovo kŕmenými zvieratami naznačil, že úbytok hmotnosti je súhrnom zníženého príjmu potravy a výdaja energie. U párovo kŕmenej skupiny *OB* myší totiž došlo k podstatne nižšiemu úbytku hmotnosti oproti liečenej skupine. Zníženie príjmu potravy u *OB/OB* myši na nižšiu úroveň ako u myší divokého typu naznačuje, že *OB* myši sú na účinok OB obzvlášť citlivé. OB receptor týchto zvierat môže byť skutočne aktívnejší. Príjem potravy *OB* myší sa po piatich dňoch liečenia relatívne stabilizoval. Pokiaľ je tento jav výsledkom dosiahnutia rovnovážnej hladiny OB proteínu, dá sa predpokladať, že proteín má relatívne dlhý polčas *[The Pharmacological Basis o f the Therapeutics,* str. 19 až 45, Goodman a Gilman, vyd. Pergamon Press, New York (1990)]. Tento záver je v súlade s výsledkami parabiotických experimentov [Coleman *et* al., *Diabetolgia,* 14: 141 - 148 (1978), Weigle, *In. J. Obesity,* 12: 567 - 578 (1988)].

Účinky rekombinantného proteínu na telesnú hmotnosť myšieho divokého typu boli malé, ale štatisticky významné počas prvých dvoch týždňov experimentu. Zatiaľ čo rozdiel v hmotnostiach medzi skupinami divokých myší, liečených a neliečených proteínom, pretrvával, štatistický význam týchto údajov po troch týždňoch veľmi klesol. Počiatočná strata hmotnosti nemohla byť vyvolaná rozdielnym príjmom potravy. Meranie príjmu potravy pravdepodobne nebolo dostatočne presné, aby mohlo zaznamenať hmotnostné rozdiely v rozmedzí 1 g počas liečenia. Tieto pozorovania sa odlišujú od výsledkov starších experimentov, v ktorých boli hlodavci divokého typu parabioticky spojené s myšami *DB,* krysami *FA,* krysami s hypotalamickými léziami a krysami, ktorých obezita bola vyvolaná vysokokalorickou diétou [Coleman *et al., Diabetológia,* 14: 141 - 148 (1978); Harris *et al., Int. J. Obes.,* 11: 275 - 283 (1987); Harris *et al.,* „Physiological and metabolic changes in prabiotic partners of obse rats" v *Hormones, Thermogenesis and Obesity,* Lardy a Straatmen, vyd., Elsevier Science Publishing Co., New York (1989); Hervey, *J. Physiol.,* 145: 336 - 352 (1959)]. Vo všetkých prípadoch došlo u divokých zvierat k anorexii a veľkému úbytku hmotnosti. Pretože vzrástli hladiny OB proteínu u *DB* myší, *FA* krýs a vzrástla hladina *OB* RNA v myšiach s hypotalamickými léziami, je pravdepodbné, že myši divokého typu sú schopné odpovedať na OB polypeptid, ak cirkuluje v plazme v dostatočne vysokom množstve. Predkladané zistenia podporujú možnosť, že proteín bol podávaný v množstve pod endogénnou hladinou a viedol k rovnovážnemu stavu pri o niečo nižšej telesnej hmotnosti. Tento problém vyrieši kvantifikácia cirkulačných hladín OB proteinu u liečených myší. Napriek tomu, že imunoesej myšieho proteínu ešte nie je k dispozícii, výsledky imunoprecipitácie naznačujú, že cirkulačné hladiny OB proteínu neboli u divokých myší, liečených proteínom, podstatne zvýšené.

Z menšieho účinku proteínu na myši divokého typu a žiadnej reakcie DB myší je možné predpokladať, že liečenie pravdepodobne nie je špecifické alebo spôsobujúce iba nechutenstvo. U všetkých *DB* myší nastal počas pokusu malý úbytok hmotnosti, nezávisle od toho, či dostávali OB proteín alebo nie. Zvieratá *DB* boli výrazne hyperglykemické a úbytok hmotnosti nastal zrejme vplyvom diabetes a nie vďaka experimentu. U myší C57B1/Ks *DB/DB* dochádza často k rozvoju diabetes a úbytku hmotnosti v starobe, keď sa tiež použili v tejto štúdii [Coleman *et al., Diabetologia,* 14: 141 - 148 (1978)]. U myší C57B1/6J *OB/OB* rovnakého veku nedochádza k podstatnejšiemu rozvoju hyperglykémie. Tieto fenotypové rozdiely sú pravdepodobne výsled-

kom genetických odlišností mutantných kmeňov (C57B1/6J vs. C57B1/Ks) [Coleman *et al., Diabetologia,* 14: 141 - 148 (1978)].

Neúspech v detekcii skráteného proteínu dlhého 105 aminokyselín, predpovedaného zo sekvencie cDNA *OB* génu v myšiach C57B1/6J *OB/OB* naznačuje, že mutantný proteín je buď degradovaný, alebo vôbec nie je translatovaný. Nedá sa vylúčiť ani možnosť, že použité antiséra nie sú vhodné na detekciu tohto skráteného proteínu. Pozorovaný desaťnásobný nárast hladiny OB proteínu u *DB* myší oproti divokému typu naznačuje, že pri odolnosti proti účinkom OB proteínu dochádza k jeho nadprodukcii. Tieto údaje korelujú so štúdiami *OB* mRNA. Z predchádzajúcich experimentov vyplýva, že mutácie *DB* myšieho a *FA* krysieho génu, lokalizované v homológnych chromozonálnych oblastiach, vedú k nadprodukcii plazmatického faktora, potláčajúceho telesnú hmotnosť. [Truett *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 88: 7806 - 7809 (1991); Coleman *et al., Diabetologia,* 14: 141 - 148 (1978); Hervey, J. *Physiol.,* 145: 336 - 352 (1959)]. V obidvoch prípadoch sú mutantné zvieratá pravdepodobne odolné proti OB proteínu. Tento záver podporuje aj fakt, že OB proteín nemá žiaden vplyv na telesnú hmotnosť alebo príjem potravy u *DB* myší.

Ľudská obezita môže súvisieť so zvýšenými hladinami OB proteínu v plazme u jedincov, ktorí relatívne nereagujú na hormón. Na druhej strane znížená expresia OB môže tiež vyvolávať obezitu, pritom však môžu byť namerané „normálne" (t. j. neprimerane nízke) hladiny proteínu. Plazmatické hladiny OB proteínu sú tiež známkou rôznych foriem obezity. U malej skupiny štíhlych jedincov s BMI < 25 je možné detegovať (testom ELISA) nízke nanogramové hladiny cirkulačného OB proteínu. Je podstatné, že boli zaznamenané rôzne koncentrácie OB, naznačujúce, že expresná hladina a/alebo citlivosť proti proteínu hrá významnú úlohu, určujúcu telesnú hmotnosť.

Miesto účinku OB proteínu nie je doteraz známe. Protein ovplyvňuje príjem potravy a výdaj energie. To je zistenie, zodpovedajúce klinickým štúdiám, podľa ktorých zmeny v obidvoch systémoch ovplyvňujú telesnú hmotnosť [Leibel, *et al. N. Engl. J. Med.*, 332: 621 - 628 (1995); Kessey *et al.*„Metabolic defence of the body weight set-point" v *Association for Research in Nervous and Mental Disease,* str. 87 - 96 Stunkard a Stellar, vyd. Raven Press, New York (1984)]. Hypotalamus je pravdepodobne v hierarchii ciest, regulujúcich telesnú hmotnosť až za OB, aj keď ani priame pôsobenie rôznych orgánov sa nedá vylúčiť.

Príklad 9:

Zvýšená expresia *OB* RNA v adipocytoch myší s hypotalamickými léziami a mutáciami v *DB* lokuse

Produkt nedávno klonovaného myšacieho génu obezity *(OB)* má dôležitú úlohu v regulácii adipóznej tkanivovej hmoty. *OB* RNA je *in vivo* exprimovaná špecificky v myšacích adipocytoch, v každom z niekoľkých rôznych tukových bunkových depotoch včítane hnedého tuku. *OB* RNA je rovnako exprimovaná nekultivovanými preadipocytárnymi bunkami 3T3-442A, v ktorých bola indukovaná diferenciácia. V adipóznom tkanive myší s hypotalamickými léziami aj myší s mutáciami v *DB* lokuse dochádza k dvadsaťnásobne vyššej expresii *OB* RNA. Z toho vyplýva, že *DB* gén i hypotalamus sú v hierarchii ciest regulujúcich adipóznu tkanivovú hmotu až za *OB* génom a že lokus kóduje OB receptor ako naznačujú predbežné experimenty. U *DB/DB* myší a myší s léziami kvantitatívne korelujú rozdiely v expresnej hladine *OB* RNA s obsahom tukov v adipocytoch. Molekuly regulujúce expresnú hladinu *OB* génu v adipocytoch pravdepdobne určujú telesnú hmotnosť, podobne ako molekuly, ktoré sprostredkovávajú účinok OB do cieľového miesta.

Materiály a postupy

Hybridizácia in situ

Biele tukové tkanivo z identických abdomínálnych oblastí divokých (wt) a *DB* myší boli súbežne spracované podľa postupu Richardson *et al., Growth, Development & Aging-,* 56: 149 - 157 (1992). Stručne, tkanivá boli fixované v Bouinovom roztoku, 2 h, 4 °C. Potom boli dehydrované radom postupných inkubácií s etanolom s rastúcou koncentráciou z 10 na 100 % hmotn., každá inkubácia trvala 5 min. pri teplote 4 °C. Ďalej boli tkanivá inkubované s xylénom (1 h) a parafínom (2 h) pri 65 °C. Zafixované wt aj *DB/DB* tukového tkaniva boli narezané a adjustované v podmienkach, ako je uvedené ďalej. Rezy boli sušené pri 65 °C 1 h a inkubované s xylénom a ďalej postupne s etanolom s klesajúcou koncentráciou od 100 do 50 % hmotn., každá inkubácia trvala 3 min. pri laboratórnej teplote. Antisensia RNA próba *OB* génu bola syntetizovaná *in vitro,* transkripciou linearizovanej kódujúcej sekvencie *OB* génu v protismere od Sp6 RNA polymerázového promótora. Hybridizácia *in situ* bola uskutočnená presne podľa Schaeren-Wiemera, *et al., Histochemistry,* 100: 431 - 440 (1993).

Preparácia RNA a bunková kultúra

Totálna RNA a northernové bloty boli pripravené podľa opisu. Stromatické cievne bunky a adipocyty boli pripravené podľa Rodbella a RNA z obidvoch frakcií bola pripravená podľa Dani *et al., Mol Cell. Endocrinol.,* 63: 199 - 208 (1989); Rodbell, *J. Biol. Chem.* 239: 375 - 380 (19). Po subklonovaní boli bunky 3T3-F442 napestované v Dulbeccovej modifikácii Eagleovho média s obsahom 10 % fetálneho hovädzieho séra

(definovaného ako štandardné médium) [DAni *et al.*, „Molekular biology techniques in the study of adipocyte differentiation", v *Obesity in Europe,* diel 88, str. 371 - 376, Bjorntorp a Rossner, vyd., John Libbey Company Ltd., London England(1989)]. Konfluentné bunky sa nechali reagovať v štandardnom médiu doplnenom 2 nmol.l^{-1} trijódtyronínom (T3) a 17 nmol.l^{-1} inzulínom. Po dvanástich dňoch bola pripravená RNA ako je uvedené.

Aplikácia aurotiogrlukózy (GTG)

Dvojmesačným myšacím samičkám CBA/J bola aplikovaná jednorazovo intraperitoneálna injekcia aurotioglukózy (Sigma Catalog. No. A0632) v dávke 0,2 mg/g v normálnom fyziologickom roztoku. Kontrolné zvieratá dostali injekciu normálneho fyziologického roztoku. Jeden mesiac po aplikácii boli myši zvážené. Z adipózneho tkaniva zvierat, ich hmotnosť po aplikácii GTG vzrástla o viac než 20 g, bola izolovaná RNA.

Výsledky

Nedávno bolo zistené že *OB* gén je exprimovaný v adipóznom tkanive [Zhang *et al., Nature,* 372: 425 až 432 (1994)]. Vzhľadom na to, že adipózne tkanivo je tvorené rôznymi typmi buniek, ako sú adipocyty, preadipocyty, fibroblasty a cievne bunky, bola vykonaná hybridizácia *in situ* na tkanivových rezoch epididymálnych tukových zásob normálnych zvierat s použitím sense a antisense *OB* RNA prób [Richardson *et al., Growth, Development & Aging,* 56: 149 - 157 (1992); Vasserman, „*The concept of the fat organ*" *v Rdahl, Issekutz, fat as a tissue,* str. 22 - 92 McGraw Hill, New York (1964)]. U antisense prób boli detegované pozitívne signály vo všetkých adipocytoch tkanivového rezu (obr. 30 - značené Wt). Signály neboli zaznamenané pri hybridizácii antisense próby v mozgovom tkanivovom reze (údaje neuvedené). Hybridizácia antisense próby ku tkanivovým rezom adipózneho tkaniva myší C57Bl/ks boli podstatne vyššie, čo zodpovedá špecifiku expresie *OB* RNA v adipocytoch a tiež výraznému vzrastu hladiny *OB* RNA v adipocytoch týchto zvierat (obr. 30 - značené *DB/DB*). Výrazná obezita myší s mutáciami v *DB* lokuse je súčasťou syndrómu, ktorý je fenotypovo identický so syndrómom pozorovaným u myší C57B1/6J *OB/OB* [Bahary *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87: 8642 - 8642 (1990)].

OB RNA nebola syntetizované v adipóznom tkanive stromatických buniek, z ktorých boli odstránené adipocyty. Podľa northernových blotov bunky adipocytovej frakcie podľa očakávania exprimovali *OB* RNA (obr. 31). K rovnakému výsledku viedol aj test RT-PCR (údaje neuvedené). Tieto údaje dokazujú, že expresia *OB* génu prebieha výhradne v adipocytoch. Údaje z nakultivovaných adipocytov tento záver rovnako potvrdzujú. Pri týchto štúdiách boli kultivované bunky 3T3-F442A v podmienkach vedúcich k akumulácii tukov v rámci bunkovej diferenciácie na adipocyty. K expresii *OB* RNA nedochádzalo ani v exponenciálne rastúcich bunkách, ani v konfluentných 3T3-F442A preadipocytárnych bunkách, kde prebiehala expresia včasných markerov. Až po diferenciácii na adipocytoch nastala expresia detegovateľných hladín *OB* RNA (obr. 31) [Dani *et al., J. Biol. Chem.*, 264: 10119 - 10125 (1989)]. Expresná hladina *OB* RNA je mimoriadne citlivá na kultivačné podmienky, expresia OB nebola zistená v starších, post-konfluenčných bunkách, ktoré neboli vystavené pôsobeniu inzulínu.

Hybridizačné štúdie dokázali, že k expresii *OB* RNA *in vivo* dochádza v rade rôznych tukových depotov včítane epidimálneho, parametriálneho, abdominálneho, perinerálneho a ingvinálneho (obr. 32 A). Expresné hladiny v jednotlivých depotoch boli premenlivé, v ingvinálnom a parametriálnom nižšie. Expresia *OB* RNA prebieha rovnako v hnedom adipóznom tkanive aj keď expresná hladina je asi 50x nižšia než v ostatných tkanivových depotoch. Tieto kvantitatívne rozdiely tesne korelujú so skôr opísanými rozdielmi medzi veľkosťami buniek rôznych tukových depotov [Johnson *et al., J. Lipid res.,* 13: 2 - 11 (1972)]. Množstvo *OB* RNA v hnedom tuku nie je ovplyvnené chladom (obr. 32 B). Experimentálne bolo zistené, že vplyvom chladu vzrastá hladina nepárujúcej proteínovej RNA (UCP) v hnedom tuku, ale hladina *OB* RNA zostáva nezmenená [Jacobsson *et al., J. Biol. Chem.*, 260: 16254 - 16254 (1985)]. V súhrne tieto údaje potvrdzujú, že vo všetkých adipocytoch vzniká *OB* RNA a jej expresná hladina je v rôznych tukových depotoch rôzna. Uvedené údaje podporujú predstavu, podľa ktorej hladina kódovaného proteínu koreluje s celkovou hmotou adipózneho tkaniva.

Hladiny *OB* RNA boli určované u *DB/DB* myší a myší s hypolalamickými léziami. Lézie ventrikulárneho hypotalamu (VHM) vedú k rozvoju obezity ako súčasti syndrómu pripomínajúceho syndróm u myší *OB/OB DB/DB* [Braxy *et al., Metabolism,* 24: 99 - 117 (1975)]. Z parabiotických experimentov vyplýva, že tieto lézie vedú k nadmernej expresii krvného faktora, ktorý potláča príjem potravy a telesnú hmotnosť [Hervey, *J. Physiol.,* 145.336 - 352 (1959)]. Podobné výsledky boli zaznamenané pri parabiotickom spojení myší s mutáciami v *OB* lokuse a normálnych myši, čo naznačuje, že OB receptor môže byť kódovaný *DB* lókusom [Coleman *et al., Diabetologia,* 14: 141 - 148 (1978)]. Obezita spôsobená VHM léziami a *DB* mutáciou môže byť teda dôsledkom rezistencie proti účinkom OB proteínu. Pokiaľ je to skutočne tak, dá sa predpokladať sekundárna zvýšená hladina *OB* RNA v adipóznom tkanive.

U samičiek CBA myší boli pôsobením aurotioglukózy (GTG) chemicky indukované hypotalamické lézie [Debons *et al., Fed. Proc.*, 36: 143 - 147 (1977)]. Aurotioglukóza spôsobuje špecifické hypotalamické lézie,

menovite vo vertikulárnom hypotalame (VHM), s následným rozvojom obezity v priebehu niekoľkých týždňov. Na vyvolanie obezity v priebehu štyroch týždňov obyčajne stačí jedna peritoneálna injekcia GTG v dávke 0,2 mg/g telesnej hmotnosti. GTG bolo injikované samičkám myší CBA/J (20 až 25 g). Následný prírastok hmotnosti pokusných a kontrolných zvierat je uvedený v tabuľke 2. Bola pripravená RNA z adipózneho tkaniva myší *DB/DB* myší po aplikácii GTG, ktorých hmotnosť vzrástla o viac ako 20 g. Na northerových blotoch bol pozorovaný dvadsaťnásobný vzrast hladiny *OB* RNA u dvojmesačných myší *DB/DB* a myší s aplikovaným GTG oproti kontrolnej skupine (obr. 33).

Tabuľka 2

Prírastok hmotnosti u myší po aplikácii GTG

	kontrola (n = 41)	GTG (n = 93)
< 10 g	41, (100 %)	4, (4 %)
10 - 20 g	0, (0 %)	15, (16 %)
> 20 g	0, (0,%)	74, (80 %)

Dvojmesačným samičkám myší CBA/J bolo aplikované GTG. Aurotioglukóza (Sigma A0632) bola podaná intraperitoneálne v normálnom fyziologickom roztoku v dávke 2,0 mg/g. Telesná hmotnosť kontrolných a pokusných zvierat bola zaznamenaná pred aplikáciou a jeden mesiac po aplikácii. Zvieratá boli chované v klietkach po päť a kŕmené podľa ich chuti. Hmotnostný prírastok jeden mesiac po injekcii je uvedený v tabuľke 2. Zvieratá s prírastkom hmotnosti nad 20 g po jednom mesiaci boli vybrané na ďalšie štúdium.

Diskusia

Produkt myšacieho *OB* génu cirkuluje v myšacej i ľudskej plazme, kde sa pravdepodobne zúčastní regulácie adipóznej tkanivovej hmoty. Štúdium regulácie expresie a mechanizmu účinku OB budú významné na ďalšie porozumenie fyziologických ciest regulácie telesnej hmotnosti.

Predkladaný príklad ukazuje, že k expresii produktu *OB* génu dochádza výlučne v adipocytoch a vo všetkých adipóznych depotoch. Tento výsledok je v súlade s predstavou, že proteínový produkt *OB* génu koreluje s telesnými zásobami tuku. Naviac dochádza k dvadsatnásobne vyššej expresii *OB* u *DB* myší a myší s hypotalamickými léziami. U týchto zvierat dochádza pravdepodobne i k vyššiemu než dvadsaťnásobnému vzrastu hladiny *OB* RNA, lebo adipocyty u týchto zvierat sú približne päťkrát väčšie (pozri obr. 30) [Debons *et al., Fed. Proc,* 36.143 - 147 (1997)]. Z týchto údajov vyplýva, že *DB* gén i hypotalamus sú v hierarchii ciest regulujúcich adipóznu tkanivovú hmotu až za *OB* génom a že OB receptor je kódovaný v *DB* lokuse [Coleman *et al., Diabetologia,* 14: 141 - 148 (1978)]. Túto predstavu objasní až molekulárne klonovanie OB receptora alebo *DB* génu. Zvýšená hladina *OB* RNA u *DB/DB* myší a u myší po aplikácii GTG ďalej naznačuje, že funkcia produktu *OB* génu v tukových bunkách nie je autonómny [Ashwell *et al., Proc. R. Soc. Lond.,* 195: 343 - 353 (1977); Ashwell *et al., Diabetologia,* 15: 465 - 470]. Pretože, pokiaľ by kódovaný proteín pôsobil priamo na tukové bunky a inhiboval ich rast alebo diferenciáciu, potom by nadprodukcia divokého *OB* génu u myší po aplikácii GTG viedla ku štíhlemu fenotypu.

Najtriezvejšie vysvetlenie týchto údajov je, že OB proteín pôsobí ako endokrinná signálna molekula sekrétovaná adipocytmi a pôsobí priamo alebo nepriamo na hypotalamus. Priame pôsobenie na hypotalamus vyžaduje mechanizmus, ktorý by umožňoval priechod produktu *OB* génu hematoencefalickou bariérou. Mechanizmy zahŕňajúce cirkumvertikulárny orgán alebo špecifické transportné molekuly umožňujú prístup do mozgu molekulám takej veľkosti ako produkty kódované *OB* génom [Johnson *et al., FASEB J.,* 7: 678 : 686 (1983); Baura *et al., J. Clin. Invest.,* 92: 1842 - 1830; (1993); Pardridge, *Endocrine Reviews,* 7: 314 - 330 (1986)]. Túto hypotézu je však nutné prijímať opatrne, pokiaľ nebudú vynájdené prostriedky, ktorými by proteín prekonával hematoencefalitickú bariéru. Navyše je nutné brať do úvahy možné účinky na iné cieľové orgány.

Signály tukových buniek zodpovedné za kvantitatívne rozdiely v expresných hladinách *OB* génu zatiaľ nie sú známe, ale korelujú s rozdielmi vo veľkostiach adipocitov. Adipocyty u *DB/DB* myší sú päťnásobne väčšie než adipocyty normálnych myší obsahujúcich približne 1,0 μg tuku na bunku [Johnson *et al., J. Lipid res.,* 13: 2 - 11 (1972)]. Podľa predbežných výsledkov je obsah tuku v tukovej bunke alebo jej veľkosť dôležitým parametrom určujúcim telesnú hmotnosť [Faust *et Science,* 197: 393 - 396 (1977)]. Je možné, že každá tuková bunka exprimuje nízku hladinu *OB* RNA a tá sa ďalej zvyšuje úmerne k veľkosti bunky. Rovnako je však možné, že veľkosť bunky nie je určujúcim parametrom, ale len koreluje s intracelulárnym signálom zvyšujúcim expresiu *OB* génu v adipocytoch myší *DB/DBa* myší s VHM léziami. V každom prípade je pravdepodobné, že zložky signálnej prenosovej cesty regulujúcej syntézu *OB* RNA určujú telesnú hmotnosť. Genetické vplyvy a vplyvy prostredia znižujúce hladinu expresie OB budú zvyšovať telesnú hmotnosť, podobne ako faktory, ktoré znižujú citlivosť na kódovaný proteín. Špecifické molekuly regulujúce hladinu expresie *OB* génu však zatiaľ nie sú známe. Tejto problematike predchádza vyriešenie hladín kontroly génu, ktoré

ovplyvňujú kvantitatívne zmeny expresie *OB* RNA a výskum regulačných prvkov *OB* génu. Identifikácia molekúl, ktoré regulujú expresiu *OB* génu v adipocytoch a molekúl, ktoré sprostredkovávajú účinky kódovaného proteínu v cieľových miestach významne pomôže objasniť fyziologické mechanizmy regulácie telesnej hmotnosti.

Príklad 10:

Expresný vzor RNA a mapovanie na fyzickej cytogenetickej a genetickej mape chromozómu 7

Expresia ľudského *OB* prebieha na vysokej hladine v adipóznych tkanivách, nižšie hladiny sú v placente a srdci. Ľudský *OB gén* bol mapovaný na veľkom súbore YAC (yeast artificial chromosome), odvodenom od chromozómu 7q31.3. Okrem overenia relatívneho umiestnenia génu, ktoré vychádzalo z porovnávacieho mapovania myšacieho a ľudského génu, táto štúdia umožnila identifikovať 8 základných mikrosatelitných markerov v tesnej blízkosti ľudského *OB* génu. Vzhľadom na to, že mutácia myšacieho *OB* vedú k syndrómu pripomínajúcemu chorobnú obezitu u ľudí, sú tieto genetické markéry významnými prostriedkami na určenie úlohy *OB* génu v dedičných formách ľudskej obezity.

Materiály a postupy

Analýza northernovým blotovaním

Totálna RNA bola pripravená z adipózneho tkaniva postupom Chirgwin *et al., Biochem.,* 18: 5294 - 5299 (1979). Northernové bloty, rádioizotopové značenie a hybridizácia boli uskutočnené podľa Zhanga *et al., Nature,* 372: 425 - 432 (1994). Northernové bloty poly A^+ RNA (ľudský MTN, ľudský MTN II a ľudské fetálne MTN II) boli získané od CLONENTECH (Palo Alto, CA) podobne ako PCR priméry na prípravu rádioizotopovo značenéj ľudskej aktínovej próby.

Vývoj STS

PCR testy pre špecifické sekvenčne značené miesta (STS) boli vyvinuté a optimalizované podľa literatúry [Green *et al., PCR Methods Applic,* 1991; Green *et al., Genomics* 11: 548 - 564 (1991); Green „Physical mapping of human chromosomes: generation of chromosome-specific sequence-tagged sites", v *Methods In Molecular Genetics,* diel 1., Genbe and Chromosome Analysis (časť A), str. 192 - 0210, Adolph vyd., Academic Press, Inc., San Diego (1993); Green *et al., Hum. Mol Genet.,* 3: 489 - 501 (1994)]. artificial chromosome), odvodenom od chromozómu 7q31.3. Okrem overenia relatívneho umiestnenia génu, ktoré vychádzalo z porovnávacieho mapovania myšacieho a ľudského génu, táto štúdia umožnila identifikovať 8 základných mikrosatelitných markerov v tesnej blízkosti ľudského *OB* génu. Vzhľadom na to, že mutácia myšacieho *OB* vedie k syndrómu pripomínajúcemu chorobnú obezitu u ľudí, sú tieto genetické markery významnými prostriedkami na určenie úlohy *OB* génu v dedičných formách ľudskej obezity.

Materiály a postupy

Analýza northernovým blotovaním

Totálna RNA bola pripravená z adipózneho tkaniva postupom Chirgwin *et al., Biochem.,* 18: 5294 - 5299 (1979). Northernové bloty, rádioizotopové značenie a hybridizácia boli uskutočnené podľa Zhanga *et al., Nature,* 372: 425 - 432 (1994). Northernové bloty poly A^+ RNA (ľudský MTN, ľudský MTN II a ľudské fetálne MTN II) boli získané od CLONENTECH (Palo Alto, CA) podobne ako PCR priméry na prípravu rádioizotopovo značenej ľudskej aktínovej próby.

Vývoj STS

PCR testy pre špecifické sekvenčne značené miesta (STS) boli vyvinuté a optimalizované podľa literatúry [Green *et al., PCR Methods Applic,* 1991; Green *et al., Genomics* 11: 548 - 564 (1991); Green „Physical mapping of human chromosomes: generation of chromosome-specific sequence-tagged sites", v *Methods in Molecular Genetics,* diel 1., Genbe and Chromosome Analysis (časť A), str. 192 - 0210, Adolph vyd., Academic Press, Inc., San Diego (1993); Green *et al., Hum. Mol Genet.,* 3: 489 - 501 (1994)].

Názov každého STS začína predponou „sWSS", za ktorou nasleduje špecifické číslo. Podrobné informácie o 19 uvedených STS sú v tabuľke 3, dodatočné informácie (napr. podmienky PCR reakcie, kompletnej sekvencie DNA) sú dostupné v GenBank alebo v Genom Data Base (GDB). Oligonukleotidické priméry na PCR vyhľadanie (tabuľka 3) oblastí STS špecifických k mikrosatelitom, zodpovedajú buď primérom používaným na analýzu genotypu (tabuľka 4), alebo primérom naplánovaným (často s využitím počítačového programu OSP) [Hillier *et al., Per Methods Applic,* 1: 124 - 128 (1991)] podľa DNA sekvencií GenBanky. Tabuľka 3 ilustruje oblasti STS v súbore YAC, ktorý obsahuje ľudský *OB* gén.

Tabuľka 3

Názov STS	Alias	Miesto	Zdroj	PCR Priméry	Veľkosť (bp)	Id.č. SEKV.	Id.č. GDB
sWSS1734		D7S2185	YAC ukončenie	CAAGACAAATGAGATAAGG AGAGTTACAGCTTTACAG	72	39 40	G00-455-235
sWSS494		D7S2016	Lambda klon	CTAAACACCTTTCCATTCC TTATATTCACTTTTCCCCTCTC	112	41 42	G00-334-404
sWSS883	UT528	D7S1498	Genetický marker	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG GTGCAGCTTTAATTGTGAGC	490	43 44	G00-455-262
sWSS2359	AFMa065zg9	D7S1873	Genetický marker	AGTGTTGTGTTTCTCCTG AAAGGGGATGTGATAAGTG	142	45 46	G00-455-247
sWSS2336	AFMa125wh1	D7S1874	Genetický marker	GGTGTTACGTTTAGTTAC GGAATAATGAGAGAAGATTG	112	47 48	G00-455-244
sWSS1218	AFM309yf1	D7S680	Genetický marker	GCTCAACTGACAGAAAAC GACTATGTAAAAGAAATGCC	154	49 50	G00-307-733
sWSS1402		D7S1916	YAC ukončenie	AAAGGGCTTCTAATCTAC CCTTCCAACTTCTTTGAC	137	51 52	G00-344-044
sWSS999		D7S1674	YAC inzert	TAAACCCCCTTTCTGTTC TTGCATAATAGTCACACCC	105	53 54	G00-334-839
sWSS1751		D7S2186	YAC ukončenie	CCAAAATCAGAATTGTCAGAAG AAACCGAAGTTCAGATACAG	186	55 56	G00-455-238
sWSS1174	AFM218xf10	D7S514	Genetický marker	AATATCTGACATTGGCAC TTAGACCTGAGAAAAGAG	144	57 58	G00-307-700
sWSS2061		D7S2184	YAC ukončenie	GTTGCACAATACAAAATCC CTTCCATTAGTGTCTTATAG	200	59 60	G00-455-241
sWSS2588		D7S2187	YAC ukončenie	ATCACTACACACCTAATC CCATTCTACATTTCCACC	117	61 62	G00-455-253
sWSS808	*Pax-4*	PAX4	Gén	GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA TTGCCAGGCAAAGAGGGCTGGAC	153	63 64	G00-455-259
sWSS1392	AFM206xc1	D7S635	Genetický marker	CTCAGGTATGTCTTTATC TGTCTCTGCATTCTTTTC	75	65 66	G00-307-815
sWSS1148	AFM199xh12	D7S504	Genetický marker	GACACATACAAACACAAG ATTGAGTTGAGTGTAGTAG	60	67 68	G00-307-652
sWSS1529		D7S1943	YAC ukončenie	CAGGGATTTCTAATTGTC AAAAGATGGAGGCTTTTG	116	69 70	G00-334-119
sWSS2619	*OB*	*OB*	Gén	CGTTAAGGGAAGGAACTCTGG TGGCTTAGAGGAGTCAGGGA	106	71 72	G00-455-256
sWSS404		D7S1956	Lambda klon	ACCAGGGTCAATACAAAG TAATGTGTCCTTCTTGCC	122	73 74	G00-334-251
sWSS2367	AFMa345wc9	D7S1875	Genetický marker	CAATCCTGGCTTCATTTG AAGGTGGGTAGGATGCTA	81	75 76	G00-455-250

19 oblastí STS špecifických k chromozómu 7 mapovaných v súbore YAC, ktorý obsahuje ľudský *OB* gén, je uvedené na zozname (obr. 35). Pre každú oblasť STS je uvedený názov „sWSS“, relevantný druhý názov, GDB-názov lokusu, zdroj STS, sekvencia PCR primáru, veľkosť STS a GDB-identifikačné číslo. Zdroje oblastí STS sú nasledujúce: „koniec YAC“ (izolovaný koncový inzert YAC) [Green, „Physical mapping of human chromosomes: generation of chromosome-specific sequence-tagged sites“, v *Methods in Molecular Genetics,* diel 1., Genbe and Chromosome Analysis (časť A), str. 192 - 0210, Adolph vyd., Academic Press, Inc., San Diego (1993)], 'Lambda klon' (náhodný lambda klon špecifický k chromozómu 7) [Green *et al., PCR Methods Applic,* 1991; Green *et al., Genomics,* 11: 548 - 564 (1991); Green, „Physical mapping of human chromosomes: generation of chromosome-specific sequence-tagged sites“, v *Methods in Molecular Genetics,* diel 1., Genbe and Chromosome Analysis (časť A), str. 192 - 0210, Adolph vyd., Academic Press, Inc., San Diego (1993)], 'Genetický marker' (mikrosatelitový marker, pozri tabuľku 2) [Green *et al., Hum. Mol. Genet.,* 3: 489 - 501 (1994)], 'Yac insert' (náhodný segment z YAC inzertu) a 'Gen' (STS špecifická k génu). Je vhodné si uvedomiť, že v niektorých oblastiach STS špecifických ku genetickým markerom, sa PCR priméry použité na identifikáciu YAC (zo zoznamu v tejto tabuľke) líšia od primárov použitých pri analýze genotypu (tabuľka 4), pretože detekcia YAC s určitým genetickým markerom nevyžaduje amplifikáciu polymorfnej oblasti. Všetky uvedené PCR testy boli vykonávané pri teplote anelácie 55 °C okrem testov sWSS494, SWSS883, SWSS1529, ktoré boli vykonané pri 50 °C, SWSS999 a SWSS1174, ktoré boli vyko-

nané pri 60 °C a 3WSS8O8, ktorý bol vykonaný pri 65 °C. Ďalšie podrobnosti týkajúce sa STS-špecifických testov PCR sú dostupné v GDB.

Tabuľka 4

Názov markera	Typ	Miesto	Priméry	Id.č. SEKV.	Id.č. GDB
UT528	Tetra.	D7S1498	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG	77	G00-312-446
			GTGCAGCTTTAATTGTGAGC	78	
AFMa065zg9	$(CA)_n$	D7S1873	AGCTTCAAGACTTTNAGCCT	79	G00-437-253
			GGTCAGCAGCACTGTGATT	80	
AFMa125wh1	$(CA)_n$	D7S1874	TCACCTTGAGATTCCATCC	81	G00-437-263
			AACACCGTGGTCTTATCAAA	82	
AFM309yf10	$(CA)_n$	D7S680	CATCCAAGTTGGCAGTTTTT	83	G00-200-283
			AGATGCTGAATTCCCAGACA	84	
AFM218xf10	$(CA)_n$	D7S514	TGGGCAACACAGCAAA	85	G00-188-404
			TGCAGTTAGTGCCAATGTCA	86	
AFM206xc1	$(CA)_n$	D7S635	CCAGGCCATGTGGAAC	87	G00-199-240
			AGTTCTTGGCTTGCGTCAGT	88	
AFM199xh12	$(CA)_n$	D7S504	TCTGATTGCTGGCTGC	89	G00-188-280
			GCGCGTGTGTATGTGAG	90	
AFMa345wc9	$(CA)_n$	D7S1875	AGCTCTTGGCAAACTCACAT	91	G00-437-259
			GCCTAAGGGAATGAGACACA	92	

Na zozname je uvedených osem mikrosatelitových markérov mapovaných v súbore YAC, ktorý obsahuje ľudský *OB* gén (obr. 35). Pre každú oblasť STS je uvedený názov markéra (ako druhý názov v tabuľke 3), typ mikrosatelitového motívu (opakujúci sa tetranukleotid-'Tetra' alebo opakujúci sa (CA)n), GDB-názov lokusu, sekvencia priméra použitého na PCR analýzu genotypu a identifikačné číslo GDB. Ďalšie podrobnosti týkajúce sa testov PCR a polymorfie sú dostupné v GDB.

STS oblasti (sWSS2619) špecifické k ľudskému *OB* génu boli naplánované podľa sekvencie DNA z 3' neprepísanej oblasti cDNA. Nasledujúcou stratégiou bol vyvinutý ľudský STS (sWSS808) špecifický k *Pax4*. Oligonukleotidické priméry špecifické k myšaciemu génu *Pax4* (GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA) SEQ ID č. 63) a (GGAGCCTTGTCCTGGGTACAAAG) (SEQ ID č. 39) [Walter *et al., Genomics,* 11: 424 až 434 (1991) boli použité pri amplifikácii 204-bp dlhého fragmentu z ľudskej genómovej DNA (fragmentu rovnakej veľkosti ako produkt generovaný z myší genómovej DNA). Tento PCR test nebol vhodný na identifikáciu zodpovedajúcich YAC, lebo z kvasinkovej DNA boli tiež amplifikovane podobne veľké (200-bp) produkty. Viacmenej analýza PCR produktov generovaných z ľudskej DNA odhalila 20 substitúcií v 156 analyzovaných bázach (údaje neuvedené). Podľa tejto sekvencie, špecifickej k ľudskej DNA, bol naplánovaný nový primér (TTGCCAGGCAAAGAGGGCTGGAC)(SEQ ID č. 64) a použitý spolu s prvým z uvedených primérov špecifických k *Pax4* (pozri tabuľku 3). Pri výslednom PCR teste špecifickom k ľudskému *Pax4,* ktorom nedochádzalo k významnejšej amplifikácii produktov z kvasinkovej DNA, a preto bol použiteľný na identifikáciu hľadaných príslušných YAC.

Identifikácia oblastí YAC pomocou PCR-skríningu

Väčšina YAC zobrazených v obr. 35 boli odvodené zo zbierky klonov vysoko obohatených DNA z ľudského chromozómu 7(' zdroj YAC - chromozóm 7') [Green *et al., Genomics,* 25: 170 - 183 (1995)] PCR skríningom (Green *et al., Genomics,* 25: 170 - 183 (1995); Green *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87: 1213 - - 1217 (1990)]. V niekoľkých málo prípadoch boli klony izolované PCR-skríningom [Green *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87: 1213 - 1217 (1990)] z dostupnej ľudskej genómovej knižnice obsahujúcej totálne YAC, konštruované v CEPH [Dausset *et al., Behring Inst. Mitt.,* 91: 13 - 20 (1992); Albertsen *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87: 4256 - 4260] alebo ICI [Anand *et al., Nucl. Acids Res.,* 17: 3425 - 3433 (1989); Anand Nucl. Acids Res., 18: 1951 - 1956 (1990)]. Názov každého YAC začína predponou „yWSS" nasledovanou špecifickým číslom.

Výsledky a diskusie

Výskum expresie ľudského *OB* génu v tkanive analýzou northernových blotov ukázal, že v adipóznom tkanive prebieha expresia *OB* RNA na vysokej hladine, zatiaľ čo expresné hladiny v placente a srdci sú podstatne nižšie (obr. 34). Veľkosť RNA (4,5 kb) je u ľudí i myší ekvivalentný a rovnako vo všetkých exprimujúcich tkanivách. V štúdiách boli pozorované päťnásobne vyššie signály v 10 μg totálne RNA z adipózneho tkaniva ako 2 μg poly A^+ placentárnej RNA. Päťnásobne nižší signál poly A^+ RNA bol pozorovaný v srdcovom tkanive oproti placentárnemu. Bolo odhadnuté, že hladina *OB* RNA je asi 250-krát nižšia v placente než v adipóznom tkanive. V podmienkach experimentu nebola *OB* RNA detegovaná v ostatných analyzovaných tkanivách, t. j. v mozgu pľúcach, pečeni, kostrovom svalstve, ľadvinách a slinivke. Ani dodatočné pokusy nepreukázali prítomnosť *OB* RNA v slezine, týmuse, prostate, testikulárnon tkanive, vaječníku, tenkom čreve, hrubom čreve, periférnych krvných leukocytoch alebo vo fetálnych mozgových, pečeňových alebo ľadvinových tkanivách (údaje neuvedené). Je možné, že v týchto alebo ďalších neanalyzovaných tkanivách prebieha expresia *OB* na hladinách, ktoré na nedajú northernovým blotovaním detegovať. Pozorovaný charakter expresie *OB* u ľudí sa oproti myšiam mierne líši, lebo u myší expresia prebieha výlučne v adipóznom tkanive.

Porovnávacie mapovanie oblasti OB génu v myšacom a ľudskom genóme.

Myšací *OB* gén sa nachádza v blízkosti chromozómu 6 v oblasti, ktorá je homológna s časťou ľudského chromozómu 7q. Tento segment zahŕňa gény (od najbližších ku najvzdialenejším): *Met* protoonkogén, cystický fibrózny regulátor transmembránovej konduktancie (*CFTR),* párový „box-containing" gén *(Pax4), OB* gén a gén na karboxypeptidázu A (Cpa) [Zhang *et al., Nature,* 372: 425 - 432 (1994); Friedman *et al. , Genomics,* 11: 1054 - 1062 (1991)]. U myší genetické mapovanie dokázalo, že *Pax4* je tesne spojené s *OB* [Walther *et al., Genomics,* 11: 424 - 434 (1991); Zhang *et al., Nature,* 372: 425 - 432 (1994)]. Bolo zistené, že fyzická vzdialenosť medzi *OB* a *Pax4* je 1 Mb (milión párov báz) [Zhang *et al., Nature,* 372: 425 - 432 (1994)]. Na základe porovnávacích mapovacích štúdií sa dá predpokladať, že ľudský *OB* gén je umiestnený medzi génmi *Pax4* a *CPA* na chromozóme 7q. Ďalej, pretože ľudský *Cftr* [Heng *et al., Cell Genet.,* 62: 108 - 109 (1993)] a *Pax4* [Tamura *et al., Cytogenet. Cell Genet.,* 6.132 - 134 (1994)] boli mapované fluorescenčnou hybridizáciou *in situ* (FISH) do polôh 7q31.3 a 7q32, nachádza sa ľudský *OB* gén cytogeneticky najpravdepodobnejšie v blízkosti medzi 7q31.3-q32.

Mapovanie ľudského OB génu na ľudskom chromozóme 7

STS (sWSS2619) amplifikujúci malý segment 3'nepreloženej oblasti *OB* génu bol použitý na prehľadanie súboru YAC klonov, vysoko obohatených DNA ľudského chromozómu 7 [Green *et al.,* 1995a, *Genomlcs* 25: 170 - 183] a bolo vynájdených 9 oblastí YAC (yWSS691, yWSS1332, yWSS1998, yWSS2087, yWSS3319, yWSS3512, yWSS4875, yWSS4970 a yWSS5004). Na overenie, či tieto YAC obsahujú autentický ľudský *OB* gén, boli vykonané dva dodatočné pokusy. V prvom bol každý YAC testovaný druhým PCR testom špecifickým k ľudskému *OB* a pri všetkých YAC bol výsledok pozitívny (údaje neuvedené). V druhom teste boli kvasinkové DNA z každého klonu štiepené *Eco*RI a analyzované gél-transferovou hybridizáciou s využitím próby odvodenej od cDNA z ľudského *OB.* Vo všetkých prípadoch bol pozorovaný jednotný hybridizačný pás; a tento pás mal rovnakú veľkosť v klonoch YAC i klonoch P1, o ktorých je známe, že obsahujú ľudský *OB* gén (údaje neuvedené).

Pomocou počítačového programu SEGMAP [Green *et al., PCR Methods Applic,* 1991; Green *et al., Genomics,* 11: 548 - 564 (1991)] a ďalších súborov dát obsahujúcich oblasti STS vychádzajúcich z YAC, ktoré boli vytvorené pre chromozóm 7 [Green *et al., Genomics,* 11: 548 - 564 (1991); Green *et al., Hum. Mol. Genet.,* 3: 489 - 501 (1994); Green *et al., Genomics,* 25: 170 - 183 (1995)] bolo potvrdené, že ľudský *OB* gén je obsiahnutý v sade YAC (obr. 35). Konkrétne táto sada obsahuje 43 presahujúcich oblastí YAC a 19 špecificky usporiadaných oblastí STS. Podrobnosti týkajúce sa každej z 19 oblastí STS sú uvedené v tabuľke 3. Okrem STS špecifických k *OB,* sada ďalej obsahuje oblasť STS (SWSS8085) špecifickú k ľudskému génu *Pax4* [Tamura *et al., Cytogenet. Cell Genet.,* 6: 132 - 134 (1994); Stapleton *et al., Nature genet.* 3: 292 - 298)], sedem oblastí STS odvodených od YAC špecifických k chromozómu 7, dve oblasti STS odvodené od lambda klonov špecifických k chromozómu 7 a hlavne osem oblastí STS špecifických k mikrosatelitom. Dodatočné podrobné informácie o týchto ôsmich genetických markeroch, zahŕňajúcich sekvencie primérov používaných na analýzu genotypu, sú uvedené v tabuľke 2. Podstatné je, že STS oblasti sady sú významne prepojené oblasťami YAC (napr. každá susedná dvojica oblastí STS je spojená dvoma alebo viacerými oblasťami YAC), čo dôveryhodne predstavuje relatívne poradové usporiadanie oblastí STS, ako je uvedené na obr. 35.

Podľa obr. 35 je predpokladaná orientácia sady YAC obsahujúci ľudský *OB* taká, že najviac centromerné STS je SWSS1734 (t. j. najbližšie k CFTR), zatiaľ čo najviac telomerné STS je SWSS2367 (t. j. najbližšie k CPA). Táto orientácia vychádza prevažne z údajov porovnávacieho mapovania, podľa ktorého *Pax4* predchádza *OB* v rámci syntetického bloku v myšacej aj ľudskej DNA [Zhang *et al.. Nature,* 372: 425 - 432

(1994)]. Podľa umiestnenia oblasti STS (SWSS2619) špecifickej k *OB* sa *OB* gén nachádza v blízkosti telomerného konca sady.

Sada uvedená na obr. 35 bola odvodená pomocou SEGMAP bez uvažovania veľkosti YAC (preto sú oblasti STS v ekvidištantných vzdialenostiach). Podobná analýza dát programom SEGMAP, ktorá však uvažovala veľkosťou YAC naznačila, že celková veľkosť oblasti, ktorú sada pokrýva, presahuje 2 Mb (údaje neuvedené). Takže zatiaľ všetkých osem oblastí STS špecifických k mikrosatelitom (tabuľka 4) je obsiahnutých v genómovom intervale zhruba 2 Mb, tri STS najbližšie telomernému koncu sady (SWSS1392, SWSS1148 a SWSS2367) sa veľmi blížia k samotnému *OB* génu (pravdepodobne v rámci intervalu 500 kb). Všetky tri posledne menované oblasti STS sú obsiahnuté v jednej oblasti YAC obsahujúci ľudský *OB*. Odhaduje sa, že interval medzi STS ľudského *Pax4* (sWSS808) a STS *OB* (sWSS2619) je asi 400kb, zatiaľ kým u myší sa táto oblasť odhaduje na 1Mb [Zhang *et al., Nature,* 372: 425 - 432 (1994)]. Na záver boli rovnako analyzované tri oblasti YAC zo sady (yWSS691, yWSS999 a yWSS2935) postupom FISH a bolo zistené, že všetky hybridizujú výlučne s 7q31.3. Jedna z týchto oblastí YAC (yWSS691) obsahuje STS špecifickú k *OB,* druhé dva klony obsahujú STS špecifické k *Pax4.*

Tieto výsledky sú v súlade s predchádzajúcim cytogenetickým priradením ľudského *Pax4* do oblasti 7q32 [Tamura *et al., Cytogenet. Cell Genet.,* 6: 132 - 134 (1994)]. Podľa týchto výsledkov sa dá priradiť ľudský *OB* do cytogenetického pásu 7q31.3.

Príklad 11:

Ľudský OB polypeptid je biologicky aktívny v myšiach

V skupinách 10 myší *OB/OB* bol aplikovaný i. p. injekciou 10 μg/g/*deň* rekombinantnou (bakteriálnou) ľudskou a myšacou OBa fyziologický roztok. Po štyroch dňoch došlo v skupine dostávajúcej fyziologický roztok k prírastku hmotnosti 0,3 g. V skupine s aplikovaným myšacím OB došlo k úbytku hmotnosti 3,2 g a v skupine s ľudským OB došlo k úbytku 2 g (p.<0,01 oproti kontrolnej skupine s fyziologickým roztokom). V skupinách myší bol sledovaný rovnako príjem potravy. Údaje o príjme potravy sú uvedené v tabuľke 5; údaje o telesnej hmotnosti v tabuľke 6.

Tabuľka 5

Denný príjem potravy (g) u pokusných myší *OB/OB* (hodnota ± štand. odch.)

	dni							
aplikácia	0	1	2	3	4	5	6	7
fyz. roztok	13,4 ± 2,6	12,8	12,8	13,1	14,0	12.3	12,4	8,3
myš. OB	14,9	3,7	4,4	5,1	8,9	8,1	8,7	3,5
ľudské OB	14,3	10,3	8,7	7,0	8,9	5,3	3,8	13,0

Tabuľka 6

Telesná hmotnosť a jej zmena u pokusných myší *OB/OB* (hodnota ± štand. odch.)

aplikácia	hmotnosť deň 0	hmotnosť deň 4	zmena % deň 0-4	hmotnosť deň 6	zmena % deň 0-6
fyz.roz.	39,9±1,8	40,7±1,6	0,8±0,5	41,1±2,2	1,2±1,1
myšací OB	39,5±2,1	36,2±2,0	-3,3±1,2	36,3±2,2	-3,1±1,2
ľudský OB	39,5±2,0	37,6±1,7	-2,0±1,0	36,1±1,3	-3,5±1,3

Údaje potvrdzujú biologickú aktivitu ľudského OB v myšiach.

Príklad 12:

Vysoká dávka OB pôsobí na myši divokého typu

Divokým myšiam (C57B16J+/?) bol aplikovaný i. p. rekombinantný myšací OB v dávke 10 μg/g/deň a telesná hmotnosť bola sledovaná každé štyri dni. Výsledky sú uvedené v tabuľke7.

Tabuľka 7

Telesná hmotnosť (g) normálnych myší pri aplikácii OB

aplikácia	hmotnosť deň 0	hmotnosť deň 4	hmotnosť deň 8	hmotnosť deň 12	hmotnosť deň 16
fyz. roz.	22,6±1,4	22,2±1,2	22,5±1,3	23	22,5
myšací OB	22,4±1,5	20,6±1,5	20,8±1,3	20,8	21,8

Údaje dokladajú, že OB pôsobí na telesnú hmotnosť divokých myší podobne ako na hmotnosť myší *OB/OB*, ale v menšom rozsahu.

Príklad 13:

OB polypeptid podávaný kontinuálne infúznou pumpou

Tento príklad ukazuje, že kontinuálna infúzia OB polypeptidu vedie k úbytku hmotnosti u normálnych myší. Normálne (neobézne) myši dostávali myšací OB polypeptid infúznou osmotickou pumpou. Dávka 0,5 mg proteínu na 1 kg telesnej hmotnosti vyvolala úbytok 4,62 % (±/- 1,34 %) od základnej hmotnostnej línie, šiesty deň od začiatku infúzie.

Materiály a postupy

Zvieratá

Boli použité divé myši (+/+) C57B16. Myši boli umiestnené po jednej v klietkach a chované v priaznivých podmienkach. Na začiatku pokusu boli myši 8 týždňov staré a ich hmotnosť bola stabilná. Jednotlivé testy boli vykonávané na desiatich myšiach (nosič vs. proteín).

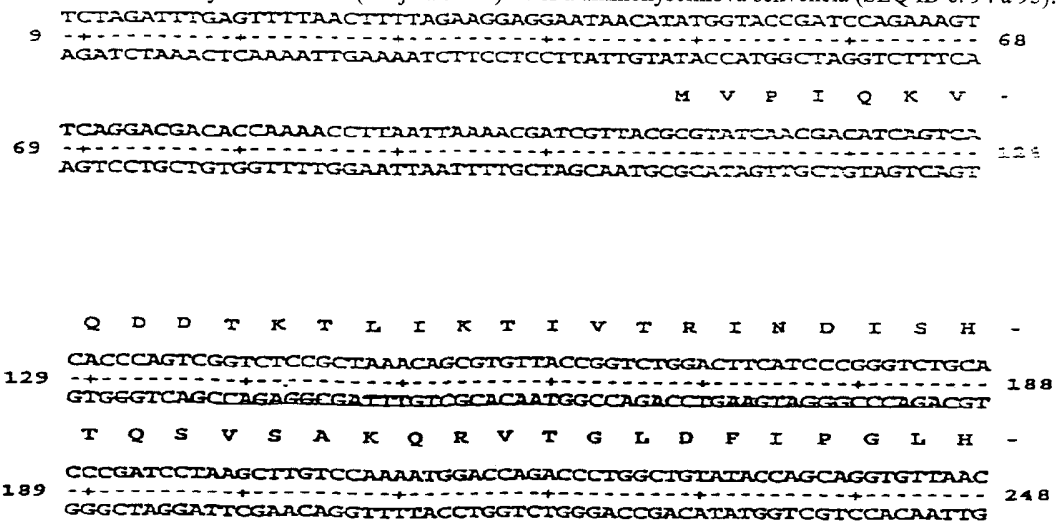
Kŕmenie a meranie hmotnosti

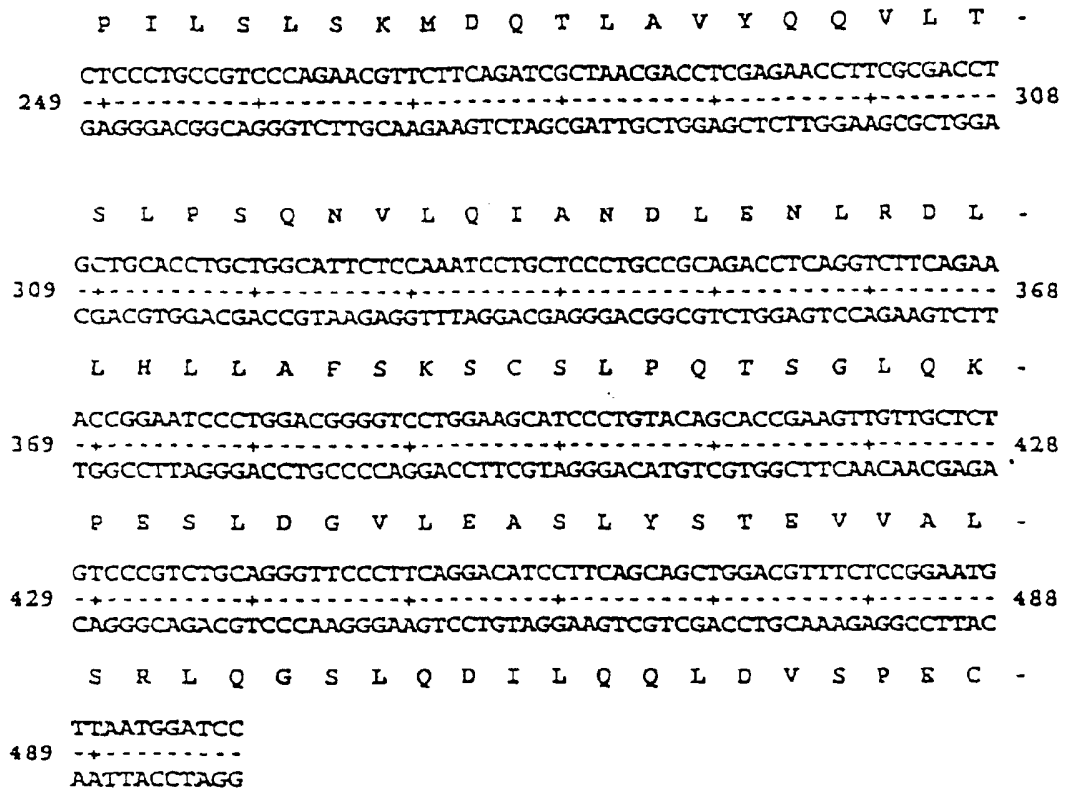
Myši boli kŕmené rozomletou potravou pre hlodavce (PMI Feeds, Inc.) v kŕmidlách na práškovú potravu (Allentown Caging and Equipment), čo dovoľuje presnejšie a citlivejšie meranie prijímania potravy, než zvyčajná potrava v blokoch. Hmotnosť bola meraná každý deň v rovnaký čas (14:00), počas 6 dní. Telesná hmotnosť v deň pred začiatkom infúzie bola zvolená za základnú hmotnostnú úroveň.

Klonovanie myší *OB* DNA

Postup klonovania myší *OB* DNA do expresného hostiteľa *E. coli:* sekvencia DNA odvodená od publikovanej peptidovej sekvencie [Zhang *et al., Nature,* 372: 425 - 432 (1994), Príklad 1] bola reverzne prepísaná pri využití optimálnych kodónov *E. coli.* Terminálnymi klonovacími miestami boli *Xba*I až *Bam*HI. Pred kódujúcu oblasť bola zaradená sekvencia zosilňujúca ribozomálnu väzbu a silné väzbové miesto pre ribozóm. Sekvencia duplexu DNA bola syntetizovaná štandardnými postupmi. Správne klony boli potvrdené expresiou rekombinantného proteínu a prítomnosťou správnej sekvencie *OB* DNA v rezidentnom plazmide. Aminokyselinová sekvencia a sekvencia DNA:

Rekombinantná myšacia met *OB* (dvojvláknová) *DNA* a aminokyselinová sekvencia (SEQ ID č. 94 a 95):





Expresný vektor a hostiteľský kmeň

Na produkciu proteínu bol použitý plazmidový expresný vektor pCFM1656, American Type Culture Collection (ATCC), prírastkové č. 69576. Uvedená DNA bola ligovaná do expresného vektora pCFM1656 linearizovaného *Xba*I a *Sam*HI a tento vektor bol použitý na transformáciu hostiteľského kmeňa *E. coli,* FM5. Bunky *E. coli* FM5 boli odvodené v Amgen Inc. Thousand Oaks, CA z kmeňa *E. coli* K-12 [Bachmann *et al., Bacteriol. Rev.,* 40: 116 - 167 (1976)] a obsahujú integrovaný lambda fágový represor génu cI_{857} [Sussman *et al., C. R. Acad. Sci.,* 254: 1517 - 1579 (1962)]. Príprava vektora, transformácia buniek a selekcia kolónií boli vykonané štandardnými postupmi, (napr. Sambrook *et al., Molecular Cloninq: A Laboratory Manual,* 2. vyd., *Cold Spring- Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)].* Hostiteľské bunky boli pestované v LB médiu.

Podávanie proteínu alebo nosiča

V predkladaných experimentoch bol používaný rekombinantný myšací OB polypeptid obyčajne v koncentrácii 0,9 mg/ml vo fosfátom pufrovanom fyziologickom roztoku, pH 7,4. Aminokyselinové sekvencie (a sekvencie DNA) sú uvedené skôr. Proteín alebo nosič (fosfátom pufrovaný fyziologický roztok, pH 7,4) boli podávané infúzne osmotickou pumpou. Každej pokusnej myši bola voperovaná osmotická minipumpa Alzet (Alza, Palo, Alto, Ca, model č. 1007D) do podkožného vrecka v podlopatkovej oblasti. Pumpy boli nastavené na podávanie 0,5 mg proteínu na kg telesnej hmotnosti a deň. Kontrolným zvieratám bol infúzne podávaný fosfátom pufrovaný fyziologický roztok (pH 7,4) rovnako osmotickou pumpou Alzet.

Fermentácia

Proteín bol pripravovaný trojstupňovou fermentáciou postupom „feed-batch". Zloženie médií je uvedené ďalej.

Jedna dávka

Dusík a zdroj fosfátu boli sterilizované (zvýšením teploty na 122 °C, 35 min., 18 - 20 psi) vo fermentačnom tanku (Biolafitte, objem 12 l). Po ochladení boli asepticky pridané zdroje uhlíka, horčíka, vitamínov a stopových kovov. Ďalej boli do fermentačného zariadenia pridané šestnásthodinová kultúra baktérií produkujúcich myšací rekombinantný proteín v množstve 500 ml (pestované v LB médiu).

Dodanie substrátu I.

Po dosiahnutí 4,0 - 6,0 $O.D._{600}$ bol do kultivačnej zmesi pridaný substrát I. Glukóza bola pridávaná obmedzene tak, aby bola riadená rýchlosť rastu (u). Na dodávanie bol využitý automatizovaný systém (Distributive Control System) naprogramovaný na rýchlosť rastu 0,15 generácie za hodinu.

Dodanie substrátu II

Po dosiahnutí 30 $O.D._{600}$ bola pomaly zvýšená teplota na 42 °C a začalo dodávanie substrátu II (uvedené nižšie). Fermentada ďalej pokračovala 10 hodín, každé 2 hodiny bola odohraná vzorka. Po 10 hodinách bol obsah fermentačného tanku ochladený pod 20 °C a centrifugovaný.

Zloženie média:

Dávka	10 g/l	kvasinkový extrakt
	5,25 g/l	$(NH_4)_2SO_4$
	3,5 g/l	K_2HPO_4
	4,0 g/l	KH_2PO_4
	5,0 g/l	glukóza
	1,0 g/l	$MgSO_4.7H_2O$
	2,0 ml/l	vitamínový roztok
	2,0 ml/l	roztok stopových kovov
	1,0 ml/l	protipenivá prísada P2000
Substrát I:	50 g/l	Bacto-tryptón
	50 g/l	kvasinkový extrakt
	450 g/l	glukóza
	10 ml/l	vitamínový roztok
	10 ml/l	roztok stopových kovov
Substrát II:	200 g/l	Bacto-tryptón
	100 g/l	kvasinkový extrakt
	110 g/l	glukóza

Vitamínový roztok (Dávka, Substrát I):

0,5 g biotínu, 0,4 g kyseliny listovej a 4,2 g riboflavínu bolo rozpustené v 450 ml H_2O a 3 ml 10 N NaOH a roztok bol doplnený vodou na 500 ml. 14 g pyridoxín-HCl a 61 g niacínu bolo rozpustených v 150 ml 10 N NaOH a roztok bol doplnený vodou na 250 ml. 54 g kyseliny pantoténovej bolo rozpustené v 200 ml vody a doplnené vodou na 250 ml. Tieto tri roztoky boli zmiešané a doplnené na celkový objem 10 l.

Roztok stopových kovov (Dávka, Substrát I):

chlorid železitý ($FeCl_3.6H_2O$): 27 g/l
chlorid zinočnatý ($ZnCl_2.4H_2O$): 2 g/l
chlorid kobaltnatý ($CoCl_2.6H_2O$): 2g/l
molybdénan sodný ($NaMoO_4.2H_2O$): 2 g/l
chlorid vápenatý ($CaCl_2.2H_2O$): 1 g/l
síran meďnatý ($CuSO_4.5H_2O$): 1,9 g/l
kyselina boritá (H_3BO_3): 0,5 g/l
chlorid mangánatý ($MnCl_2.4H_2O$): 1,6 g/l
citrát sodný dihydrát: 73,5 g/l

Purifikácia myšacieho OB polypeptidu

Purifikácia bola uskutočnená v nasledujúcich krokoch (pri 4 °C, pokiaľ nie je uvedené inak):

1. Bunková pasta. Pasta buniek *E. Coli* bola suspendovaná v 5 objemoch 7 $mmol.l^{-1}$ EDTA, pH 7,0. Bunková suspenzia v EDTA bola ešte ďalej zjemnená dvoma priechodmi mikrofluidizačným zariadením. Rozrušené bunky boli centrifugované pri 4200 ot./min., 1 hodinu v centrifúge Beckman JB-6 s rotorom J5-4,2.

2. Prvé premytie bunkových tiel: Supernatant z centrifugácie bol odstránený, peleta resuspendovaná v 5 objemoch 7 $mmol.l^{-1}$ EDTA, pH 7,0 a suspenzia homogenizovaná. Vzniknutá zmes bola centrifugovaná ako v kroku 1.

3. Druhé premytie bunkových tiel: Supernatant z centrifugácie kroku 2 bol odstránený, peleta resuspendovaná v 10 objemoch 20 $mmol.l^{-1}$ Tris, pH 8,5 10 $mmol.l^{-1}$ DTT, a 1 % deoxycholátu a suspenzia homogenizovaná. Vzniknutá zmes bola centrifugovaná ako v kroku 1.

4. Tretie premytie bunkových tiel: Supernatant z centrifugácie kroku 3 bol odstránený, peleta resuspendovaná v 10 objemoch destilovanej vody a suspenzia homogenizovaná. Vzniknutá zmes bola centrifugovaná ako v kroku 1.

5. Usporiadanie priestorovej štruktúry peptidu: Peleta bola suspendovaná v 15 objemoch 10 mmol.l^{-1} HEPES, pH 8,5, 1 % sarkozínu (N-laurisarkozín) pri laboratórnej teplote. Po 60 min. bol do roztoku pridaný síran meďnatý na koncentráciu 60 mmol.l^{-1} a zmes bola miešaná cez noc.

Odstránenie sarkozínu. Zmes z kroku 5 bola zriedená 5 objemami 10 mmol.l^{-1} Tris, pH 7,5 a centrifugovaná ako v kroku 1. Supernatant bol odobraný a miešaný 1 hodinu s Dowexom 1-X4, 20 - 50 mesh, v chloridovej forme (množstvo 0,066 % objemových vzhľadom k celkovému množstvu zriedenej zmesi kroku 6). Zmes s Dowexom bola nanesená na kolónu a eluát odobratý. Odstránenie sarkozínu bolo potvrdené HPLC.

7. Kyslé zrážanie. PH eluát z predchádzajúceho kroku bol upravený na hodnotu 5,5 a eluát inkubovaný pri laboratórnej teplote 30 min. Vzniknutá zmes bola centrifugovaná ako v kroku 1.

8. Chromatografia v katexe. PH supernatantu z predchádzajúceho kroku bolo upravené na hodnotu 4,2 a roztok nanesený na kolónu rýchlo tečúcej CM Sefarózy. Kolóna bola eluovaná dvadsiatimi objemami stĺpca, gradientom 0 až 1,0 mol.l^{-1} NaCl v 20 mmol.l^{-1} NaOAc, pH 4,2.

9. HIC chromatografie. Spojené frakcie obsahujúce produkt po chromatografii na CM Sefaróze (podľa UV analýzy) z predchádzajúceho stupňa boli adjustované na koncentráciu 0,2 mol.l^{-1} síranu amónneho. Bol vykonaný reverzný soľný gradient s 20 objemami kolóny od 0,4 do 0 mol.l^{-1} síranu amónneho v 5 mmol.l^{-1} NaOAc, pH 4,2. Tento materiál bol koncentrovaný a diafiltrovaný do PBS.

Výsledky

V tabuľke sú uvedené hmotnostné rozdiely (%) od základnej línie u osemtýždňových myší C547B16J:

Tabuľka 8

Úbytok hmotnosti pri kontinuálnej infúzii

Dni	nosič (PBS) polypeptid	rekombinantný OB
1 - 2	3,24 ± 1,13	1,68 ± 1,4
3 - 4	4,3 ± 0,97	-2,12 ± 0,79
5 - 6	4,64 ± 0,96	-4,62 ± 1,3

Ako je zrejmé, na konci 6. dňa infúzneho režimu došlo u zvierat po aplikácii OB proteínu k úbytku hmotnosti cez 4 % hmotn. oproti základnej línii. To je podstatne rýchlejší úbytok hmotnosti v porovnaní s i. p. injekčnou aplikáciou. Na konci 32 denného injekčného obdobia došlo ku 2,6 - 3,0 % úbytku hmotnosti u divokých (obyčajných) myší, ktoré dostávali denne i. p. injekciu rekombinantného OB myšacieho polypeptidu v dávke 10 mg/kg. Hmotnostný úbytok presahujúce 4 % nebol v priebehu pokusu dosiahnutý (údaje neuvedené). Z predložených údajov vyplýva, že postup kontinuálnej infúzie vedie pri 20-násobne nižšej dávke (0,5 mg/kg oproti 10 mg/kg) k vyššiemu úbytku hmotnosti v kratšom čase.

Výsledky sú štatisticky významné, t. j. -4,62 % $p<0,0001$.

Príklad 14:

Klonovanie a expresia rekombinantného analógu ľudského OB polypeptidu

Tento príklad poskytuje prípravky a postupy prípravy rekombinantného analógu ľudského OB polypetidu.

Ľudská verzia *OB* DNA bola konštruovaná z myšacej *OB* DNA, ako je uvedené v príklade 13, nahradením oblasti medzi miestami *Mlu*I *Bam*HI duplexom DNA (pripraveným zo syntetických oligonukleotidov). V duplexe bolo vykonaných 20 kodónových substitúcií. Nezmenené ostali kodóny pre arginín v polohe 35 myšacieho maturovaného peptidu a leucín v polohe 74 myšacieho maturovaného peptidu. Takto upravená DNA bola inzertovaná do vektora pCFM1656 (ATCC prírastkovej č. 69576) rovnakým spôsobom ako v príklade myšacieho rekombinantného proteínu.

Rekombinantná ľudská met OB (dvojvláknová) DNA a aminokyselinová sekvencia (SEQ ID č. 96 a 97):

```
      CATATGGTACCGATCCAGAAAGTTCAGGACGACACCAAAACCTTAATTAAAACGATCGTT
    1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      GTATACCATGGCTAGGTCTTTCAAGTCCTGCTGTGGTTTTGGAATTAATTTTGCTAGCAA

        M  V  P  I  Q  K  V  Q  D  D  T  K  T  L  I  K  T  I  V  -

      ACGCGTATCAACGACATCAGTCACACCCAGTCGGTGAGCTCTAAACAGCGTGTTACAGGC
   61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
      TGCGCATAGTTGCTGTAGTCAGTGTGGGTCAGCCACTCGAGATTTGTCGCACAATGTCCG

      T  R  I  N  D  I  S  H  T  Q  S  V  S  S  K  Q  R  V  T  G  -

      CTGGACTTCATCCCGGGTCTGCACCCGATCCTGACCTTGTCCAAAATGGACCAGACCCTG
  121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 180
      GACCTGAAGTAGGGCCCAGACGTGGGCTAGGACTGGAACAGGTTTTACCTGGTCTGGGAC

      L  D  F  I  P  G  L  H  P  I  L  T  L  S  K  M  D  Q  T  L  -

      GCTGTATACCAGCAGATCTTAACCTCCATGCCGTCCCGTAACGTTCTTCAGATCTCTAAC
  181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 240
      CGACATATGGTCGTCTAGAATTGGAGGTACGGCAGGGCATTGCAAGAAGTCTAGAGATTG

      A  V  Y  Q  Q  I  L  T  S  M  P  S  R  N  V  L  Q  I  S  N  -

      GACCTCGAGAACCTTCGCGACCTGCTGCACGTGCTGGCATTCTCCAAATCCTGCCACCTG
  241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 300
      CTGGAGCTCTTGGAAGCGCTGGACGACGTGCACGACCGTAAGAGGTTTAGGACGGTGGAC

      D  L  E  N  L  R  D  L  L  H  V  L  A  F  S  K  S  C  H  L  -

      CCATGGGCTTCAGGTCTTGAGACTCTGGACTCTCTGGGCGGGGTCCTGGAAGCATCCGGT
  301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 360
      GGTACCCGAAGTCCAGAACTCTGAGACCTGAGAGACCCGCCCCAGGACCTTCGTAGGCCA

      P  W  A  S  G  L  E  T  L  D  S  L  G  G  V  L  E  A  S  G  -

      TACAGCACCGAAGTTGTTGCTCTGTCCCGTCTGCAGGGTTCCCTTCAGGACATGCTTTGG
  361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 420
      ATGTCGTGGCTTCAACAACGAGACAGGGCAGACGTCCCAAGGGAAGTCCTGTACGAAACC

      Y  S  T  E  V  V  A  L  S  R  L  Q  G  S  L  Q  D  M  L  W  -

      CAGCTGGACCTGTCTCCGGGTTGTTAATGGATCC
  421 ---------+---------+---------+---- 454
      GTCGACCTGGACAGAGGCCCAACAATTACCTAGG

      Q  L  D  L  S  P  G  C  *
```

Fermentácia

Fermentácia hostiteľských buniek prudukujúcich rekombinantný ľudský OB polypeptid bola vykonaná za rovnakých podmienok, ako je uvedené pre rekombinantný myšací polypeptid. Bakteriálna expresia bola analyzovaná na základe výťažku (g/l) rekombinantného ľudského *OB* proteínu (s minoritným množstvom bakteriálnych proteínov), pred purifikáciou:

Tabuľka 9

Analýza expresie ľudského OB polypeptidu

Doba	OD 600 nm	Výťažok (g/l)	Expresia (mg/OD.l)
Ind. + 2 h	47	1,91	41
Ind. + 4 h	79	9,48	120
Ind. + 6 h	95	13,01	137
Ind. + 8 h	94	13,24	141
Ind. + 10 h	98	14,65	149

Skratky: Ind. + _ h sú hodiny po indukcii expresie proteínu podľa príkladu 13 pre rekombinantný myšací materiál s pCFM1656; O. D.: optická hustota zmeraná na spektrofotometri; mg/O. D.* 1: výraz v jednotkách mg proteínu na O. D. a liter.

Purifikácia rekombinantného ľudského 0B polypeptidu

Rekombinantný ľudský proteín bol purifikovaný rovnakými postupmi ako rekombinantný myšací proteín, ako je uvedené v príklade 13. Pri preparácii ľudského rekombinantného OB polypeptidu bol uskutočnený krok 8 adjustáciou pH supernatantu z kroku 7 na pH 5,0 a nanesením tohto roztoku na kolónu rýchlo tečúcej CM Sefarózy. Elúcia bola vykonaná 20 objemami kolóny gradientom 0 až 0,5 $mol.l^{-1}$ NaCl v 20 $mmol.l^{-1}$ NaOAc, pH 5,5. V kroku 9 boli chromatografické frakcie s produktom zriedené 4 objemami vody a pH adjustované na 7,5. Táto zmes bola adjustovaná na koncentráciu 0,7 $mol.l^{-1}$ síranu amónneho. Bol vykonaný reverzný soľný gradient s 20 objemami kolóny od 0,2 do 0 $mol.l^{-1}$ síranu amónneho v 5 $mmol.l^{-1}$ NaOAc, pH 5,5. Ostatné kroky boli zhodné.

Príklad 15:

Štúdia odpovede organizmu na dávku

V ďalšej štúdii bola pozorovaná závislosť odpovede od dávky OB proteínu pri kontinuálnom podávaní. Divoké myši (neobézne, myši CD-1, hmotnosť 35-40 g) dostávali rekombinantný myšací OB proteín podľa príkladu 12 a 13. Výsledky sú uvedené v tabuľke 10 (úbytok hmotnosti v % oproti základnej línii, merané uvedeným spôsobom):

Tabuľka 10

Odpoveď na dávku pri kontinuálnom podávaní

Dávka	Dni	Úbytok telesnej hmotnosti v [%]
0,03 mg/kg/deň	2	3,5 %
1 mg/kg/deň	2	7,5 %
1 mg/kg/deň	4	14 %

Ako je zrejmé, zvýšenie dávky z 0,03 mg/kg/deň na 1 mg/kg/deň vyvolalo zvýšenie hmotnostného úbytku z 3,5 % na 7,5 %. Rovnako stojí za povšimnutie, že 14. deň viedla dávka 1 mg/kg/deň ku 14 % strate hmotnosti.

Príklad 16:

Účinok leptínu na telesnú stavbu u myší *DB/DB*

Šesťnásťtýždenné myši C57B1/6J dostávali 5 mg/kg/deň myšacieho leptínu, nosič alebo nič, počas 33 dní. Sedemtýždenné myši *OB/OB* dostávali 10 mg/kg/deň ľudského leptínu, myšacieho leptínu alebo nosič, počas 12 dní. Potom boli usmrtené, určená celková telesná hmotnosť, zloženie tela, hladina inzulínu a glukózy. Údaje z tohto experimentu sú uvedené v tabuľke 11.

Tabuľka 11

Telesná hmotnosť, zloženie, hladiny inzulínu a glukózy u myší po aplikácii leptínu

Aplikačná skupina	16 týždenné myši 5 mg/kg/deň leptínu		
Aplikácia	myšací leptín	nosič	kontrola
celková telesná hmotnosť	31,90 ± 2,8	64,10 ± 4,5	67,50 ± 6,2
tuk celkom ±±±	9,10 ± 1,7	38,30 ± 4,0	40,87 ± 6,1
[%]	28,40 ± 3,4	59,70 ± 2,1	60,34 ± 3,7
štíhla hmota celkom	6,80 ± 1,0	7,60 ± 0,4	7,73 ± 0,5
[%]	21,30 ± 1,7	11,90 ± 1,2	11,57 ± 1,6
voda celkom	16,00 ± 0,8	18,20 ± 0,7	18,90 ± 1,0
[%]	50,30 ± 4,2	28,40 ± 1,0	28,10 ± 2,2
inzulín (UIU/ml)	< 2,0	< 2,0	< 2,0
glukóza (mg/dl)	170,0 ± 20,9	337,0 ± 30,3	317,5 ± 51,0

Aplikačná skupina	7 týždňové myši 10 mg/kg/deň leptínu		
Aplikácia	ľudský leptín	myšací leptín	nosič
celková telesná hmotnosť	31,00 ± 1,3	33,40 ± 1,3	42,70 ± 1,5
tuk celkom [%]			
štíhla hmota celkom [%]			
voda celkom [%]			
inzulín (UIU/ml)	< 2,0	< 2,0	21,4
glukóza (mg/dl)	258,3 ± 26,8	320,0 ± 44,0	789,0 ±152,1

Zloženie tela dokumentuje účinok leptínu na tri telesné zložky: tukovú hmotu, štíhlu hmotu a obsah vody. Z údajov vyplýva, že leptín významne znižuje tukovú hmotu a má len okrajový účinok na štíhlu hmotu. Tento okrajový účinok však nie je štatisticky významný.

Porovnávanie hladín inzulínu a glukózy u myší po aplikácii leptínu a kontrolnej skupiny naznačuje, že leptín znižuje obsah cukru a inzulínu v krvi, čím priaznivo ovplyvňuje tieto diabetické príznaky.

Príklad 17:

Účinok vysokých dávok leptínu na divoké myši

Štíhle kontrolné myši *OB/OB* (C57B1/6J +/?) dostávali raz denne i. p. injekciu 10 mg/kg myšacieho leptínu alebo nosič (PBS). Počas dvoch týždňov bola monitorovaná telesná hmotnosť a príjem potravy. Bolo pozorované významné zníženie príjmu potravy v prvom týždni. Po prvom týždni už však hladiny príjmu po-

travy boli nerozlíšiteľné od kontrolnej skupiny. Po dvoch týždňoch boli zvieratá usmrtené a určené zloženie tela. Výsledky analýzy zloženia tela sú uvedené v tabuľke 12. Výsledky demonštrujú zníženie obsahu tuku u zvierat po aplikácii leptínu oproti kontrolnej skupine, ktorá dostávala PBS.

Tabuľka 12

Skupina	C57B1/6J	telesná hmotnosť	tuk celkom	[%]
proteín	1	17,3	0,30	1,71 %
	2	20,5	2,39	11,65 %
	3	16,9	0,34	1,00 %
	4	18,3	0,84	4,62 %
	5	17,7	0,44	2,51 %
	6	18,7	2,56	13,72 %
	7	15,7	0,37	2,38 %
	8	16,4	0,29	1,79 %
	9	16,5	0,83	2,05 %
	10	14,9		
	priemer	17,3	0,93	5,04 %
	štand. odchýlka	1,6	0,90	4,52 %

Tabuľka 12 (pokračovanie)

Skupina	C57B1/6J	telesná hmotnosť	tuk celkom	[%]
nosič	11	18,8	1,30	6,93 %
	12	17,6	2,17	12,34 %
	13	18,0	2,29	12,74 %
	14	19,6	3,79	19,34 %
	15	18,6	2,35	12,65 %
	16	17,3	1,96	11,32 %
	17	19,3	1,38	7,12 %
	18	20,6	4,16	20,19 %
	19	17,7	1,08	6,13 %
	20	19,5		
	priemer	17,3	0,93	12,09 %
	štand. odchýlka	1,6	0,90	5,08 %

Skupina	C57B1/6J	štíhla hmota celkom	[%]	Voda celkom	[%]
proteín	1	5,00	12,93 %	12,00	69,36 %
	2	5,41	26,40 %	12,70	61,95 %
	3	4,76	28,19 %	11,80	69,82 %
	4	5,16	28,17 %	12,30	67,21 %
	5	4,96	28,00 %	12,30	69,49 %
	6	4,84	25,86 %	11,30	60,43 %
	7	4,53	28,83 %	10,80	68,79 %
	8	4,51	27,48 %	11,60	70,73 %
	9	4,67	28,29 %	11,00	66,67 %
	10			10,40	69,80
	priemer	4,87	27,79 %	11,62	67,43 %
	štand. odchýlka	0,30	1,05 %	0,74	3,52 %
nosič	11	5,00	26,58 %	12,50	66,49 %
	12	4,53	25,58 %	10,90	61,93 %
	13	4,61	25,59 %	11,10	61,67 %
	14	4,61	23,52 %	11,20	57,14 %
	15	4,75	25,52 %	11,50	61,83 %
	16	4,54	26,25 %	10,80	62,43 %
	17	5,02	26,04 %	12,60	66,84 %
	18	4,94	23,98 %	11,50	55,83 %
	19	4,72	26,64 %	11,90	67,23 %
	20			12,30	63,08
	priemer	4,75	12,09 %	11,66	62,45 %
	štand. odchýlka	0,20	5,08 %	0,72	3,83 %

Druhý experiment dokumentuje účinok i. p. injekcie 12,5 mg/kg myšacieho leptínu pri aplikácii dvakrát denne na divokej myši C57B1/6J. Vplyvom polypeptidu došlo k podstatnému zníženiu telesnej hmotnosti a príjmu potravy. Pri tomto experimente boli zvieratá chované v metabolických komorách a kŕmené práškovou diétou Purina #5001. Táto diéta sa odlišovala od predchádzajúcich pokusov, keď potrava obsahovala živiny, tapioku a vodu. Potrava použitá v metabolických komorách mala vyšší obsah, čo vysvetľuje rozdielne množstvo spotrebovanej potravy oproti predchádzajúcim pokusom.

Nasledujúci zoznam odkazov sa týka predkladaného opisu a najmä experimentálnych postupov a diskusií.

Bahary *et al., Genomics,* 11: 33 - 47 (1991).
Bahary *et al., Genomics,* 13:761-769 (1992).
Bahary *et al.,* Molecular mapping of mouse chromosomes 4 and 6: Use of a flow-sorted Robertonian chromosome (1991).
Blank *et* al., *Mammalian Genome,* 1.51 - 78 (1991).
Bogardus *et al., Annals of the New York Academy of Sciences,* 630: 100 - 115 (1991)
Friedman *et al., Mammalian Genome,* 1: 130 - 144 (1991)
Harris, *FASEB J.,* 4.3310 - 3318 (1990).
Jacobowitz *et al., N. Engl. J. Med.,* 315: 96 - 100 (1986).
Kessey, *Obesity,* str. 144 - 166, Stunkard vyd., Philadelphia W. B. Sauders Co. (1980).
Kessey *et al., Ann. Rev. Psychol.,* 37: 109 - 133 (1986).
Liebel *et al.,*„Genetic variation and nutrition in obesity: Approaches to the molecular genetics of obesity", v *Genetic Variation and Nutrition,* str. 90 - 101.1, Simopoulos a Childs vyd., S. Karger, Basel (1990).
Siegel *et al., Cytogenet. Cell Genet.,* 61(3): 184 - 185 (1992).

Tento vynález môže byť uskutočnený i alternatívnymi postupmi bez toho, že by došlo k odchýleniu od jeho rámca či podstatných rysov. Je preto vhodné považovať predkladaný opis vo všetkých ohľadoch za ilustratívny a v žiadnom smere neobmedzujúci rozsah vynálezu, ktorý je naznačený v priložených patentových nárokoch. Všetky významovo ekvivalentné zmeny teda patria do rozsahu predkladaného vynálezu.

Všetky práce v opise sú uvedené v odkazoch.

Predkladaný vynález je realizovateľný podľa predloženého opisu a ľahko prístupných odkazov a východiskových látok. Prihlasovateľ však uložil 9. 7. 1995 v American Type Culture Collection, 12301 Parklaw Drive, Rockville, MD, 20852 - 1178, U. S. A. podľa pravidiel Budapeštianskej dohody o medzinárodnom uznaní registra mikroorganizmov pre účely patentových pokračovaní: *E. coli* H14 obsahujúci plazmid pETH14, pod prírastkovým číslom 69880; *E. coli* M9 obsahujúci plazmid pETM9, pod prírastkovým číslom 69879.

Priemyselná využiteľnosť

Predkladaný vynález prináša modulátory telesnej hmotnosti, látky bielkovinové a nukleotidickej povahy, využiteľné na diagnostické a terapeutické účely humánneho i veterinárneho lekárstva.

Zoznam sekvencií

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:1:

```
GGATCCCTGC TCCAGCAGCT GCAAGGTGCA AGAAGAAGAA GATCCCAGGG AGGAAA          56

ATG TGC TGG AGA CCC CTG TGT CGG TTC CTG TGG CTT TGG TCC TAT CTG        104
Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu
  1               5                  10                  15

TCT TAT GTT CAA GCA GTG CCT ATC CAG AAA GTC CAG GAT GAC ACC AAA        152
Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
             20                  25                  30

ACC CTC ATC AAG ACC ATT GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG        200
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
         35                  40                  45

CAG TCG GTA TCC GCC AAG CAG AGG GTC ACT GGC TTG GAC TTC ATT CCT        248
Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
     50                  55                  60

GGG CTT CAC CCC ATT CTG AGT TTG TCC AAG ATG GAC CAG ACT CTG GCA        296
Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
 65                  70                  75                  80
```

```
GTC TAT CAA CAG GTC CTC ACC AGC CTG CCT TCC CAA AAT GTG CTG CAG      344
Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln
                85                  90                  95

ATA GCC AAT GAC CTG GAG AAT CTC CGA GAC CTC CTC CAT CTG CTG GCC      392
Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala
            100                 105                 110

TTC TCC AAG AGC TGC TCC CTG CCT CAG ACC AGT GGC CTG CAG AAG CCA      440
Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro
        115                 120                 125

GAG AGC CTG GAT GGC GTC CTG GAA GCC TCA CTC TAC TCC ACA GAG GTG      488
Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val
    130                 135                 140

GTG GCT TTG AGC AGG CTG CAG GGC TCT CTG CAG GAC ATT CTT CAA CAG      536
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln
145                 150                 155                 160

TTG GAT GTT AGC CCT GAA TGC TGA AGTTTCAAAG GCCACCAGGC TCCCAAGA       588
Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys  *
                165

ATCATGTAGA GGGAAGAAAC CTTGGCTTCC AGGGGTCTTC AGGAGAAGAG AGCCATGTGC    648

ACACATCCAT CATTCATTTC TCTCCCTCCT GTAGACCACC CATCCAAAGG CATGACTCCA    708

CAATGCTTGA CTCAAGTTAT CCACACAACT TCATGAGCAC AAGGAGGGGC CAGCCTGCAG    768

AGGGGACTCT CACCTAGTTC TTCAGCAAGT AGAGATAAGA GCCATCCCAT CCCCTCCATG    828

TCCCACCTGC TCCGGGTACA TGTTCCTCCG TGGGTACACG CTTCGCTGCG GCCCAGGAGA    888

GGTGAGGTAG GGATGGGTAG AGCCTTTGGG CTGTCTCAGA GTCTTTGGGA GCACCGTGAA    948

GGCTGCATCC ACACACAGCT GGAAACTCCC AAGCAGCACA CGATGGAAGC ACTTATTTAT   1008

TTATTCTGCA TTCTATTTTG GATGGATCTG AAGCAAGGCA TCAGCTTTTT CAGGCTTTGG   1068

GGGTCAGCCA GGATGAGGAA GGCTCCTGGG GTGCTGCTTT CAATCCTATT GATGGGTCTG   1128

CCCGAGGCAA ACCTAATTTT TGAGTGACTG GAAGGAAGGT TGGGATCTTC CAAACAAGAG   1188

TCTATGCAGG TAGCGCTCAA GATTGACCTC TGGTGACTGG TTTTGTTTCT ATTGTGACTG   1248

ACTCTATCCA AACACGTTTG CAGCGGCATT GCCGGGAGCA TAGGCTAGGT TATTATCAAA   1308

AGCAGATGAA TTTTGTCAAG TGTAATATGT ATCTATGTGC ACCTGAGGGT AGAGGATGTG   1368

TTAGAGGGAG GGTGAAGGAT CCGGAAGTGT TCTCTGAATT ACATATGTGT GGTAGGCTTT   1428

TCTGAAAGGG TGAGGCATTT TCTTACCTCT GTGGCCACAT AGTGTGGCTT TGTGAAAAGG   1488

ACAAAGGAGT TGACTCTTTC CGGAACATTT GGAGTGTACC AGGCACCCTT GGAGGGGCTA   1548
```

AAGCTACAGG CCTTTTGTTG GCATATTGCT GAGCTCAGGG AGTGAGGGCC CCACATTTGA 1608

GACAGTGAGC CCCAAGAAAA GGGTCCCTGG TGTAGATCTC CAAGGTTGTC CAGGGTTGAT 1668

CTCACAATGC GTTTCTTAAG CAGGTAGACG TTTGCATGCC AATATGTGGT TCTCATCTGA 1728

TTGGTTCATC CAAAGTAGAA CCCTGTCTCC CACCCATTCT GTGGGGAGTT TTGTTCCAGT 1788

GGGAATGAGA AATCACTTAG CAGATGGTCC TGAGCCCTGG GCCAGCACTG CTGAGGAAGT 1848

GCCAGGGCCC CAGGCCAGGC TGCCAGAATT GCCCTTCGGG CTGGAGGATG AACAAAGGGG 1908

CTTGGGTTTT TCCATCACCC CTGCACCCTA TGTCACCATC AAACTGGGGG GCAGATCAGT 1968

GAGAGGACAC TTGATGGAAA GCAATACACT TTAAGACTGA GCACAGTTTC GTGCTCAGCT 2028

CTGTCTGGTG CTGTGAGCTA GAGAAGCTCA CCACATACAT ATAAAAATCA GAGGCTCATG 2088

TCCCTGTGGT TAGACCCTAC TCGCGGCGGT GTACTCCACC ACAGCAGCAC CGCACCGCTG 2148

GAAGTACAGT GCTGTCTTCA ACAGGTGTGA AAGAACCTGA GCTGAGGGTG ACAGTGCCCA 2208

GGGGAACCCT GCTTGCAGTC TATTGCATTT ACATACCGCA TTTCAGGGCA CATTAGCATC 2268

CACTCCTATG GTAGCACACT GTTGACAATA GGACAAGGGA TAGGGGTTGA CTATCCCTTA 2328

TCCAAAATGC TTGGGACTAG AAGAGTTTTG GATTTTAGAG TCTTTTCAGG CATAGGTATA 2388

TTTGAGTATA TATAAAATGA GATATCTTGG GGATGGGGCC CAAGTATAAA CATGAAGTTC 2448

ATTTATATTT CATAATACCG TATAGACACT GCTTGAAGTG TAGTTTTATA CAGTGTTTTA 2508

AATAACGTTG TATGCATGAA AGACGTTTTT ACAGCATGAA CCTGTCTACT CATGCCAGCA 2568

CTCAAAAACC TTGGGGTTTT GGAGCAGTTT GGATCTTGGG TTTTCTGTTA AGAGATGGTT 2628

AGCTTATACC TAAAACCATA ATGGCAAACA GGCTGCAGGA CCAGACTGGA TCCTCAGCCC 2688

TGAAGTGTGC CCTTCCAGCC AGGTCATACC CTGTGGAGGT GAGCGGGATC AGGTTTTGTG 2748

GTGCTAAGAG AGGAGTTGGA GGTAGATTTT GGAGGATCTG AGGGC 2793

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:2:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 168 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: protein
(A) OPIS: Myšací OB polypeptid

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:2:

```
Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu
 1               5                  10                  15

Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
            20                  25                  30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
        35                  40                  45

Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
    50                  55                  60

Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
65                  70                  75                  80

Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln
                85                  90                  95

Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala
            100                 105                 110

Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro
        115                 120                 125

Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val
    130                 135                 140

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln
145                 150                 155                 160

Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys  *
                165
```

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:3:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 700 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: dvojitý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA
(A) OPIS: Ľudská OB cDNA, kde N predstavuje akýkoľvek nukleotid

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: CDS
(B) UMIESTNENIE: 46..546

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:3:

```
NNNGNNGTTG CAAGGCCCAA GAAGCCCANN NTCCTGGGAA GGAAA ATG CAT TGG          54
                                                    Met His Trp
                                                      1

GGA ACC CTG TGC GGA TTC TTG TGG CTT TGG CCC TAT CTT TTC TAT GTC        102
Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu Phe Tyr Val
      5                  10                  15

CAA GCT GTG CCC ATC CAA AAA GTC CAA GAT GAC ACC AAA ACC CTC ATC        150
Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile
 20                  25                  30                  35

AAG ACA ATT GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG CAG TCA GTC        198
Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val
                 40                  45                  50

TCC TCC AAA CAG AAA GTC ACC GGT TTG GAC TTC ATT CCT GGG CTC CAC        246
Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His
             55                  60                  65

CCC ATC CTG ACC TTA TCC AAG ATG GAC CAG ACA CTG GCA GTC TAC CAA        294
Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln
         70                  75                  80

CAG ATC CTC ACC AGT ATG CCT TCC AGA AAC GTG ATC CAA ATA TCC AAC        342
Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn
     85                  90                  95

GAC CTG GAG AAC CTC CGG GAT CTT CTT CAC GTG CTG GCC TTC TCT AAG        390
Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys
100                 105                 110                 115

AGC TGC CAC TTG CCC TGG GCC AGT GGC CTG GAG ACC TTG GAC AGC CTG        438
Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu
                120                 125                 130

GGG GGT GTC CTG GAA GCT TCA GGC TAC TCC ACA GAG GTG GTG GCC CTG        486
Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu
            135                 140                 145

AGC AGG CTG CAG GGG TCT CTG CAG GAC ATG CTG TGG CAG CTG GAC CTC        534
Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu
        150                 155                 160

AGC CCT GGG TGC TGAGGCCTT GAAGGTCACT CTTCCTGCAA GGACTNACGT             585
Ser Pro Gly Cys
    165
```

TAAGGGAAGG AACTCTGGTT TCCAGGTATC TCCAGGATTG AAGAGCATTG CATGGACACC 645

CCTTATCCAG GACTCTGTCA ATTTCCCTGA CTCCTCTAAG CCACTCTTCC AAAGG 700

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:4:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 167 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: protein
(A) OPIS: Ľudský OB polypeptid

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:4:

```
Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
 1               5                  10                  15

Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
            20                  25                  30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
        35                  40                  45

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
    50                  55                  60

Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
65                  70                  75                  80

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln
                85                  90                  95

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala
            100                 105                 110

Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu
        115                 120                 125

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val
    130                 135                 140

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln
145                 150                 155                 160

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
                165
```

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:5:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 166 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: proteín
(A) OPIS: Myšací OB polypeptid bez Gln na pozícii 49

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Myšací

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:5:

```
Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu
 1               5                  10                  15

Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
            20                  25                  30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
        35                  40                  45

Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly
    50                  55                  60

Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val
65                  70                  75                  80

Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile
                85                  90                  95

Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe
            100                 105                 110

Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu
        115                 120                 125

Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val
    130                 135                 140

Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu
145                 150                 155                 160

Asp Val Ser Pro Glu Cys
                165
```

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:6:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 167 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: protein
(A) OPIS: ľudský OB polypeptid bez Gln na pozícii 49

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:6:

```
Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
 1               5                  10                  15

Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
            20                  25                  30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
        35                  40                  45

Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly
    50                  55                  60

Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val
65                  70                  75                  80

Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile
                85                  90                  95

Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe
            100                 105                 110

Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp
        115                 120                 125

Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val
    130                 135                 140

Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu
145                 150                 155                 160

Asp Leu Ser Pro Gly Cys
                165
```

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:7:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 175 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: dvojitý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genómová)
(A) OPIS: exón 2G7

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:7:

GTGCAAGAAG AAGAAGATCC CAGGGCAGGA AAATGTGCTG GAGACCCCTG TGTCGGGTCC 60

NGTGGNTTTG GTCCTATCTG TCTTATGTNC AAGCAGTGCC TATCCAGAAA GTCCAGGATG 120

ACACCAAAAG CCTCATCAAG ACCATTGTCA NCAGGATCAC TGANATTTCA CACACG 175

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:8:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primérová)
(A) OPIS: PCR 5´ primér pre exón 2G7

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:8:

CCAGGGCAGG AAAATGTG 18

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:9:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 22 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR 3´ primér pre exón 2G7

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: ÁNO

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:9:

CATCCTGGAC TTTCTGGATA GG 22

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:10:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 23 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: peptid
(A) OPIS: putatívny N-terminálový signálny peptid

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:10:

Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu
1 5 10 15

Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro
20

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:11:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 287 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: dvojitý
(D) TOPOLÓGIA: cyklická

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (plazmid)
(A) OPIS: pET-15b expresný vektor

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: T7 promotor
(B) UMIESTNENIE: 20..37

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: lac operátor
(B) UMIESTNENIE: 39..64

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: CDS
(B) UMIESTNENIE: 108..243

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: His-Tag
(B) UMIESTNENIE: 123..137

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: Miesto štiepenia trombínu
(B) UMIESTNENIE: 184..196

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:11:

```
AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG CGGATAACAA      60

TTCCCCTCTA CAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACC ATG GGC AGC      116
                                                    Met Gly Ser
                                                      1

AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC      164
Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
      5                  10                  15

CAT ATG CTC GAG GAT CCC GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG      212
His Met Leu Glu Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys Glu Ala Glu
 20                  25                  30                  35

TTG GCT GCT GCC ACC GCT GAG CAA TAA CTA G CATAACCCCT TGGGGCCTCT      263
Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln  *
                 40

AAACGGGTCT TGAGGGGTTT TTTG                                          287
```

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:12:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 45 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:12:

```
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1               5                  10                  15

Arg Gly Ser His Met Leu Glu Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys
            20                  25                  30

Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln
        35                  40
```

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:13:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 32 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Myšací 5´ primér

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:13:

CTTATGTTCA TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC 32

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:14:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 32 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Myšací 3´ primér

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: ÁNO

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:14:

TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC 32

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:15:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 32 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Ľudský 5´ primér

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:15:

TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC 32

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:16:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 32 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Ľudský 3´ primér

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: ÁNO

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:16:

TTCCTTCCCA TATGGTACTC CTTGCAGGAA GA 32

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:17:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 11 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: dvojitý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA
(A) OPIS: Miesto naviazania akceptora v OB

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: Miesto naviazania akceptora

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:17:

AGCAGTCGGT A 11

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:18:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 16 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: neznáma

(ii) TYP MOLEKULY: peptid
(A) OPIS: fragment OB peptidu

(v) TYP FRAGMENTU: vnútorný

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: Myšací

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:18:

Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:19:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 15 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: neznáma

(ii) TYP MOLEKULY: peptid
(A) OPIS: fragment OB peptidu

(v) TYP FRAGMENTU: vnútorný

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: Myšací

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:19:

Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
1 5 10 15

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:20:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 19 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: neznáma

(ii) TYP MOLEKULY: peptid
(A) OPIS: fragment OB peptidu

(v) TYP FRAGMENTU: vnútorný

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: Myšací

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:20:

Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu
1 5 10 15

Ser Leu Asp

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:21:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: neznáma

(ii) TYP MOLEKULY: peptid
(A) OPIS: fragment OB peptidu

(v) TYP FRAGMENTU: Karboxylový terminál

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: Myšací

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:21:

Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val
1 5 10 15

Ser Pro Glu Cys
20

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:22:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 414 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: dvojitý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genómová)
(A) OPIS: Časť ľudského OB génu obsahujúca nekódujúcu sekvenciu v protismere k prvému exónu, kódujúcu sekvenciu prvého exónu a 5´ oblasť prvého intrónu

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE
(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: CDS
(B) UMIESTNENIE: 38..181

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: 5´ oblasť prvého intrónu
(B) UMIESTNENIE: 182..414

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: 5´ nekódujúca sekvencia ľudského OB génu, z ktorého bol generovaný HOB 1gF DNA primér
(B) UMIESTNENIE: 11..28

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: intrónová sekvencia ľudského OB génu, z ktorého bol generovaný HOB 1gR primér
(B) UMIESTNENIE: 241..260

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:22:

```
GGTTGCAAGG CCCAAGAAGC CCATCCTGGG AAGGAAA ATG CAT TGG GGA ACC CTG      55
                                          Met His Trp Gly Thr Leu
                                            1               5

TGC GGA TTC TTG TGG CTT TGG CCC TAT CTT TTC TAT GTC CAA GCT GTG      103
Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu Phe Tyr Val Gln Ala Val
             10                  15                  20

CCC ATC CAA AAA GTC CAA GAT GAC ACC AAA ACC CTC ATC AAG ACA ATT      151
Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
         25                  30                  35

GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG GTAAGGAGAG TATGCGGGGA       201
Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
     40                  45

CAAAGTAGAA CTGCAGCCAG CCCAGCACTG GCTCCTAGTG GCACTGGACC CAGATAGTCC   261

AAGAAACATT TATTGAACGC CTCCTGAATG CCAGGCACCT ACTGGAAGCT GAGAAGGATT   321

TTGGATAGCA CAGGGCTCCA CTCTTTCTGG TTGTTTCTTN TGGCCCCCTC TGCCTGCTGA   381

GATNCCAGGG GTTAGNGGTT CTTAATTCCT AAA                                414
```

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:23:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 48 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: proteín
(A) OPIS: N-terminálová časť ľudského OB proteínu zakódovaná prvým exónom

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:23:

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1 5 10 15

Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
20 25 30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
35 40 45

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:24:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 801 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: dvojitý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genómová)
(A) OPIS: Časť ľudského OB génu obsahujúca 3´ oblasť prvého intrónu, kódujúcu sekvenciu druhého exónu a 3´ nekódujúcu sekvenciu

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: ľudský

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: CDS
(B) UMIESTNENIE: 291..648

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: 3´ oblasť prvého intrónu
(B) UMIESTNENIE: 1..290

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: intrónová sekvencia ľudského OB génu, z ktorého bol generovaný HOB 2gF DNA primér
(B) UMIESTNENIE: 250..269

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: 3´ nekódujúca sekvencia ľudského OB génu, z ktorého bol generovaný HOB 2gR primér
(B) UMIESTNENIE: 707..728

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:24:

```
CTGGTTCTTT CAGGAAGAGG CCATGTAAGA GAAAGGAATT GACCTAGGGA AAATTGGCCT      60

GGGAAGTGGA GGGAACGGAT GGTGTGGGAA AAGCAGGAAT CTCGGAGACC AGCTTAGAGG     120

CTTGGCAGTC ACCTGGGTGC AGGANACAAG GGCCTGAGCC AAAGTGGTGA GGGAGGGTGG     180

AAGGAGACAG CCCAGAGAAT GACCCTCCAT GCCCACGGGG AAGGCAGAGG GCTCTGAGAG     240

CGATTCCTCC CACATGCTGA GCACTTGTTC TCCCTCTTCC TCCTNCATAG CAG TCA         296
                                                          Gln Ser
                                                            1

GTC TCC TCC AAA CAG AAA GTC ACC GGT TTG GAC TTC ATT CCT GGG CTC        344
Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu
          5                  10                  15

CAC CCC ATC CTG ACC TTA TCC AAG ATG GAC CAG ACA CTG GCA GTC TAC        392
His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr
     20                  25                  30

CAA CAG ATC CTC ACC AGT ATG CCT TCC AGA AAC GTG ATC CAA ATA TCC        440
Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser
 35                  40                  45                  50

AAC GAC CTG GAG AAC CTC CGG GAT CTT CTT CAC GTG CTG GCC TTC TCT        488
Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser
                 55                  60                  65

AAG AGC TGC CAC TTG CCC TGG GCC AGT GGC CTG GAG ACC TTG GAC AGC        536
Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser
             70                  75                  80

CTG GGG GGT GTC CTG GAA GCT TCA GGC TAC TCC ACA GAG GTG GTG GCC        584
Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala
         85                  90                  95

CTG AGC AGG CTG CAG GGG TCT CTG CAG GAC ATG CTG TGG CAG CTG GAC        632
Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp
    100                 105                 110

CTC AGC CCT GGG TGC T GAGGCCTTGA AGGTCACTCT TCCTGCAAGG ACTACGTTAA      688
Leu Ser Pro Gly Cys
115

GGGAAGGAAC TCTGGCTTTC CAGGTATCTC CAGGATTGAA GAGCATTGCA TGGACACCCC      748

TTATCCAGGA CTCTGTCAAT TTCCCTGACT CCTCTAAGCC ACTCTTCCAA AGG             801
```

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:25:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 119 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: proteín
(A) OPIS: C-terminálová časť ľudského OB proteínu zakódovaná druhým exónom

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:25:

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
1 5 10 15

Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
20 25 30

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln
35 40 45

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala
50 55 60

Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu
65 70 75 80

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val
85 90 95

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln
100 105 110

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
115

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:26:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 8 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: neznáma

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(v) TYP FRAGMENTU: vnútorný

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: kvasinky pichia

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:26:

Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala
1 5

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:27:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 4 aminokyseliny
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: neznáma

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(v) TYP FRAGMENTU: vnútorný

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: kvasinky pichia

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:27:

Glu Ala Glu Ala
1

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:28:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 4 aminokyseliny
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: neznáma

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(v) TYP FRAGMENTU: vnútorný

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:
(A) ORGANIZMUS: kvasinky pichia

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:28:

Leu Glu Lys Arg
1

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:29:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: HOB 1gF DNA primér generovaný z 5´nekódujúcej sekvencie ıcoding ľudského OB génu

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:29:

CCCAAGAAGC CCATCCTG 18

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:30:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: HOB 1gR DNA primér generovaný z prvej intrónovej sekvencie ľudského OB génu

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: ÁNO

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:30:

GACTATCTGG GTCCAGTGCC 20

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:31:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)

(A) OPIS: HOB 2gF DNA primér generovaný z prvej intrónovej sekvencie ľudského OB génu

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:31:

CCACATGCTG AGCACTTGTT 20

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:32:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 22 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: HOB 2gR DNA primér generovaný z 3´ nekódujúcej sekvencie ľudského OB génu

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: ÁNO

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:32:

CTTCAATCCT GGAGATACCT GG 22

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:33:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 51 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: dvojitý
(D) TOPOLÓGIA: cyklická

(ii) TYP MOLEKULY: DNA
(A) OPIS: pPIC.9 klonovacie miesto

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:33:

CTCGAGAAAA GAGAGGCTGA AGCTTACGTA GAATTCCCTA GGCCGGCCGG G 51

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:34:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 40 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR 5´ primér na zosilnenie ľudskej OB cDNA sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:34:

GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCCATCCAA AAAGTCCAAG 40

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:35:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 31 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR 3´ primér na zosilnenie ľudskej OB cDNA sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: ÁNO

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:35:

GCGCGAATTC TCAGCACCCA GGGCTGAGGT C 31

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:36:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 40 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR 5´ primér na zosilnenie myšacej OB cDNA sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:36:

GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCTATCCAG AAAGTCCAGG 40

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:37:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 31 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR 3´ primér na zosilnenie myšacej OB cDNA sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: ÁNO

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:37:

GCGCGAATTC TCAGCATTCA GGGCTAACAT C 31

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:38:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 4 aminokyseliny
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: proteín
(A) OPIS: tetrapeptid na N-terminálí renaturalizovaného myšacieho OB proteínu po štiepení trombínu

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Myšací

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:38:

Gly Ser His Met
1

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:39:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 19 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)

(A) OPIS: PCR primér sWSS1734 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:39:

CAAGACAAAT GAGATAAGG 19

(2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:40:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1734 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:40:

AGAGTTACAG CTTTACAG 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:41:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 19 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS494 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:41:

CTAAACACCT TTCCATTCC 19

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:42:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 22 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS494 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:42:

TTATATTCAC TTTTCCCCTC TC 22

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:43:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS883 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:43:

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:44:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS883 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÓVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:44:

GTGCAGCTTT AATTGTGAGC 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:45:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2359 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÓVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:45:

AGTGTTGTGT TTCTCCTG 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:46:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 19 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2359 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÓVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:46:

AAAGGGGATG TGATAAGTG 19

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:47:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2336 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:47:

GGTGTTACGT TTAGTTAC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:48:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2336 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:48:

GGAATAATGA GAGAAGATTG 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:49:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)

(A) OPIS: PCR primér sWSS1218 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:49:

GCTCAACTGA CAGAAAAC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:50:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1218 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:50:

GACTATGTAA AAGAAATGCC 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:51:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1402 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:51:

AAAGGGCTTC TAATCTAC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:52:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1402 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:52:

CCTTCCAACT TCTTTGAC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:53:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS999 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:53:

TAAACCCCCT TTCTGTTC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:54:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 19 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS999 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:54:

TTGCATAATA GTCACACCC 19

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:55:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 22 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1751 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:55:

CCAAAATCAG AATTGTCAGA AG 22

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:56:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1751 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:56:

AAACCGAAGT TCAGATACAG 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:57:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1174 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:57:

AATATCTGAC ATTGGCAC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:58:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1174 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:58:

TTAGACCTGA GAAAAGAG 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:59:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 19 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)

(A) OPIS: PCR primér sWSS2061 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:59:

GTTGCACAAT ACAAAATCC 19

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:60:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2061 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:60:

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:61:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2588 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:61:

ATCACTACAC ACCTAATC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:62:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2588 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:62:

CCATTCTACA TTTCCACC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:63:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 24 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS808 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:63:

GGCTGTGTGA GCAAGATCCT AGGA 24

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:64:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 23 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS808 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:64:

TTGCCAGGCA AAGAGGGCTG GAC 23

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:65:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1392 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÓVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:65:

CTCAGGTATG TCTTTATC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:66:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1392 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÓVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:66:

TGTCTCTGCA TTCTTTTC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:67:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1148 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:67:

GACACATACA AACACAAG 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:68:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 19 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1148 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:68:

ATTGAGTTGA GTGTAGTAG 19

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:69:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1529 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:69:

CAGGGATTTC TAATTGTC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:70:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS1529 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:70:

AAAAGATGGA GGCTTTTG 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:71:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 21 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2619 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:71:

CGTTAAGGGA AGGAACTCTG G 21

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:72:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2619 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÓVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:72:

TGGCTTAGAG GAGTCAGGGA 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:73:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS404 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÓVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:73:

ACCAGGGTCA ATACAAAG 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:74:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS404 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÓVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:74:

TAATGTGTCC TTCTTGCC 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:75:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2367 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:75:

CAATCCTGGC TTCATTTG 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:76:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 18 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: PCR primér sWSS2367 zodpovedajúci označenému miestu sekvencie

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:76:

AAGGTGGGTA GGATGCTA 18

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:77:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker UT528

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:77:

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:78:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker UT528

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:78:

GTGCAGCTTT AATTGTGAGC 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:79:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFMa065zg9

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:79:

AGCTTCAAGA CTTTNAGCCT 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:80:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 19 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFMa065zg9

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:80:

GGTCAGCAGC ACTGTGATT 19

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:81:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 19 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFMa125wh1

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:81:

TCACCTTGAG ATTCCATCC 19

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:82:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFMa125wh1

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:82:

AACACCGTGG TCTTATCAAA 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:83:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)

(A) OPIS: Marker AFM309yf10

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:83:

CATCCAAGTT GGCAGTTTTT 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:84:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFM309yf10

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:84:

AGATGCTGAA TTCCCAGACA 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:85:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 16 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFM218xf10

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:85:

TGGGCAACAC AGCAAA 16

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:86:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFM218xf10

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:86:

TGCAGTTAGT GCCAATGTCA 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:87:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 16 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFM206xc1

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:87:

CCAGGCCATG TGGAAC 16

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:88:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFM206xc1

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:88:

AGTTCTTGGC TTGCGTCAGT 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:89:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 16 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFM199xh12

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:89:

TCTGATTGCT GGCTGC 16

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:90:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 17 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFM199xh12

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:90:

GCGCGTGTGT ATGTGAG 17

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:91:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFMa345wc9

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:91:

AGCTCTTGGC AAACTCACAT 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:92:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Marker AFMa345wc9

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Ľudský

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:92:

GCCTAAGGGA ATGAGACACA 20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:93:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 24 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: jednoduchý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: primér pre myšací Pax4 gén

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Myšací

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:93:

GGGAGCCTTG TCCTGGGTAC AAAG 24

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:94:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 491 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: dvojitý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (primér)
(A) OPIS: Rekombinantný myšací MET OB

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: Myšací

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: CDS
(B) UMIESTNENIE: 41..478

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:94:

```
TCTAGATTTG AGTTTTAACT TTTAGAAGGA GGAATAACAT ATG GTA CCG ATC CAG      55
                                            Met Val Pro Ile Gln
                                              1               5

AAA GTT CAG GAC GAC ACC AAA ACC TTA ATT AAA ACG ATC GTT ACG CGT     103
Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg
                 10                  15                  20

ATC AAC GAC ATC AGT CAC ACC CAG TCG GTC TCC GCT AAA CAG CGT GTT     151
Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val
             25                  30                  35
```

```
ACC GGT CTG GAC TTC ATC CCG GGT CTG CAC CCG ATC CTA AGC TTG TCC      199
Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser
         40                  45                  50

AAA ATG GAC CAG ACC CTG GCT GTA TAC CAG CAG GTG TTA ACC TCC CTG      247
Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu
     55                  60                  65

CCG TCC CAG AAC GTT CTT CAG ATC GCT AAC GAC CTC GAG AAC CTT CGC      295
Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg
 70                  75                  80                  85

GAC CTG CTG CAC CTG CTG GCA TTC TCC AAA TCC TGC TCC CTG CCG CAG      343
Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln
                 90                  95                 100

ACC TCA GGT CTT CAG AAA CCG GAA TCC CTG GAC GGG GTC CTG GAA GCA      391
Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala
            105                 110                 115

TCC CTG TAC AGC ACC GAA GTT GTT GCT CTG TCC CGT CTG CAG GGT TCC      439
Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser
        120                 125                 130

CTT CAG GAC ATC CTT CAG CAG CTG GAC GTT TCT CCG GAA TGT TAATGGA      488
Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys
    135                 140                 145

TCC                                                                  491
```

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:95:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 146 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: proteín
(A) OPIS: Rekombinantný myšací MET OB proteín

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:95:

```
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1               5                  10                  15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
            20                  25                  30

Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
        35                  40                  45

Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
    50                  55                  60
```

```
Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp
 65                  70                  75                  80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser
                 85                  90                  95

Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp
            100                 105                 110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
        115                 120                 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser
    130                 135                 140

Pro Glu Cys
145
```

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:96:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 454 základných párov
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) REŤAZEC: dvojitý
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: DNA
(A) OPIS: Rekombinantný ľudský MET OB

(iii) PODMIENENOSŤ: NIE

(iv) ANTI-SENSE: NIE

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ
(A) ORGANIZMUS: ľudský

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:
(A) NÁZOV/KĽÚČ: CDS
(B) UMIESTNENIE: 4..444

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:96:

```
CAT ATG GTA CCG ATC CAG AAA GTT CAG GAC GAC ACC AAA ACC TTA ATT        48
    Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile
      1               5                  10                  15

AAA ACG ATC GTT ACG CGT ATC AAC GAC ATC AGT CAC ACC CAG TCG GTG        96
Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val
                 20                  25                  30

AGC TCT AAA CAG CGT GTT ACA GGC CTG GAC TTC ATC CCG GGT CTG CAC       144
Ser Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His
            35                  40                  45
```

```
CCG ATC CTG ACC TTG TCC AAA ATG GAC CAG ACC CTG GCT GTA TAC CAG      192
Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln
         50                  55                  60

CAG ATC TTA ACC TCC ATG CCG TCC CGT AAC GTT CTT CAG ATC TCT AAC      240
Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Leu Gln Ile Ser Asn
     65                  70                  75

GAC CTC GAG AAC CTT CGC GAC CTG CTG CAC GTG CTG GCA TTC TCC AAA      288
Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys
 80                  85                  90                  95

TCC TGC CAC CTG CCA TGG GCT TCA GGT CTT GAG ACT CTG GAC TCT CTG      336
Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu
                100                 105                 110

GGC GGG GTC CTG GAA GCA TCC GGT TAC AGC ACC GAA GTT GTT GCT CTG      384
Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu
            115                 120                 125

TCC CGT CTG CAG GGT TCC CTT CAG GAC ATG CTT TGG CAG CTG GAC CTG      432
Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu
        130                 135                 140

TCT CCG GGT TGT TAATGGATCC                                          454
Ser Pro Gly Cys
    145
```

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:97:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 147 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: protein
(A) OPIS: Rekombinantný ľudský MET OB protein

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:97:

```
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1               5                  10                  15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
            20                  25                  30

Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
        35                  40                  45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
    50                  55                  60

Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Leu Gln Ile Ser Asn Asp
65                  70                  75                  80
```

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Gly Cys
145

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:98:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 21 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(v) TYP FRAGMENTU: N-terminálny His-tag

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:98:

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met
20

2) INFORMÁCIE PRE ID.Č.SEKV.:99:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:
(A) DĹŽKA: 20 aminokyselín
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLÓGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(v) TYP FRAGMENTU: N-terminálny His-tag

(xi) OPIS SEKVENCIE: ID.Č.SEKV.:99:

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser Pro
20

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Obezitný polypeptid OB obsahujúci 145 až 167 aminokyselín, ktorý moduluje telesnú hmotnosť zvierat, kde tento obezitný polypeptid OB obsahuje aminokyselinové sekvencie SEQ ID č. 2, 4, 5 alebo 6.

2. OB polypeptid podľa nároku 1, obsahujúci jeden alebo viac farmaceuticky akceptovateľných polymérov, rozpustných vo vode, k nemu pripojených.

3. Analóg OB polypeptidu podľa nároku 1, ktorý má sekvenciu z 83 % alebo viac homológnu s aminokyselinou sekvenciou OB polypeptidu SEQ ID č. 2, 4, 5 alebo 6.

4. Imunogénny fragment OB polypeptidu vybraný zo skupiny pozostávajúcej z:
Val-Pro-Ile-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr, SEQ ID č. 18;
Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala, SEQ ID č. 19;
Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp, SEQ ID č. 20; a
Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys SEQ ID č. 21.

5. Analóg ľudského OB polypeptidu, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č. 4 alebo SEQ ID č. 6, kde jedna alebo viac aminokyselín vybraných zo skupiny pozostávajúcej z aminokyselín 53, 71, 85, 89, 92, 98, 110, 118, 121, 122, 126, 127, 128, 129, 132, 139, 157, 159, 163 a 166 zo SEQ ID č. 4 je substituovaných inou prirodzenou aminokyselinou.

6. Analóg ľudského OB polypeptidu podľa nároku 5, kde substitúcie sú uskutočnené s divergentnými aminokyselinami myšieho OB polypeptidu SEQ ID č. 2 alebo SEQ ID č. 5.

7. Analóg ľudského OB polypeptidu podľa nároku 5, kde substitúcia je uskutočnená s alanínom.

8. Analóg ľudského OB polypeptidu podľa nároku 5 vybraný zo skupiny pozostávajúcej z polypeptidov, kde:
a) serínový zvyšok v polohe 53 je substituovaný s glycínom, alanínom, valínom, cysteínom, metionínom alebo treonínom;
b) serínový zvyšok v polohe 98 je substituovaný s glycínom, alanínom, valínom, cysteínom, metionínom alebo treonínom; a
c) arginínový zvyšok v polohe 92 je substituovaný s asparagínom, lyzínom, histidínom, glutamínom, kyselinou glutámovou, kyselinou asparágovou, serínom, treonínom, metionínom alebo cysteínom.

9. Analóg OB polypeptidu, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu zo SEQ ID č. 2, 4, 5 alebo 6, vybraný zo skupiny pozostávajúcej z polypeptidov, kde:
a) jeden alebo viac zvyškov kyseliny asparágovej je substituovaných s kyselinou glutámovou;
b) jeden alebo viac izoleucínových zvyškov je substituovaných s leucínom; a
c) jeden alebo viac glycínových alebo valínových zvyškov je substituovaných s alanínom;
d) jeden alebo viac arginínových zvyškov je substituovaných s histidínom;
e) jeden alebo viac tyrozínových alebo fenylalanínových zvyškov je substituovaných s tryptofánom; a
f) jeden alebo viac zvyškov v polohách 121 až 128 podľa číslovania zo SEQ ID č. 4, je substituovaných s glycínom alebo alanínom; a
g) jeden alebo viac zvyškov v polohách 54 až 60 alebo 118 až 166 podľa číslovania zo SEQ ID č. 4 je substituovaných s lyzínom, kyselinou glutámovou, cysteínom alebo prolínom.

10. OB polypeptid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1, 2, 5 alebo 6 vybraný zo skupiny pozostávajúcej z polypeptidov:
a) majúcich deletované zvyšky 1 až 21 za vzniku maturovaného polypeptidu, a
b) polypeptidov z a) ďalej majúcich metionínový zvyšok bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu, alebo
majúcich sekvenciu glycín-serín-histidín-metionín SEQ ID č. 38 bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu, alebo histidín-metionín, SEQ ID č. 98 bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu.

11. OB polypeptid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1, 2, 5 alebo 6 vybraný zo skupiny pozostávajúcej z polypeptidov:
a) majúcich deletované zvyšky 1 až 21 za vzniku maturovaného polypeptidu; a
b) polypeptidov z a) ďalej majúcich sekvenciu leucín-kyselina glutámová-lysín-arginín-kyselina glutámová-alanín-kyselina glutámová-alanín, SEQ ID č. 26 bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu, alebo
majúcich sekvenciu kyselina glutámová-alanín-kyselina glutámová-alanín, SEQ ID č. 27, bezprostredne na N-konci maturovaného peptidu, alebo
majúcich sekvenciu leucín-kyselina glutámová-lyzín-arginín, SEQ ID č. 28, bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu, alebo
majúcich sekvenciu metionín-glycín-serín-serín-histidín-histidín-histidín-histidín-histidín-histidín-serín-serín-glycín-leucín-valín-prolín-arginín-glycín-serín-prolín SEQ ID č. 99, bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu, alebo
majúcich sekvenciu glycín-serín-prolín, bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu.

12. OB polypeptid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3, 7, 8 alebo 9 vybraný zo skupiny pozostávajúcej z polypeptidov:
a) majúcich deletované zvyšky 1 až 21 za vzniku maturovaného polypeptidu; a
b) polypeptidov z a) majúcich metionínový zvyšok bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu alebo
sekvenciu glycín-serín-histidin-metionín, SEQ ID č. 38, bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu alebo
sekvenciu metionín-glycín-serín-serín-histidín-histidín-histidín-histidín-histidín-histidín-serín-serín-glycín--leucín-valín-prolín-arginín-glycín-serín-histidín-metionín, SEQ ID č. 98, bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu alebo majúcich sekvenciu leucín-kyselina glutámová-lysín-arginín-kyselina glutámová-alanín-kyselina glutámová-alanín, SEQ ID č. 26, v polohách 14 až 21, alebo
majúcich sekvenciu kyselina glutámová-alanín-kyselina glutámová-alanín, SEQ ID č. 27, bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu, alebo majúcich sekvenciu leucín-kyselina glutámová-lyzín-arginín, SEQ ID č. 28, bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu,
alebo majúcich sekvenciu metionín-glycín-serín-serín-histidín-histidín-histidín--histidín-histidín-histidín-serín-serín-glycín-leucín-valín-prolín-arginín-glycín--serín-prolín, SEQ ID č. 99, bezprostredne na N-konci maturovaného polypeptidu alebo majúcich sekvenciu glycín-serín-prolín v polohách 18 až 21.

13. Skrátený analóg ľudského alebo myšieho OB polypeptidu, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č. 2, 4, 5 alebo 6, kde tento analóg je skrátený deléciou aminokyselinových zvyškov vybraných zo skupiny podľa číslovania zo SEQ ID č. 4, pozostávajúcich z
a) je jeden alebo viac zvyškov v polohách 121 až 128;
b) zvyškov 1 až 116;
c) zvyškov 1 až 21 a 54 až 167;
d) zvyškov 1 až 60 a 117 až 167;
e) zvyškov 1 až 60;
f) zvyškov 1 až 53;
g) analógu z a), kde zvyšky 1 až 21 sú deletované; a
h) analógu z a) až g) majúci N-koncovú aminokyselinu alebo aminokyselinovú sekvenciu vybranú zo skupiny pozostávajúcej z:
1. metionínu,
2. sekvencie glycín-serín-histidín-metionín, SEQ ID č. 38;
3. sekvencie metionín-glycín-serín-serín-histidín-histidín-histidín--histidín-histidín-histidín-histidín-serín-serín-glycín-leucín-valín--prolín-arginín-glycín-serín-histidín-metionín, SEQ ID č. 98;
4. sekvencie leucín-kyselina glutámová-lysín-arginín-kyselina glutámová-alanín-kyselina glutámová-alanín, SEQ ID č. 26;
5. sekvencie kyselina glutámová-alanín-kyselina glutámová-alanín, SEQ IDč. 27;
6. sekvencie leucín-kyselina glutámová-lyzín-arginín, SEQ ID č. 28;
7. sekvencie metionín-glycín-serín-serín-histidín-histidín-histidín--histidín-histidín-histidín-serín-serín-glycín-leucín-valín-prolín--arginín-glycín-serín-prolín, SEQ ID č. 99; a
8. sekvencie glycín-serín-prolín.

14. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujúca OB polypeptid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9 alebo 13.

15. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujej OB polypeptid podľa nároku 10.

16. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujej OB polypeptid podľa nároku 11.

17. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujej OB polypeptid podľa nároku 12.

18. Molekula DNA na použitie v expresii OB polypeptidu podľa nároku 1 majúceho biologickú aktivitu modulátoru telesnej hmotnosti u zvierat, ktorá je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z:
a) molekuly DNA podľa SEQ ID č. 1 a 3;
b) molekuly DNA, hybridizujúcej s molekulami DNA definovanými v a) v zmiernených prísnych podmienkach; a
c) molekuly DNA, kódujúcej expresiu aminokyselinovej sekvencie kódovanej ktoroukoľvek z molekúl DNA definovanú skôr.

19. Detegovateľne značená molekula nukleovej kyseliny, ktorá hybridizuje v zmiernených prísnych podmienkach s molekulou DNA podľa nároku 14.

20. Detegovateľne značená molekula nukleovej kyseliny, ktorá hybridizuje v zmiernených prísnych podmienkach s molekulou DNA podľa ktoréhokoľvek z nárokov 15, 16 alebo 17.

21. Detegovateľne značená molekula nukleovej kyseliny, ktorá hybridizuje v zmiernených prísnych podmienkach s molekulou DNA podľa nároku 18.

22. Vektor, ktorý obsahuje molekulu DNA vybranú zo skupiny pozostávajúcej z:
a) molekuly nukleovej kyseliny podľa nároku 14,

b) molekuly nukleovej kyseliny podľa nároku 14, operatívne pripojenej k expresnej kontrolnej sekvencii.

23. Vektor obsahujúci molekulu DNA, vybranú zo skupiny pozostávajúcej z:

a) molekuly DNA podľa ktoréhokoľvek z nárokov 15, 16 alebo 17,

b) molekuly DNA podľa ktoréhokoľvek z nárokov 15, 16 alebo 17 operatívne pripojenej k expresnej kontrolnej sekvencií.

24. Vektor obsahujúci molekulu DNA, vybranú zo skupiny pozostávajúcej z:

a) DNA molekuly podľa nároku 18,

b) DNA molekuly podľa nároku 18, operatívne pripojenej k expresnej kontrolnej sekvencií.

25. Protilátka, alebo jej fragment, viažuca antigén, špecifická k OB polypeptidu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9 alebo 13.

26. Protilátka, alebo jej fragment, viažuca antigén, podľa nároku 25, ktorá je detegovateľne značená.

27. Farmaceutický prostriedok znižujúci telesnú hmotnosť zvierat, **vyznačujúci sa tým,** že obsahuje OB polypeptid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6 alebo 13 a farmaceuticky prijateľný nosič.

67 výkresov

```
GGATCCCTGCTCCAGCAGCTGCAAGGTGCAAGAAGAAGAAGATCCCAGGGAGGAAAATGTG   61
                                                      M  C       2

CTGGAGACCCCTGTGTCGGTTCCTGTGGCTTTGGTCCTATCTGTCTTATGTTCAAGCAGT  121
 W  R  P  L  C  R  F  L  W  L  W  S  Y  L  S  Y  V  Q  A  V    22

GCCTATCCAGAAAGTCCAGGATGACACCAAAACCCTCATCAAGACCATTGTCACCAGGAT  181
 P  I  Q  K  V  Q  D  D  T  K  T  L  I  K  T  I  V  T  R  I    42

CAATGACATTTCACACACGCAGTCGGTATCCGCCAAGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTT  241
 N  D  I  S  H  T  Q  S  V  S  A  K  Q  R  V  T  G  L  D  F    62

CATTCCTGGGCTTCACCCCATTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTA  301
 I  P  G  L  H  P  I  L  S  L  S  K  M  D  Q  T  L  A  V  Y    82

TCAACAGGTCCTCACCAGCCTGCCTTCCCAAAATGTGCTGCAGATAGCCAATGACCTGGA  361
 Q  Q  V  L  T  S  L  P  S  Q  N  V  L  Q  I  A  N  D  L  E   102

GAATCTCCGAGACCTCCTCCATCTGCTGGCCTTCTCCAAGAGCTGCTCCCTGCCTCAGAC  421
 N  L  R  D  L  L  H  L  L  A  F  S  K  S  C  S  L  P  Q  T   122

CAGTGGCCTGCAGAAGCCAGAGAGCCTGGATGGCGTCCTGGAAGCCTCACTCTACTCCAC  481
 S  G  L  Q  K  P  E  S  L  D  G  V  L  E  A  S  L  Y  S  T   142
```

Obr. 1A

```
AGAGGTGGTGGCTTTGAGCAGGCTGCAGGGCTCTCTGCAGGACATTCTTCAACAGTTGGA   541
 E  V  V  A  L  S  R  L  Q  G  S  L  Q  D  I  L  Q  Q  L  D    162

TGTTAGCCCTGAATGCTGAAGTTTCAAAGGCCACCAGGCTCCCAAGAATCATGTAGAGGG   601
 V  S  P  E  C  *                                              167

AAGAAACCTTGGCTTCCAGGGGTCTTCAGGAGAAGAGAGCCATGTGCACACATCCATCAT   661

TCATTTCTCTCCCTCCTGTAGACCACCCATCCAAAGGCATGACTCCACAATGCTTGACTC   721

AAGTTATCCACACAACTTCATGAGCACAAGGAGGGGCCAGCCTGCAGAGGGGACTCTCAC   781

CTAGTTCTTCAGCAAGTAGAGATAAGAGCCATCCCATCCCCTCCATGTCCCACCTGCTCC   841

GGGTACATGTTCCTCCGTGGGTACACGCTTCGCTGCGGCCCAGGAGAGGTGAGGTAGGGA   901

TGGGTAGAGCCTTTGGGCTGTCTCAGAGTCTTTGGGAGCACCGTGAAGGCTGCATCCACA   961

CACAGCTGGAAACTCCCAAGCAGCACACGATGGAAGCACTTATTTATTTATTCTGCATTC  1021

TATTTTGGATGGATCTGAAGCAAGGCATCAGCTTTTTCAGGCTTTGGGGGTCAGCCAGGA  1081

TGAGGAAGGCTCCTGGGGTGCTGCTTTCAATCCTATTGATGGGTCTGCCCGAGGCAAACC  1141
```

Obr. 1B

TAATTTTTGAGTGACTGGAAGGAAGGTTGGGATCTTCCAAACAAGAGTCTATGCAGGTAG 1201

CGCTCAAGATTGACCTCTGGTGACTGGTTTTGTTTCTATTGTGACTGACTCTATCCAAAC 1261

ACGTTTGCAGCGGCATTGCCGGGAGCATAGGCTAGGTTATTATCAAAAGCAGATGAATTT 1321

TGTCAAGTGTAATATGTATCTATGTGCACCTGAGGGTAGAGGATGTGTTAGAGGGAGGGT 1381

GAAGGATCCGGAAGTGTTCTCTGAATTACATATGTGTGGTAGGCTTTTCTGAAAGGGTGA 1441

GGCATTTTCTTACCTCTGTGGCCACATAGTGTGGCTTTGTGAAAAGGACAAAGGAGTTGA 1501

CTCTTTCCGGAACATTTGGAGTGTACCAGGCACCCTTGGAGGGGCTAAAGCTACAGGCCT 1561

TTTGTTGGCATATTGCTGAGCTCAGGGAGTGAGGGCCCCACATTTGAGACAGTGAGCCCC 1621

AAGAAAAGGGTCCCTGGTGTAGATCTCCAAGGTTGTCCAGGGTTGATCTCACAATGCGTT 1681

TCTTAAGCAGGTAGACGTTTGCATGCCAATATGTGGTTCTCATCTGATTGGTTCATCCAA 1741

AGTAGAACCCTGTCTCCCACCCATTCTGTGGGGAGTTTTGTTCCAGTGGGAATGAGAAAT 1801

CACTTAGCAGATGGTCCTGAGCCCTGGGCCAGCACTGCTGAGGAAGTGCCAGGGCCCCAG 1861

Obr. 1C

GCCAGGCTGCCAGAATTGCCCTTCGGGCTGGAGGATGAACAAAGGGGCTTGGGTTTTTCC 1921

ATCACCCCTGCACCCTATGTCACCATCAAACTGGGGGGCAGATCAGTGAGAGGACACTTG 1981

ATGGAAAGCAATACACTTTAAGACTGAGCACAGTTTCGTGCTCAGCTCTGTCTGGTGCTG 2041

TGAGCTAGAGAAGCTCACCACATACATATAAAAATCAGAGGCTCATGTCCCTGTGGTTAG 2101

ACCCTACTCGCGGCGGTGTACTCCACCACAGCAGCACCGCACCGCTGGAAGTACAGTGCT 2161

GTCTTCAACAGGTGTGAAAGAACCTGAGCTGAGGGTGACAGTGCCCAGGGGAACCCTGCT 2221

TGCAGTCTATTGCATTTACATACCGCATTTCAGGGCACATTAGCATCCACTCCTATGGTA 2281

GCACACTGTTGACAATAGGACAAGGGATAGGGGTTGACTATCCCTTATCCAAAATGCTTG 2341

GGACTAGAAGAGTTTTGGATTTTAGAGTCTTTTCAGGCATAGGTATATTTGAGTATATAT 2401

AAAATGAGATATCTTGGGGATGGGGCCCAAGTATAAACATGAAGTTCATTTATATTTCAT 2461

AATACCGTATAGACACTGCTTGAAGTGTAGTTTTATACAGTGTTTTAAATAACGTTGTAT 2521

GCATGAAAGACGTTTTTACAGCATGAACCTGTCTACTCATGCCAGCACTCAAAAACCTTG 2581

Obr. 1D

GGGTTTTGGAGCAGTTTGGATCTTGGGTTTTCTGTTAAGAGATGGTTAGCTTATACCTAA 2641

AACCATAATGGCAAACAGGCTGCAGGACCAGACTGGATCCTCAGCCCTGAAGTGTGCCCT 270[illegible]

TCCAGCCAGGTCATACCCTGTGGAGGTGAGCGGGATCAGGTTTTGTGGTGCTAAGAGAGG 2761

AGTTGGAGGTAGATTTTGGAGGATCTGAGGGC 2821

Obr. 1E

```
---G--GTTG CAAGGCCCAA GAAGCCCA-- -TCCTGGGAA GGAAAATGCA    50
TTGGGGAACC CTGTGCGGAT TCTTGTGGCT TTGGCCCTAT CTTTTCTATG   100
TCCAAGCTGT GCCCATCCAA AAAGTCCAAG ATGACACCAA AACCCTCATC   150
AAGACAATTG TCACCAGGAT CAATGACATT TCACACACGC AGTCAGTCTC   200
CTCCAAACAG AAAGTCACCG GTTTGGACTT CATTCCTGGG CTCCACCCCA   250
TCCTGACCTT ATCCAAGATG GACCAGACAC TGGCAGTCTA CCAACAGATC   300
CTCACCAGTA TGCCTTCCAG AAACGTGATC CAAATATCCA ACGACCTGGA   350
GAACCTCCGG GATCTTCTTC ACGTGCTGGC CTTCTCTAAG AGCTGCCACT   400
TGCCCTGGGC CAGTGGCCTG GAGACCTTGG ACAGCCTGGG GGGTGTCCTG   450
GAAGCTTCAG GCTACTCCAC AGAGGTGGTG GCCCTGAGCA GGCTGCAGGG   500
GTCTCTGCAG GACATGCTGT GGCAGCTGGA CCTCAGCCCT GGGTGCTGAG   550
```

Obr. 2A

```
GCCTTGAAGG TCACTCTTCC TGCAAGGACT -ACGTTAAGG GAAGGAACTC  600
TGGTTTCCAG GTATCTCCAG GATTGAAGAG CATTGCATGG ACACCCCTTA  650
TCCAGGACTC TGTCAATTTC CCTGACTCCT CTAAGCCACT CTTCCAAAGG  700
```

Obr. 28

1	MET HIS TRP GLY THR LEU CYS GLY PHE LEU TRP LEU TRP PRO TYR
16	LEU PHE TYR VAL GLN ALA VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
31	THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
46	SER HIS THR GLN SER VAL SER SER LYS GLN LYS VAL THR GLY LEU
61	ASP PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU THR LEU SER LYS MET
76	ASP GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN ILE LEU THR SER MET PRO
91	SER ARG ASN VAL ILE GLN ILE SER ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG
106	ASP LEU LEU HIS VAL LEU ALA PHE SER LYS SER CYS HIS LEU PRO
121	TRP ALA SER GLY LEU GLU THR LEU ASP SER LEU GLY GLY VAL LEU
136	GLU ALA SER GLY TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU
151	GLN GLY SER LEU GLN ASP MET LEU TRP GLN LEU ASP LEU SER PRO
166	GLY CYS END

Obr. 3

SK 287191 B6

```
MOUSE   MCWRPLCRFL WLWSYLSYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS   50
        * **  *      *  *
HUMAN   MHWGTLCGFL WLWPYLFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS

MOUSE   VSAKQRVTGL DFIPGLHPIL SLSKMDQTLA VYQQVLTSLP SQNVLQIAND  100
          *                  -          -  -   *     *
HUMAN   VSSKQKVTGL DFIPGLHPIL TLSKMDQTLA VYQQILTSMP SRNVIQISND

MOUSE   LENLRDLLHL LAFSKSCSLP QTSGLQKPES LDGVLEASLY STEVVALSRL  150
                -          *   **   ***-   *       *
HUMAN   LENLRDLLHV LAFSKSCHLP WASGLETLDS LGGVLEASGY STEVVALSRL

MOUSE   QGSLQDILQQ LDVSPEC                                      167
          - *    - *
HUMAN   QGSLQDMLWQ LDLSPGC
```

Obr. 4

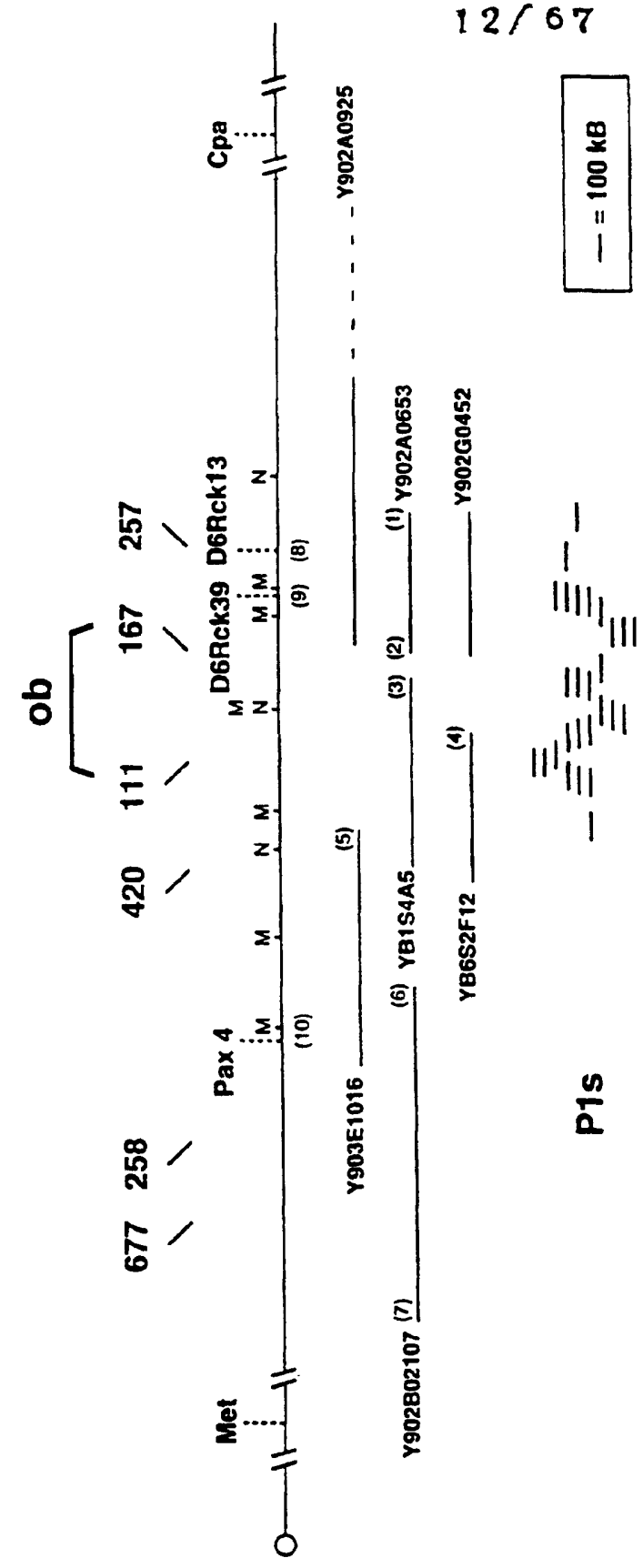
1	Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr
16	Leu Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp
31	Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile
46	Ser His Thr Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp
61	Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp
76	Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser
91	Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp
106	Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln
121	Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu
136	Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln
151	Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser Pro Glu
166	Cys End

Obr. 5

1	Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr
16	Leu Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp
31	Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile
46	Ser His Thr Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp
61	Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp
76	Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser
91	Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp
106	Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp
121	Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu
136	Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln
151	Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro Gly
166	Cys End

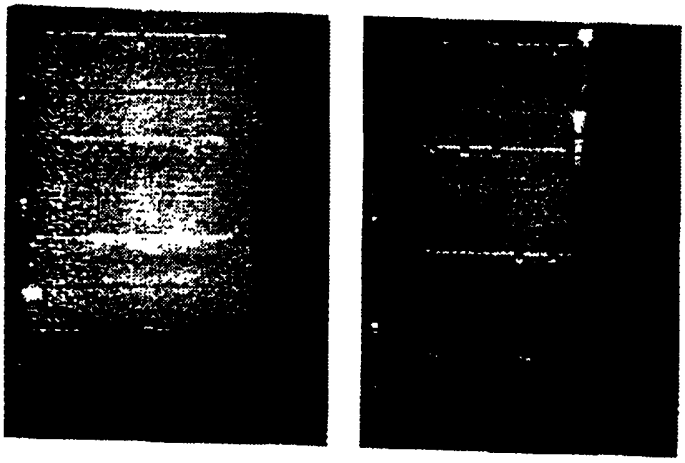
Obr. 6

12/67


ob
677
258
420
111
167
257
Met
Pax 4
D6Rck39
D6Rck13
Cpa
Y902A0925
Y903E1016
Y902B02107
YB1S4A5
YB6S2F12
Y902A0653
Y902G0452
P1s
= 100 kB

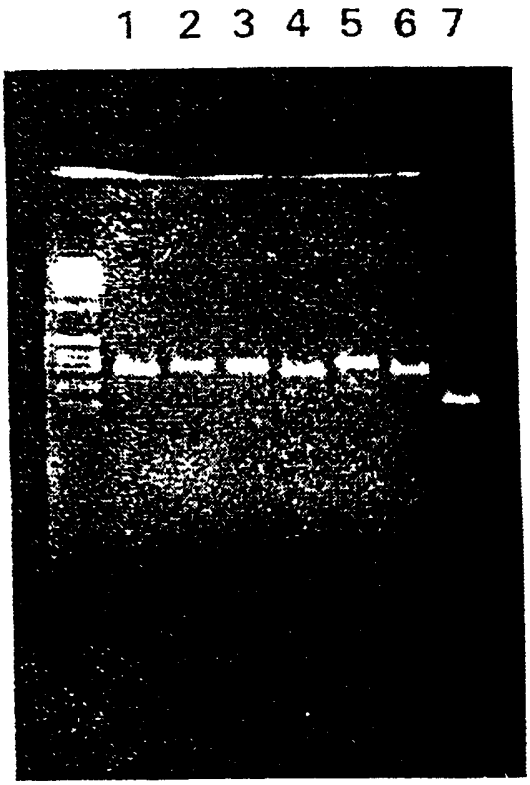
Obr. 7

13 / 67

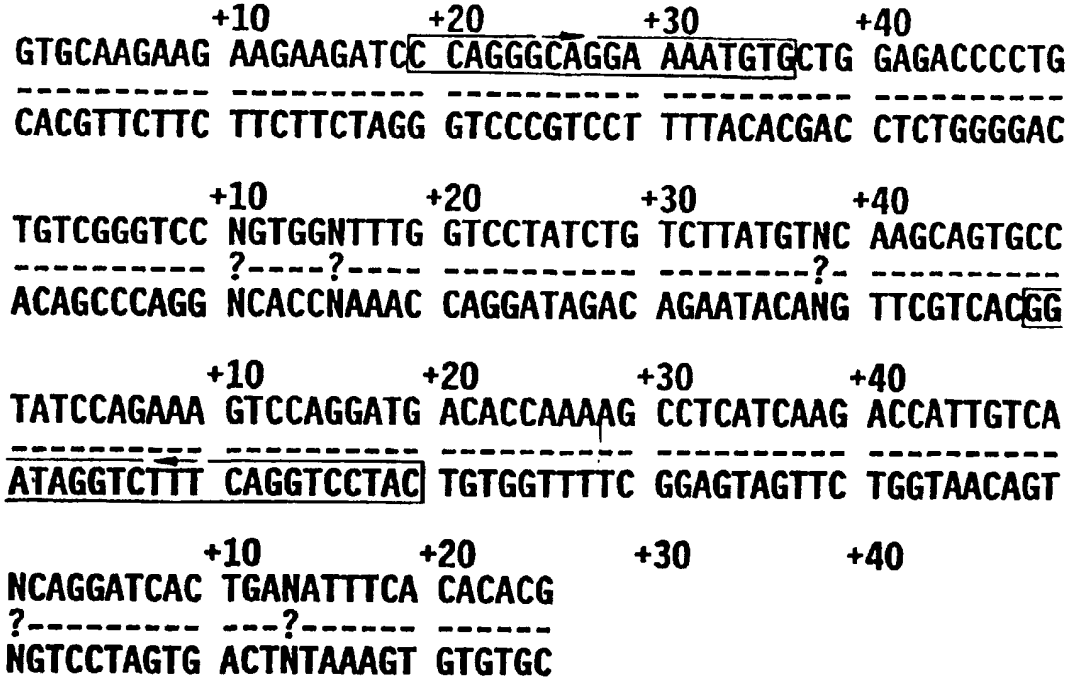


Obr. 8

14/67



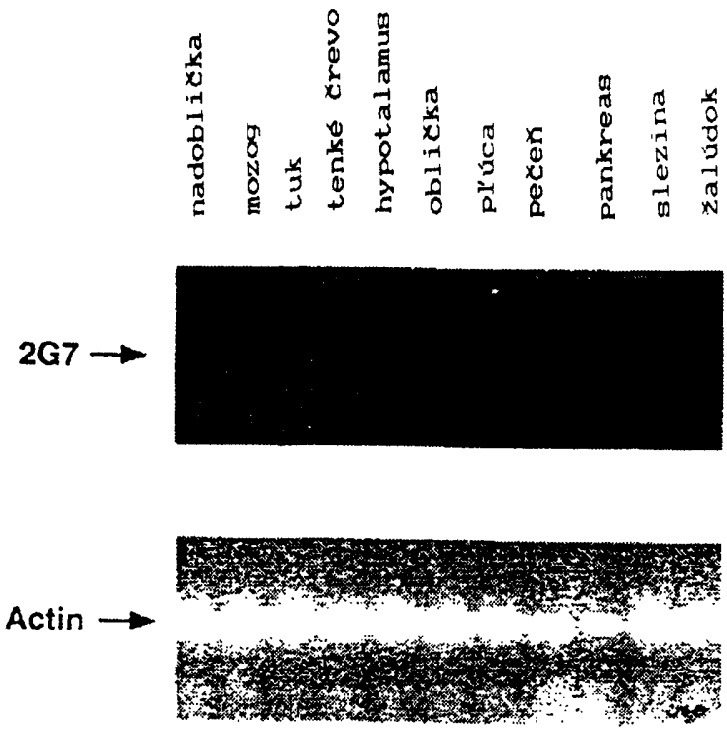
Obr. 9



Obr. 10

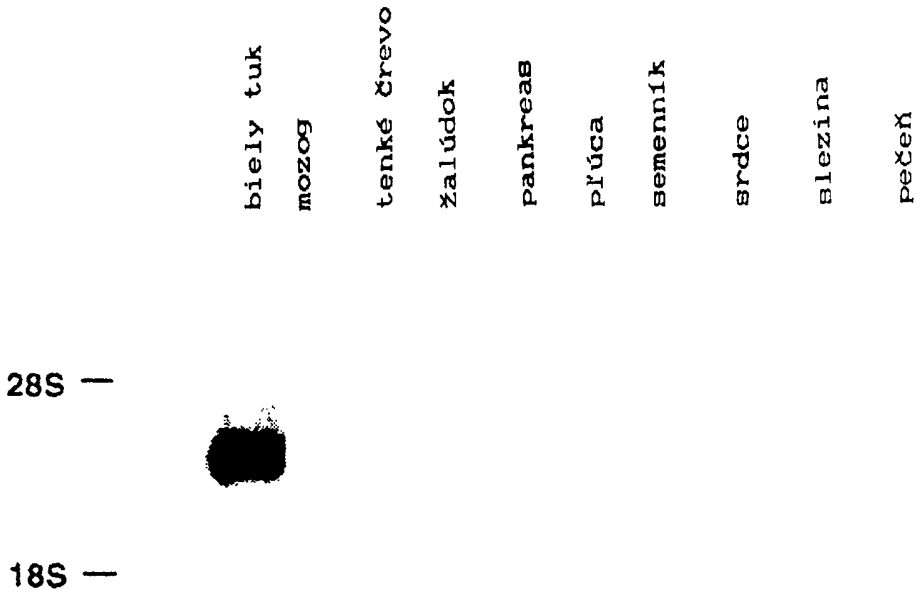
SK 287191 B6

16 / 67


nadobnička
mozog
tuk
tenké črevo
hypotalamus
obličky
pľúca
pečeň
pankreas
slezina
žalúdok
2G7
Actin

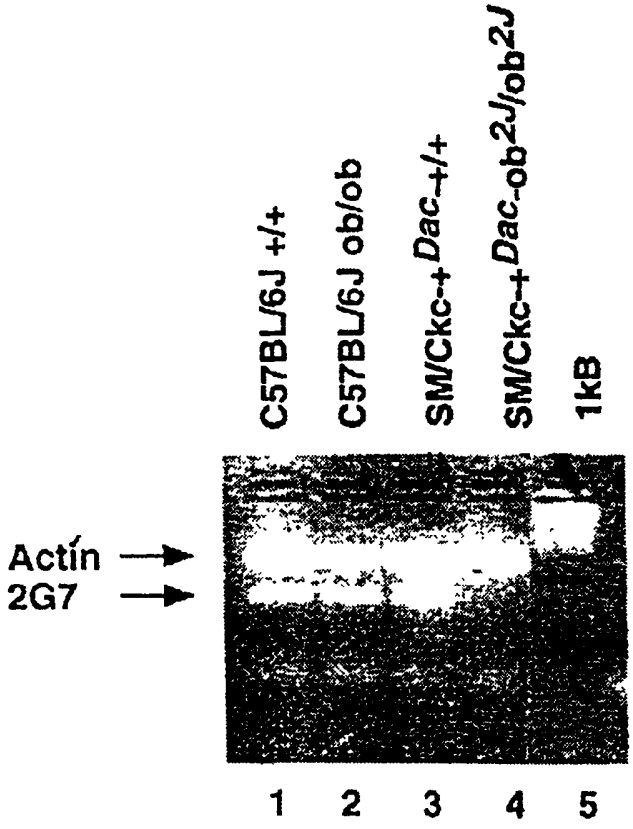
Obr. 11A

17/67


biely tuk
mozog
tenké črevo
žalúdok
pankreas
pľúca
semenník
srdce
slezina
pečeň
28S
18S

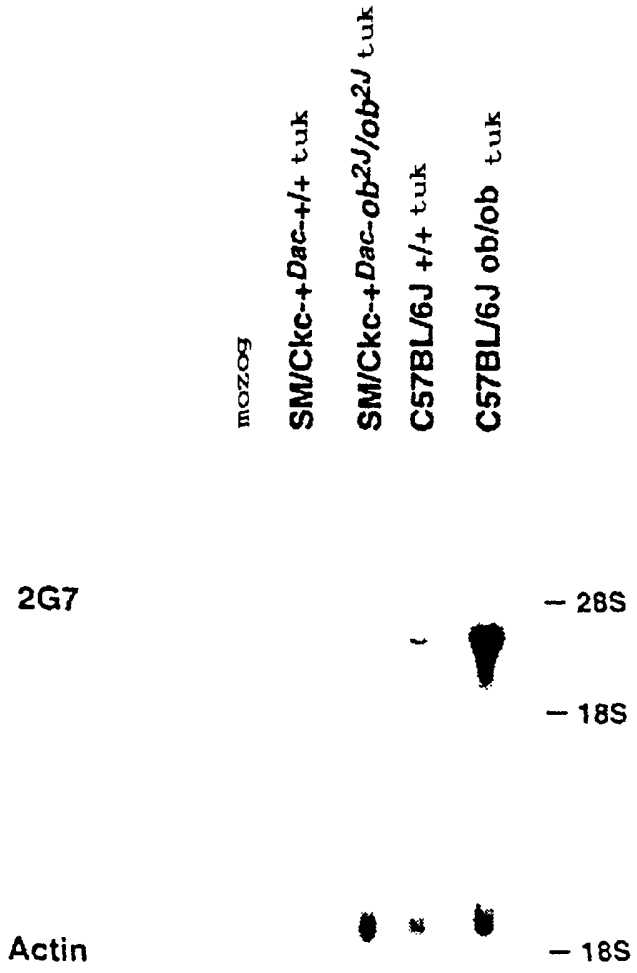
Obr. 11B

18/67


C57BL/6J +/+
C57BL/6J ob/ob
SM/Ckc-+Dac-+/+
SM/Ckc-+Dac-ob2J/ob2J
1kB
Actín
2G7
1
2
3
4
5

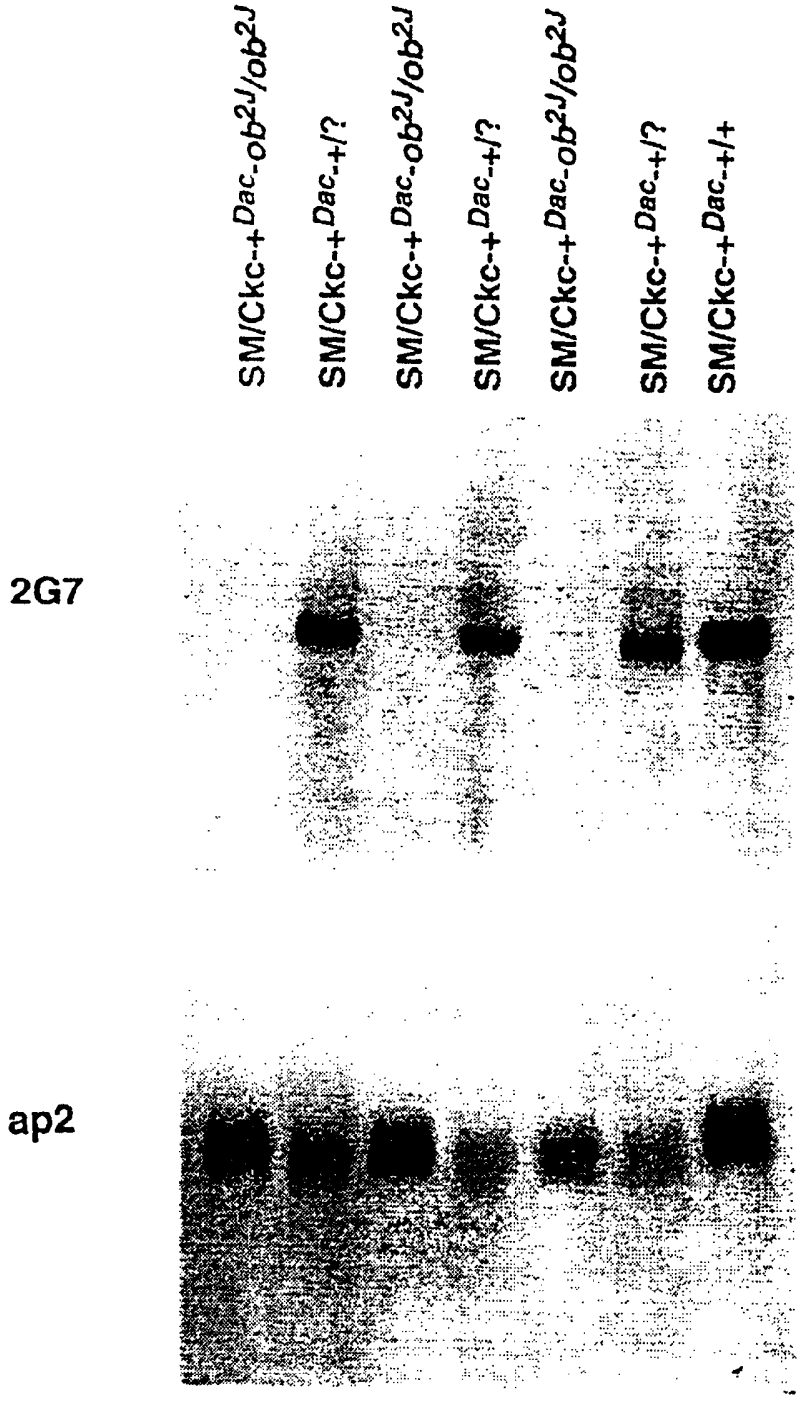
Obr. 12A

19 / 67

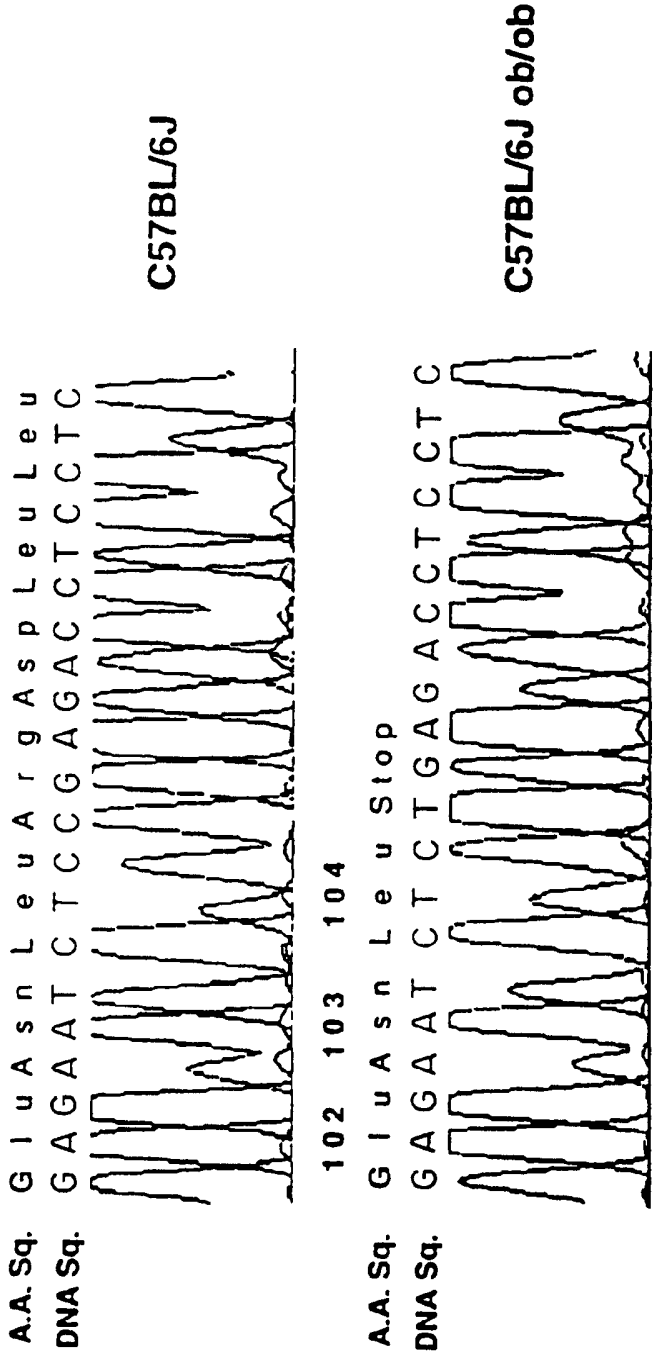

mozog
SM/Ckc-+Dac-+/+ tuk
SM/Ckc-+Dac-ob2J/ob2J tuk
C57BL/6J +/+ tuk
C57BL/6J ob/ob tuk
2G7
– 28S
– 18S
Actin
– 18S

Obr. 12B

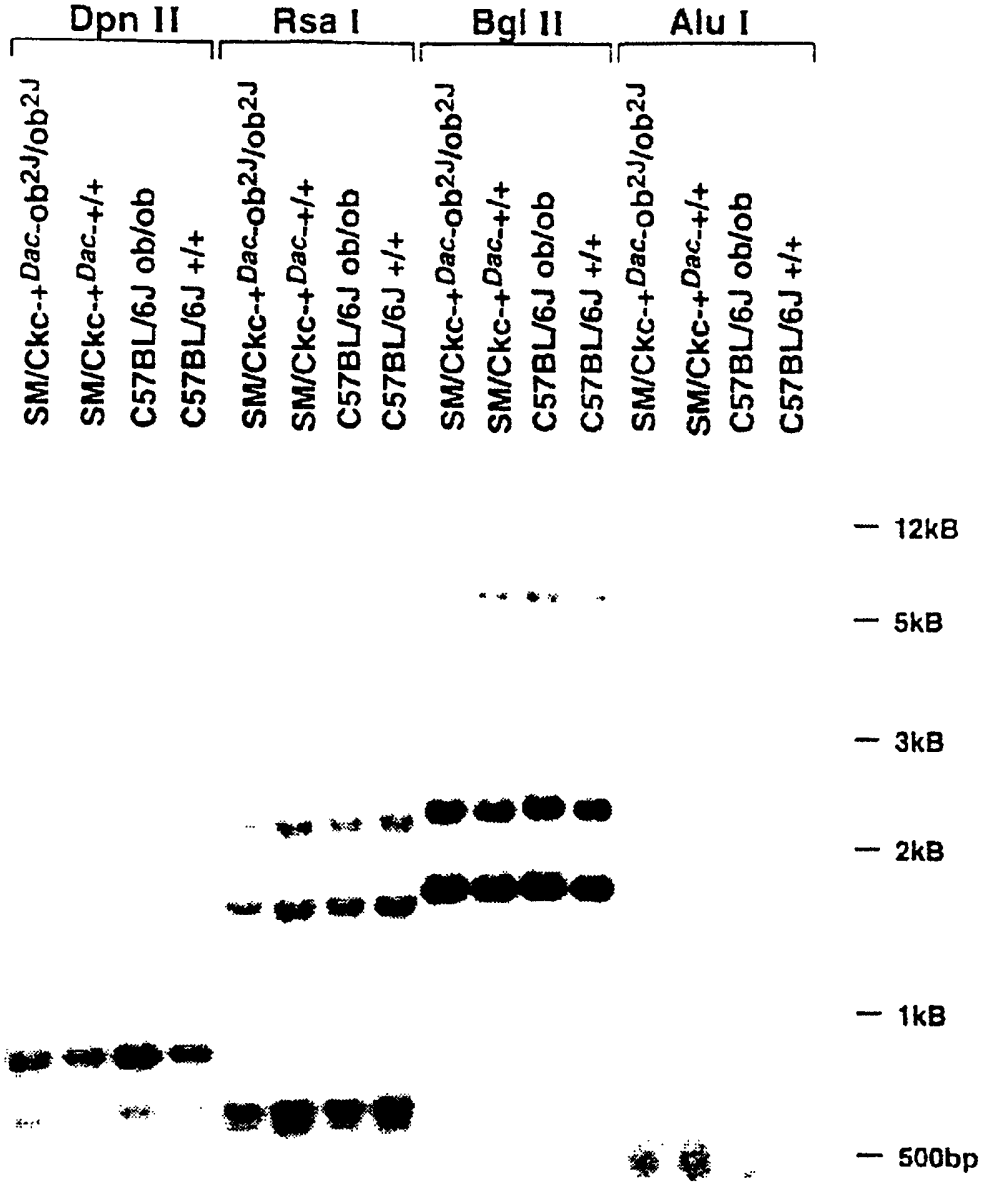
20/67


SM/Ckc-+Dac-ob2J/ob2J
SM/Ckc-+Dac-+/?
SM/Ckc-+Dac-ob2J/ob2J
SM/Ckc-+Dac-+/?
SM/Ckc-+Dac-ob2J/ob2J
SM/Ckc-+Dac-+/?
SM/Ckc-+Dac-+/+
2G7
ap2

Obr.13

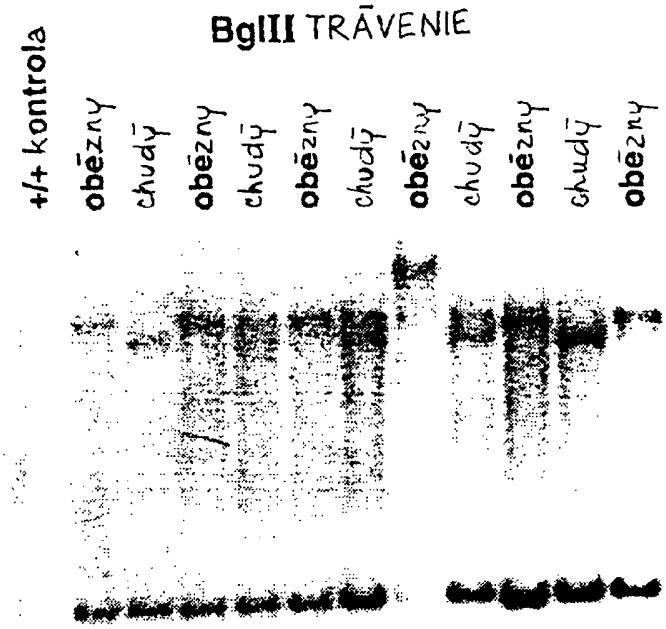

C57BL/6J
102 103 104 105 106 107 108
A.A. Sq. Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu
DNA Sq. GAGAATCTCCGAGACCTCCTC
C57BL/6J ob/ob
102 103 104
A.A. Sq. Glu Asn Leu Stop
DNA Sq. GAGAATCTCTGAGACCTCCTC

Obr. 14


Dpn II
Rsa I
Bgl II
Alu I
SM/Ckc-+Dac-ob2J/ob2J
SM/Ckc-+Dac-+/+
C57BL/6J ob/ob
C57BL/6J +/+
SM/Ckc-+Dac-ob2J/ob2J
SM/Ckc-+Dac-+/+
C57BL/6J ob/ob
C57BL/6J +/+
SM/Ckc-+Dac-ob2J/ob2J
SM/Ckc-+Dac-+/+
C57BL/6J ob/ob
C57BL/6J +/+
SM/Ckc-+Dac-ob2J/ob2J
SM/Ckc-+Dac-+/+
C57BL/6J ob/ob
C57BL/6J +/+
12kB
5kB
3kB
2kB
1kB
500bp

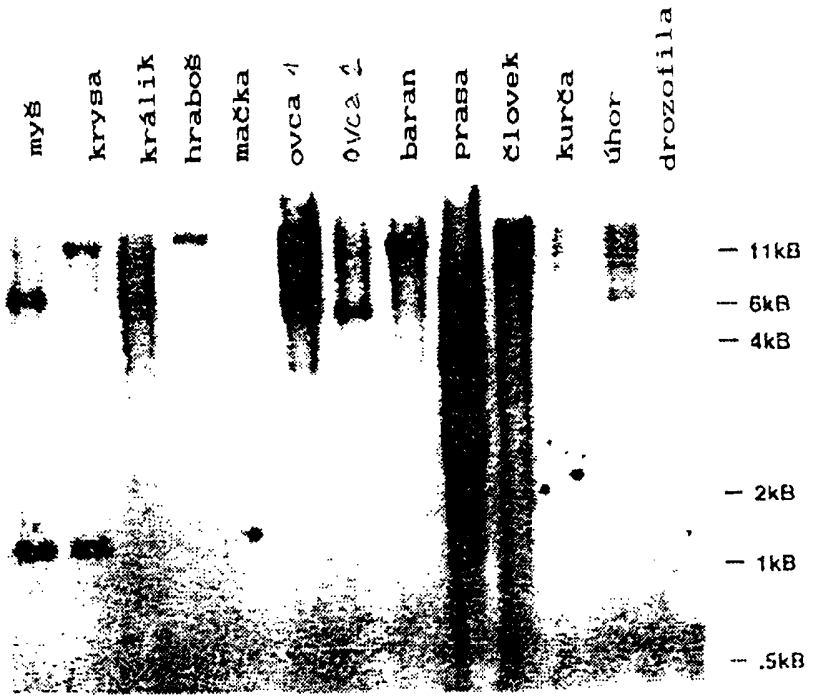
Obr. 15A

23 / 67

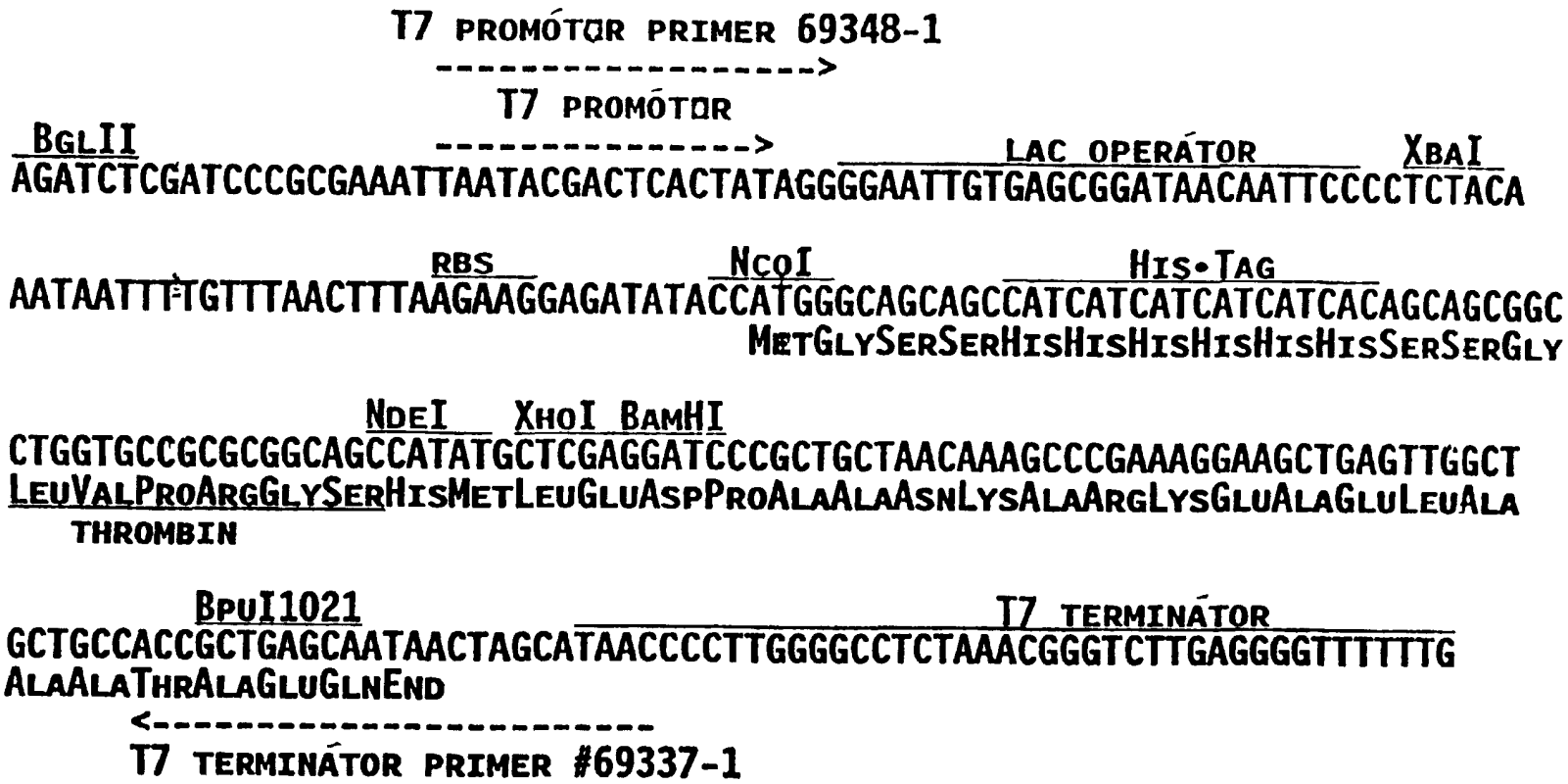

BglII TRÁVENIE
+/+ kontrola
obézny
chudý
obézny
chudý
obézny
chudý
obézny
chudý
obézny
chudý
obézny

Obr. 15B

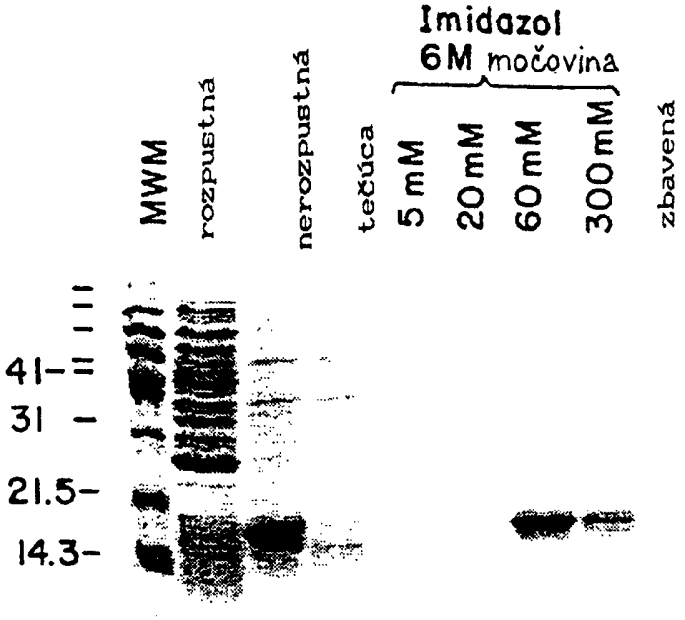
24/67


myš
krysa
králík
hraboš
mačka
ovca 1
ovca 2
baran
prasa
človek
kurča
úhor
drozofila
11kB
6kB
4kB
2kB
1kB
.5kB

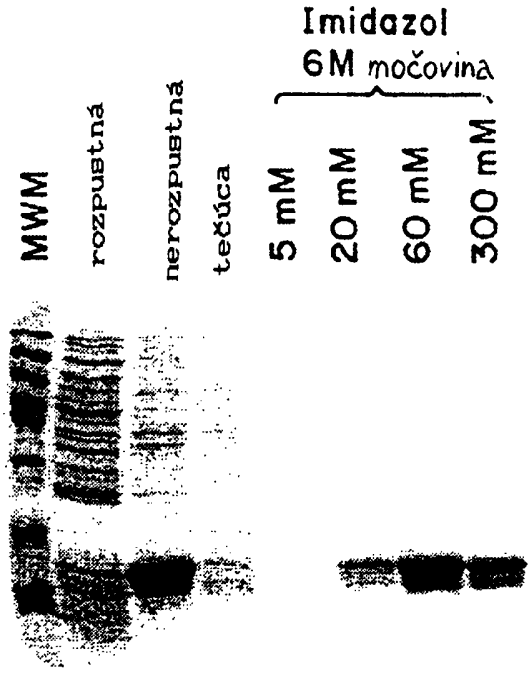
Obr. 16


T7 PROMÓTOR PRIMER 69348-1
T7 PROMÓTOR
BGLII
LAC OPERÁTOR
XBAI
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTACA
RBS
NCOI
HIS•TAG
AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGC
METGLYSERSERHISHISHISHISHISHISSERSERGLY
NDEI
XHOI
BAMHI
CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTCGAGGATCCCGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCT
LEUVALPROARGGLYSERHISMETLEUGLUASPPROALAALAASNLYSALAARGLYSGLUALAGLULEUALA
THROMBIN
BPUI1021
T7 TERMINÁTOR
GCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
ALAALATHRALAGLUGLNEND
T7 TERMINÁTOR PRIMER #69337-1

Obr. 17

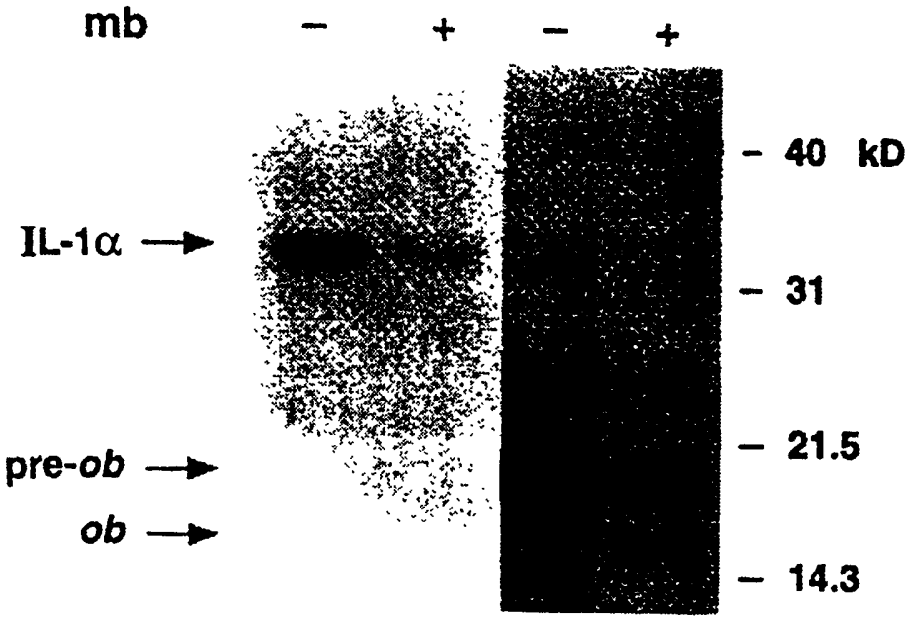


Obr. 18A

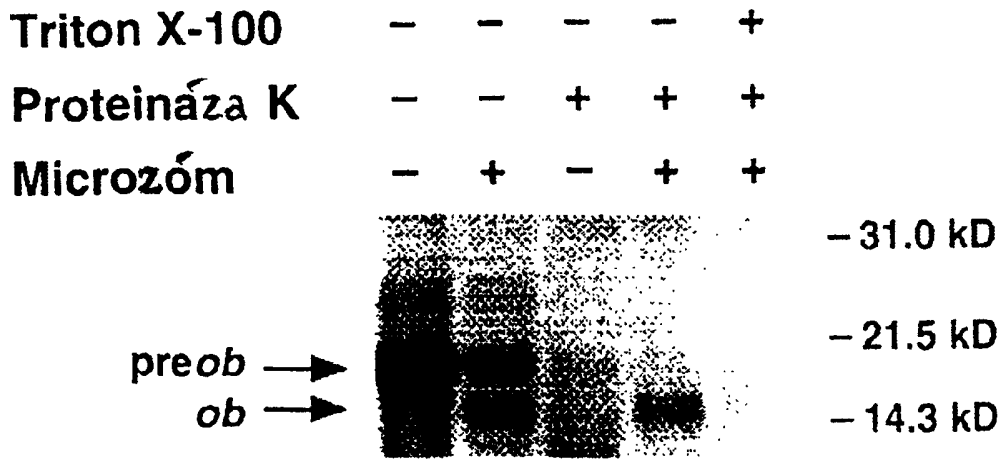


Obr. 18B

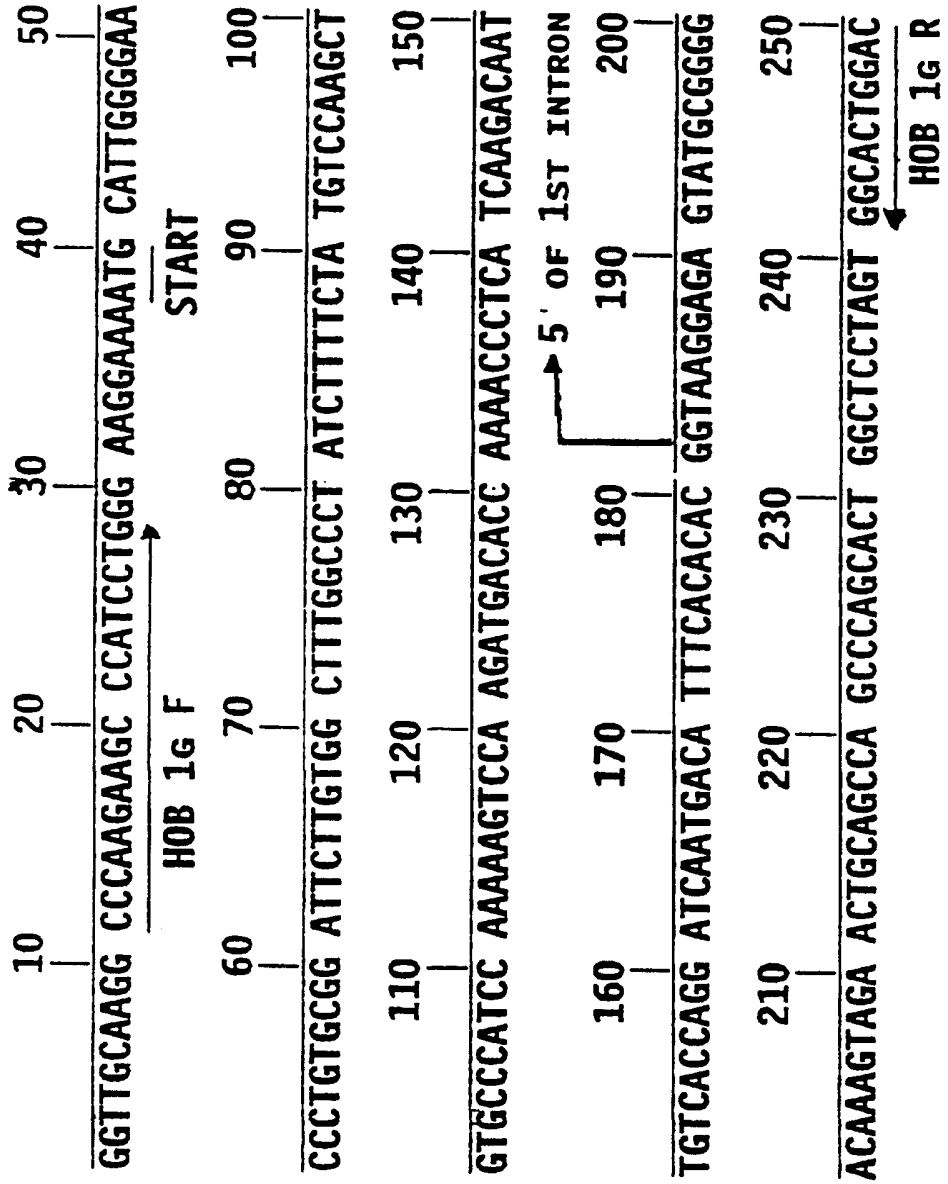
27/67



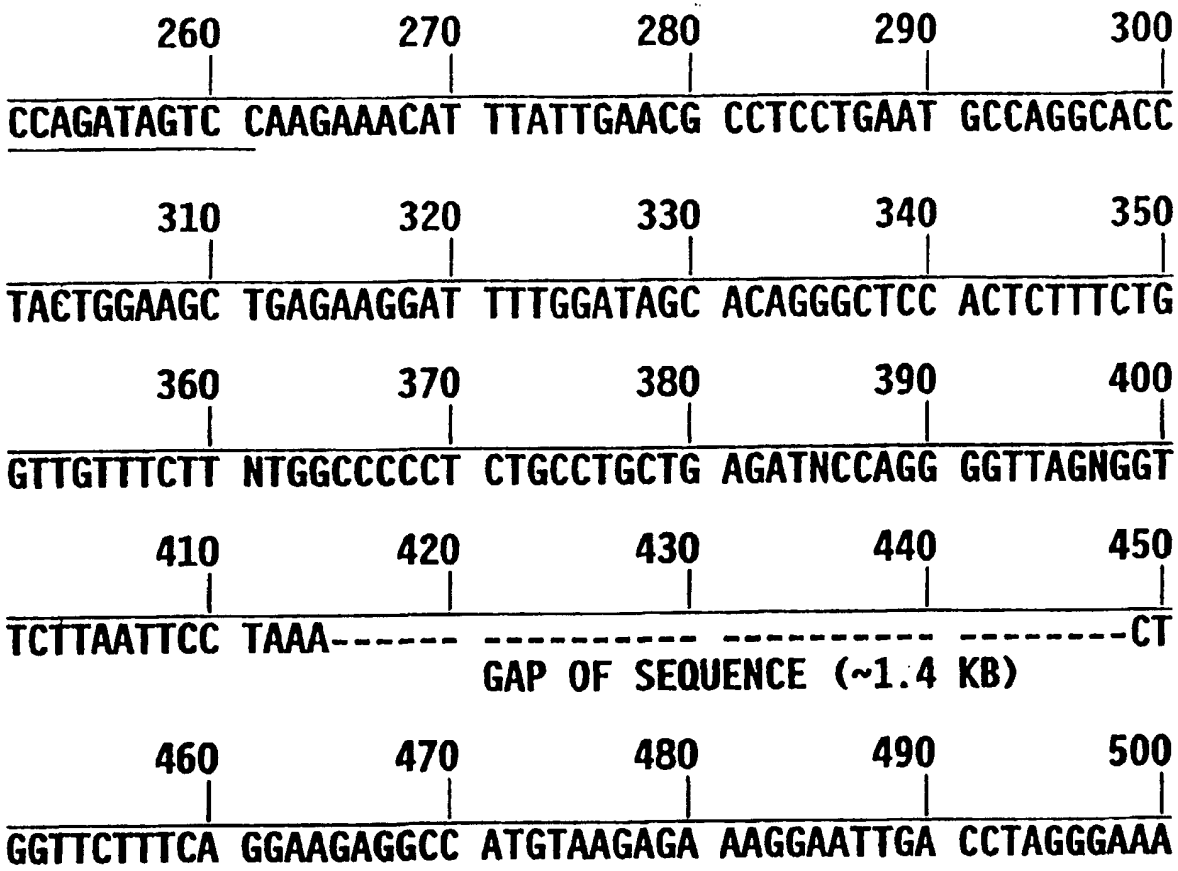
Obr. 19A


Triton X-100 – – – – +
Proteináza K – – + + +
Microzóm – + – + +
preob
ob
– 31.0 kD
– 21.5 kD
– 14.3 kD

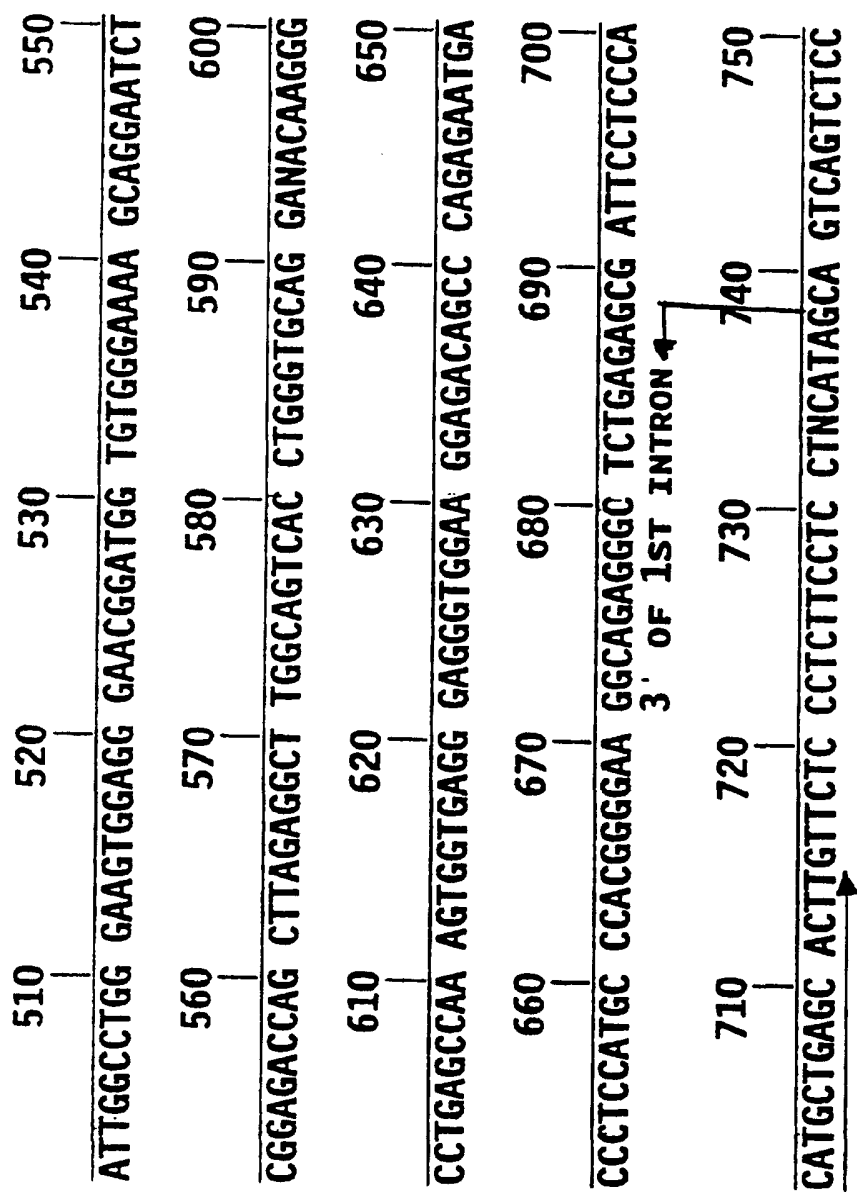
Obr. 19B


10
20
30
40
50
GGTTGCAAGG CCCAAGAAGC CCATCCTGGG AAGGAAAATG CATTGGGGAA
HOB 1G F
START
60
70
80
90
100
CCCTGTGCGG ATTCTTGTGG CTTTGGCCCT ATCTTTTCTA TGTCCAAGCT
110
120
130
140
150
GTGCCCATCC AAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCTCA TCAAGACAAT
5' OF 1ST INTRON
160
170
180
190
200
TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GGTAAGGAGA GTATGCGGGG
210
220
230
240
250
ACAAAGTAGA ACTGCAGCCA GCCCAGCACT GGCTCCTAGT GGCACTGGAC
HOB 1G R

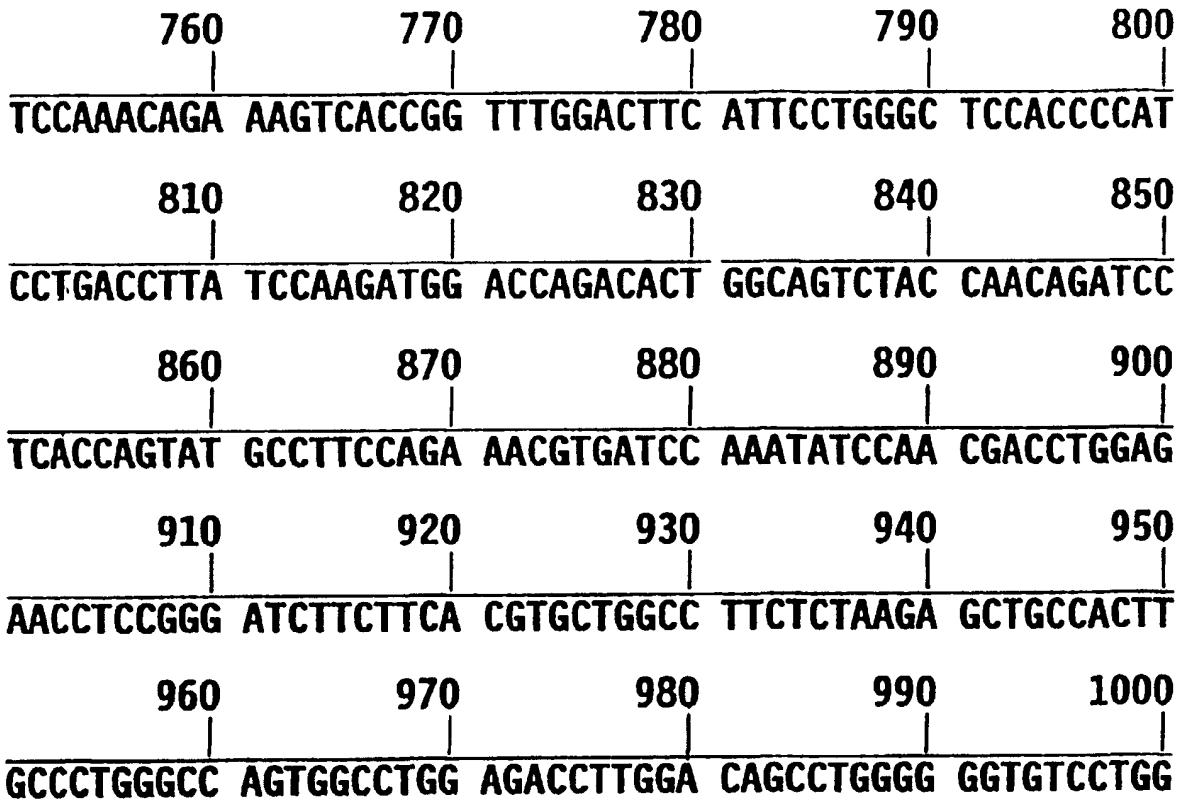
Obr. 20A


260 270 280 290 300
CCAGATAGTC CAAGAAACAT TTATTGAACG CCTCCTGAAT GCCAGGCACC
310 320 330 340 350
TACTGGAAGC TGAGAAGGAT TTTGGATAGC ACAGGGCTCC ACTCTTTCTG
360 370 380 390 400
GTTGTTTCTT NTGGCCCCCT CTGCCTGCTG AGATNCCAGG GGTTAGNGGT
410 420 430 440 450
TCTTAATTCC TAAA------ ---------- ---------- --------CT
GAP OF SEQUENCE (~1.4 KB)
460 470 480 490 500
GGTTCTTTCA GGAAGAGGCC ATGTAAGAGA AAGGAATTGA CCTAGGGAAA

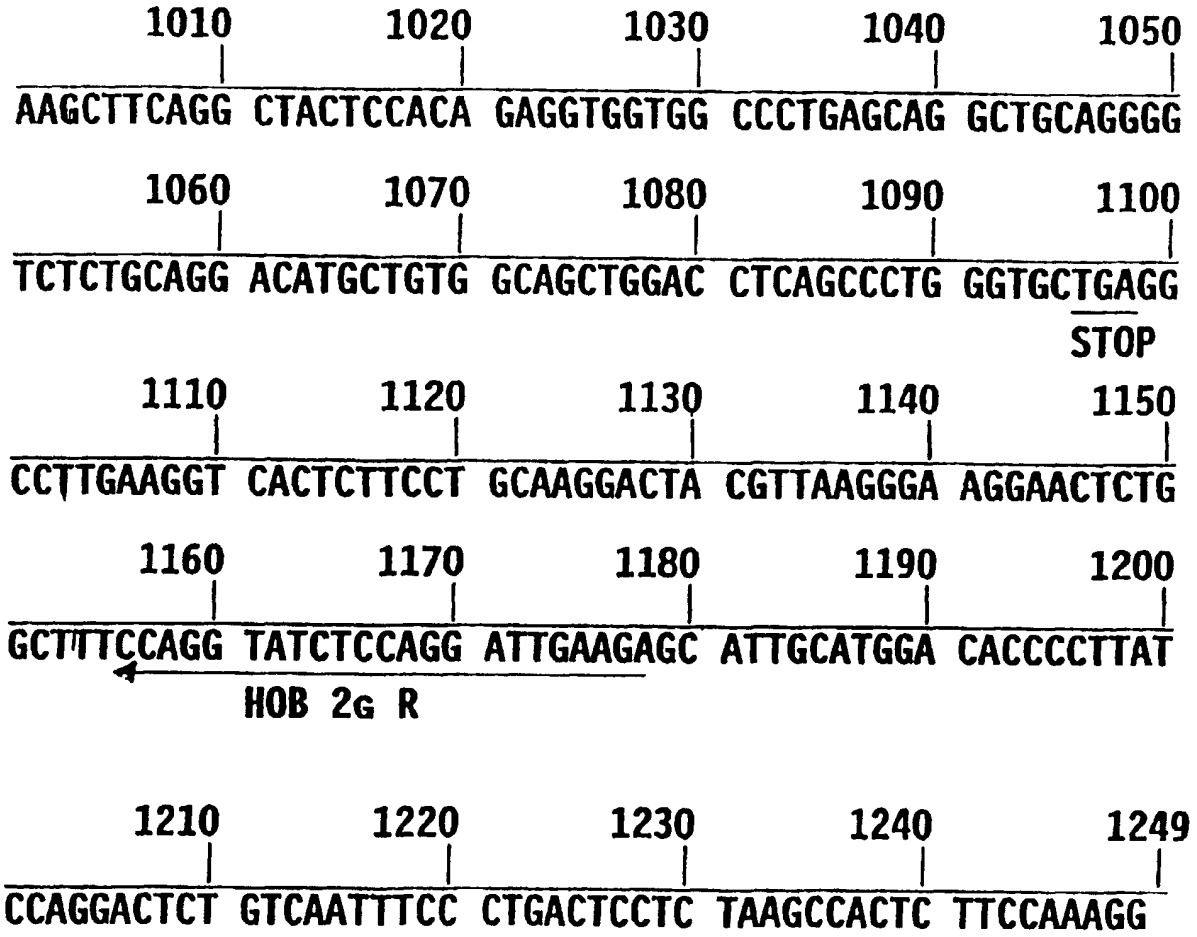
Obr. 20B


510
520
530
540
550
ATTGGCCTGG GAAGTGGAGG GAACGGATGG TGTGGGAAAA GCAGGAATCT
560
570
580
590
600
CGGAGACCAG CTTAGAGGCT TGGCAGTCAC CTGGGTGCAG GANACAAGGG
610
620
630
640
650
CCTGAGCCAA AGTGGTGAGG GAGGGTGGAA GGAGACAGCC CAGAGAATGA
660
670
680
690
700
CCCTCCATGC CCACGGGGAA GGCAGAGGGC TCTGAGAGCG ATTCCTCCCA
3' OF 1ST INTRON
710
720
730
740
750
CATGCTGAGC ACTTGTTCTC CCTCTTCCTC CTNCATAGCA GTCAGTCTCC
HOB 2G F

Obr. 20C


760 770 780 790 800
TCCAAACAGA AAGTCACCGG TTTGGACTTC ATTCCTGGGC TCCACCCCAT
810 820 830 840 850
CCTGACCTTA TCCAAGATGG ACCAGACACT GGCAGTCTAC CAACAGATCC
860 870 880 890 900
TCACCAGTAT GCCTTCCAGA AACGTGATCC AAATATCCAA CGACCTGGAG
910 920 930 940 950
AACCTCCGGG ATCTTCTTCA CGTGCTGGCC TTCTCTAAGA GCTGCCACTT
960 970 980 990 1000
GCCCTGGGCC AGTGGCCTGG AGACCTTGGA CAGCCTGGGG GGTGTCCTGG

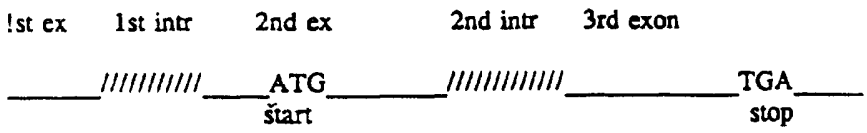
Obr. 20D


1010
1020
1030
1040
1050
AAGCTTCAGG CTACTCCACA GAGGTGGTGG CCCTGAGCAG GCTGCAGGGG
1060
1070
1080
1090
1100
TCTCTGCAGG ACATGCTGTG GCAGCTGGAC CTCAGCCCTG GGTGCTGAGG
STOP
1110
1120
1130
1140
1150
CCTTGAAGGT CACTCTTCCT GCAAGGACTA CGTTAAGGGA AGGAACTCTG
1160
1170
1180
1190
1200
GCTTTCCAGG TATCTCCAGG ATTGAAGAGC ATTGCATGGA CACCCCTTAT
HOB 2G R
1210
1220
1230
1240
1249
CCAGGACTCT GTCAATTTCC CTGACTCCTC TAAGCCACTC TTCCAAAGG

Obr. 20E

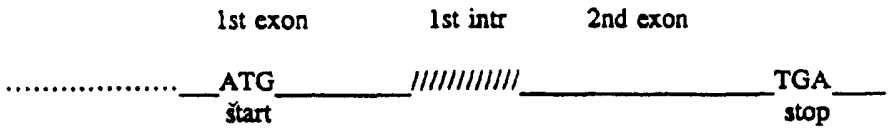
34 / 67

MYŠIA OB ŠTRUKTÚRA



Obr. 20F

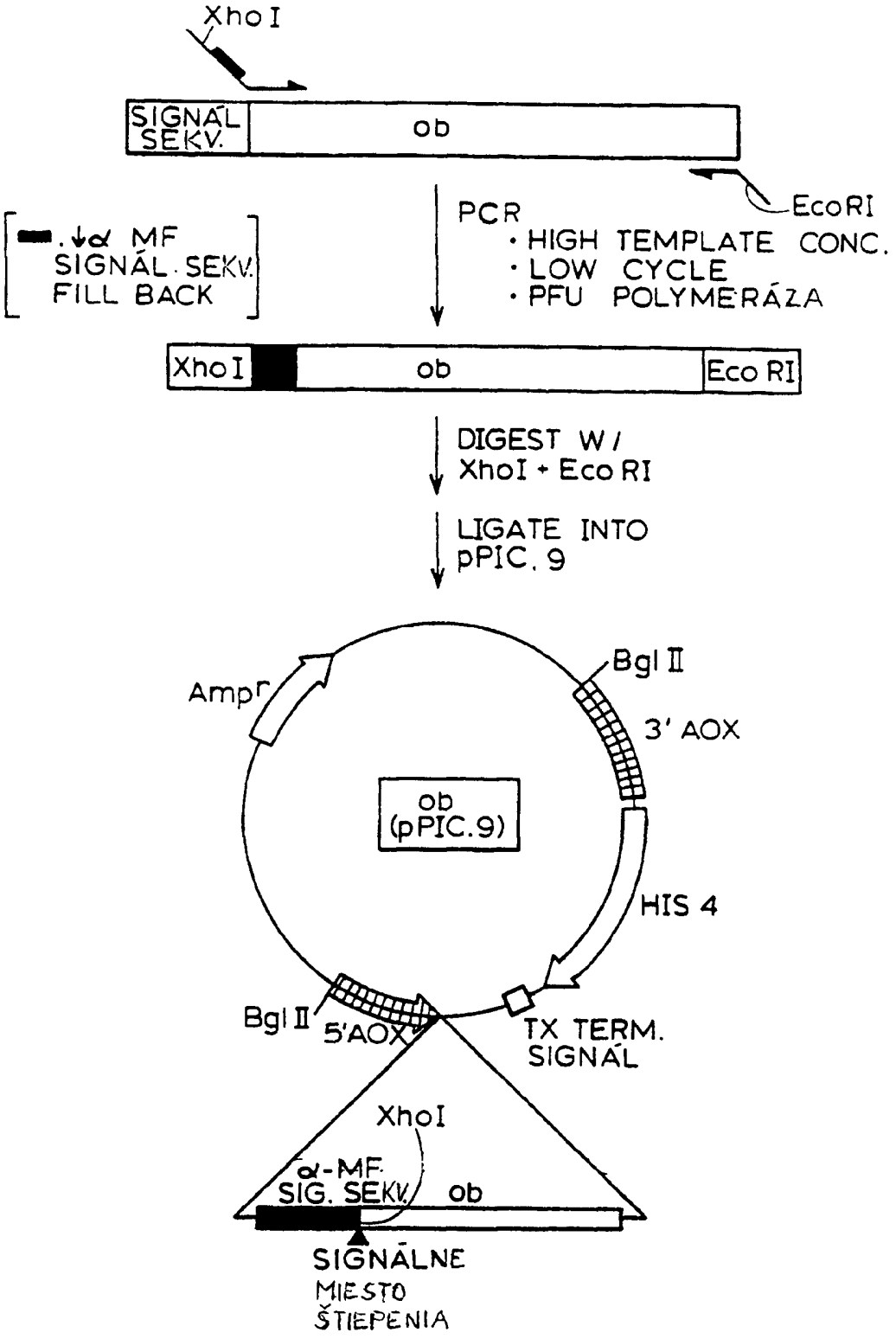
ĽUDSKÁ OB ŠTRUKTÚRA



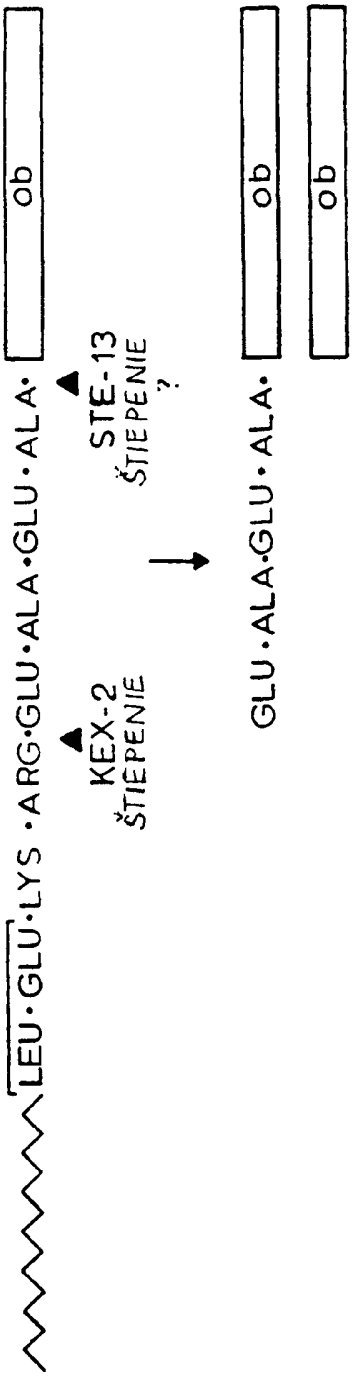
Obr. 20G

35 / 67

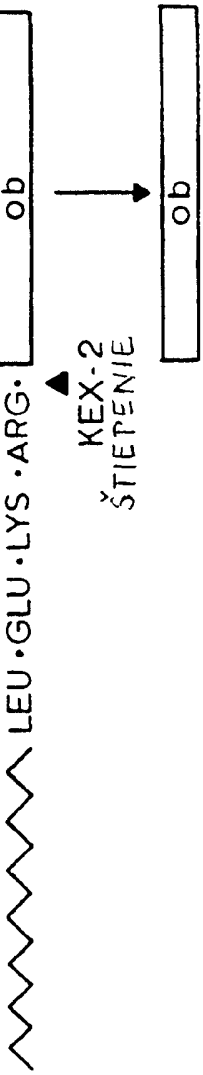
Obr. 21A


XhoI
SIGNÁL SEKV.
ob
EcoRI
PCR
· HIGH TEMPLATE CONC.
· LOW CYCLE
· PFU POLYMERÁZA
α MF SIGNÁL SEKV. FILL BACK
XhoI
ob
Eco RI
DIGEST W/ XhoI + Eco RI
LIGATE INTO pPIC. 9
Ampr
BglII
3' AOX
ob (pPIC.9)
HIS 4
BglII
5'AOX
TX TERM. SIGNÁL
XhoI
α-MF SIG. SEKV.
ob
SIGNÁLNE MIESTO ŠTIEPENIA

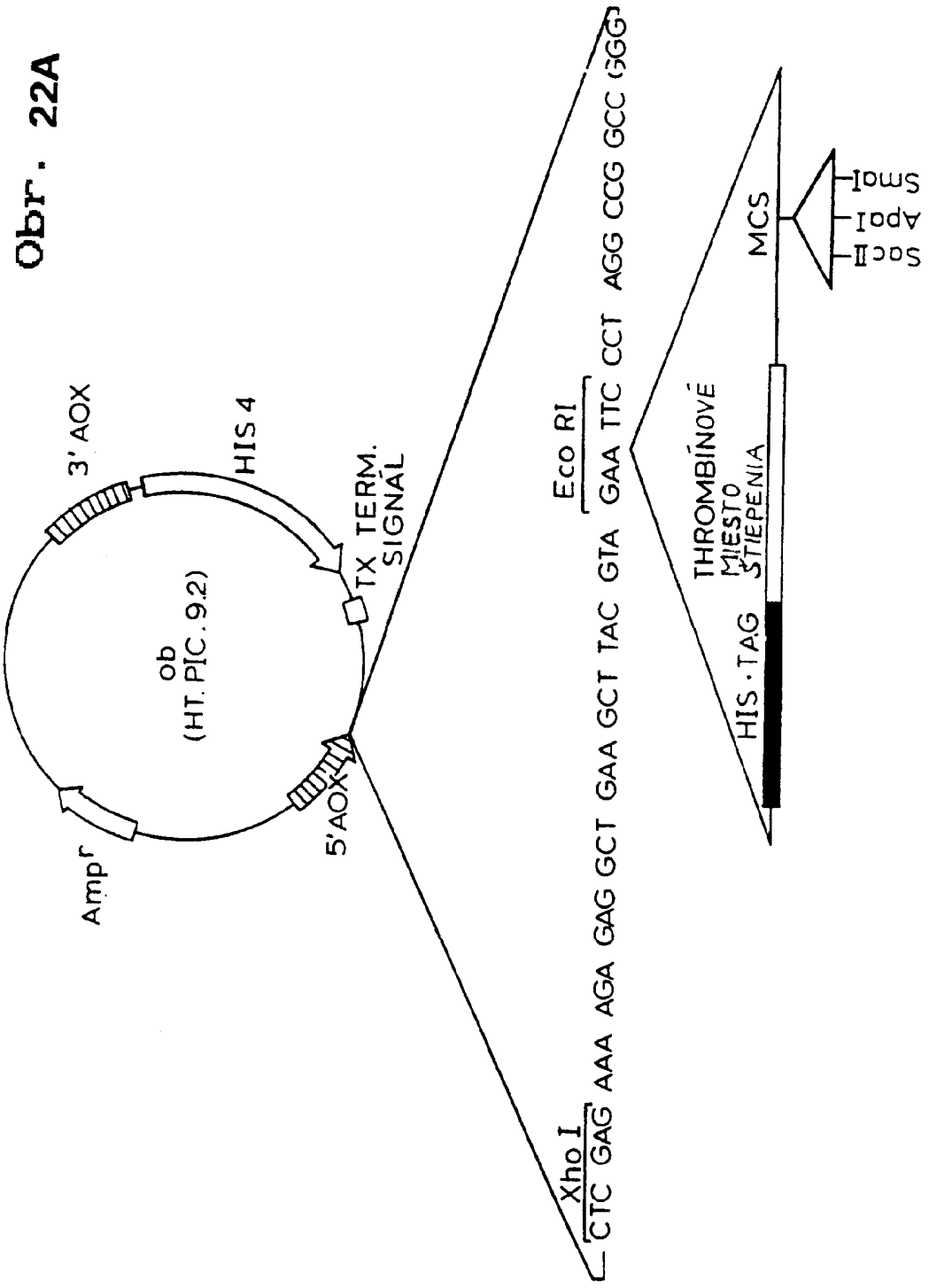
Obr. 21B



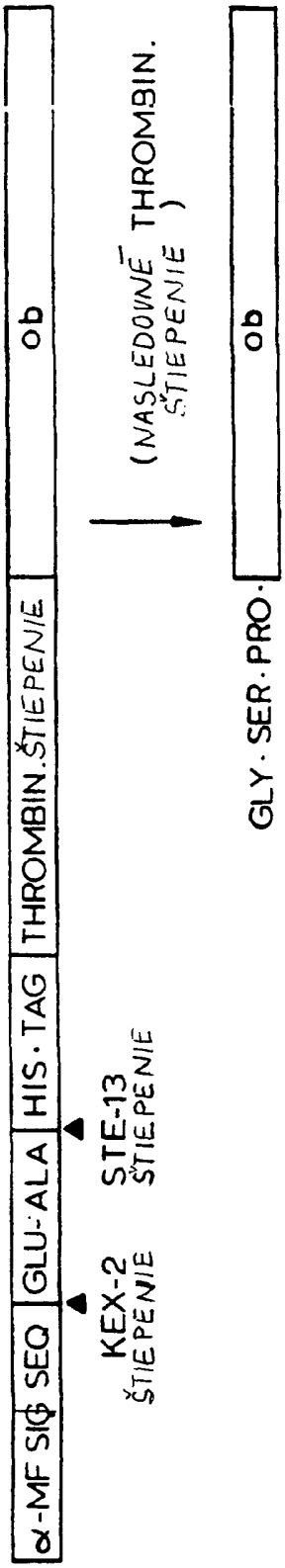
Obr. 21C



Obr. 22A

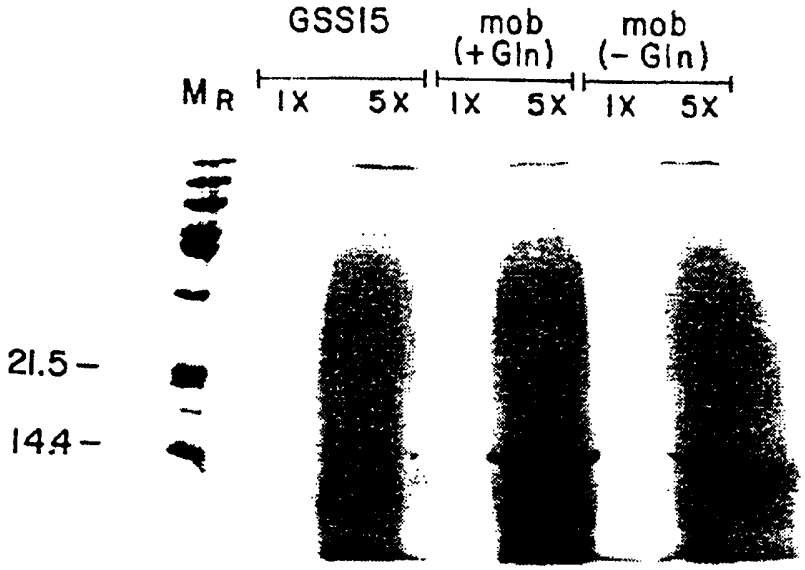

3' AOX
HIS 4
TX TERM.
SIGNÁL
ob
(HT.PIC.9.2)
Amp^r
5'AOX
Xho I
CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT TAC GTA
Eco RI
GAA TTC CCT AGG CCG GCC GGG
THROMBÍNOVÉ
MIESTO
ŠTIEPENIA
HIS · TAG
MCS
SacII
ApoI
SmaI

38 / 67


α-MF SIG SEQ
GLU-ALA
HIS · TAG
THROMBIN.ŠTIEPENIE
ob
KEX-2
ŠTIEPENIE
STE-13
ŠTIEPENIE
(NASLEDOVNÉ THROMBIN.
ŠTIEPENIE)
GLY · SER · PRO ·
ob

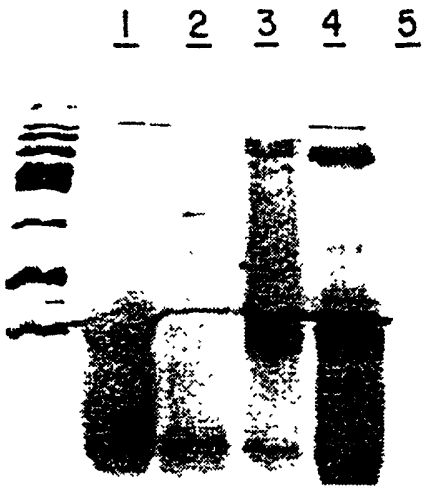
Obr. 22B

89 / 67



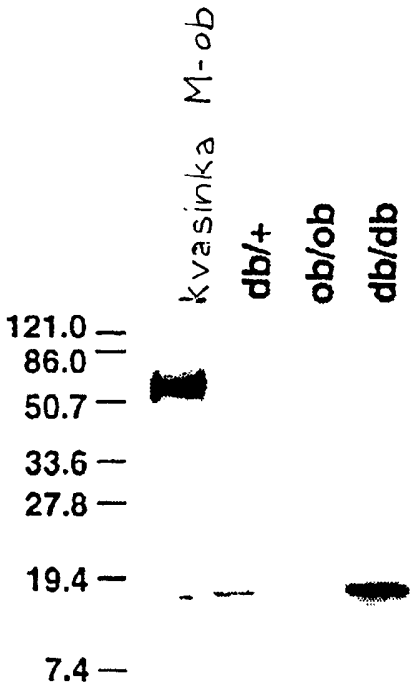
Obr. 23A

40 / 67



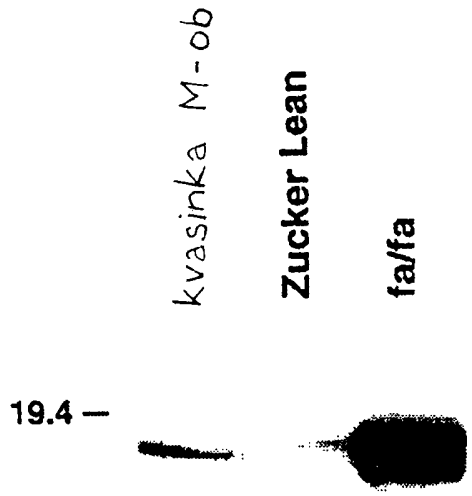
Obr. 23B

41/67



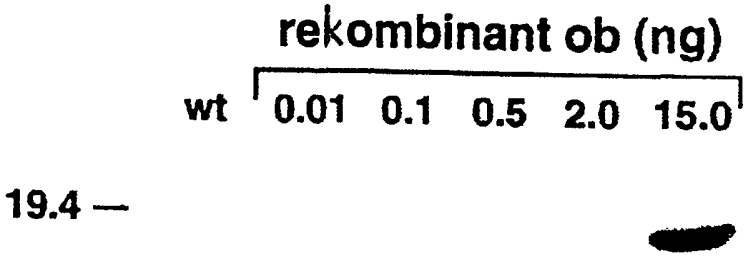
Obr. 24A

42 / 67

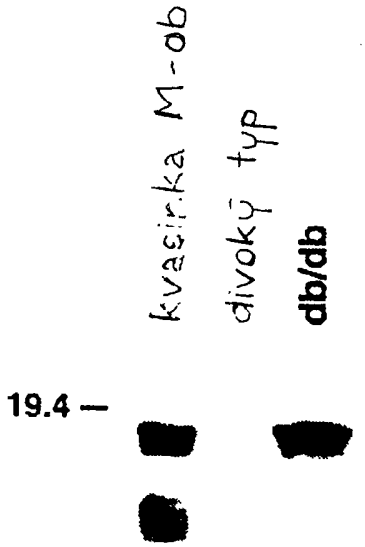


Obr. 24B

43 / 67

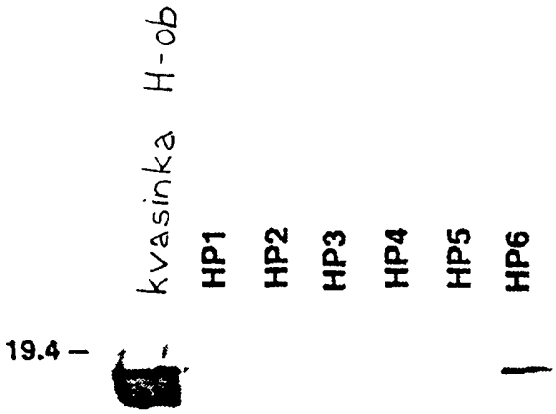


Obr. 24C



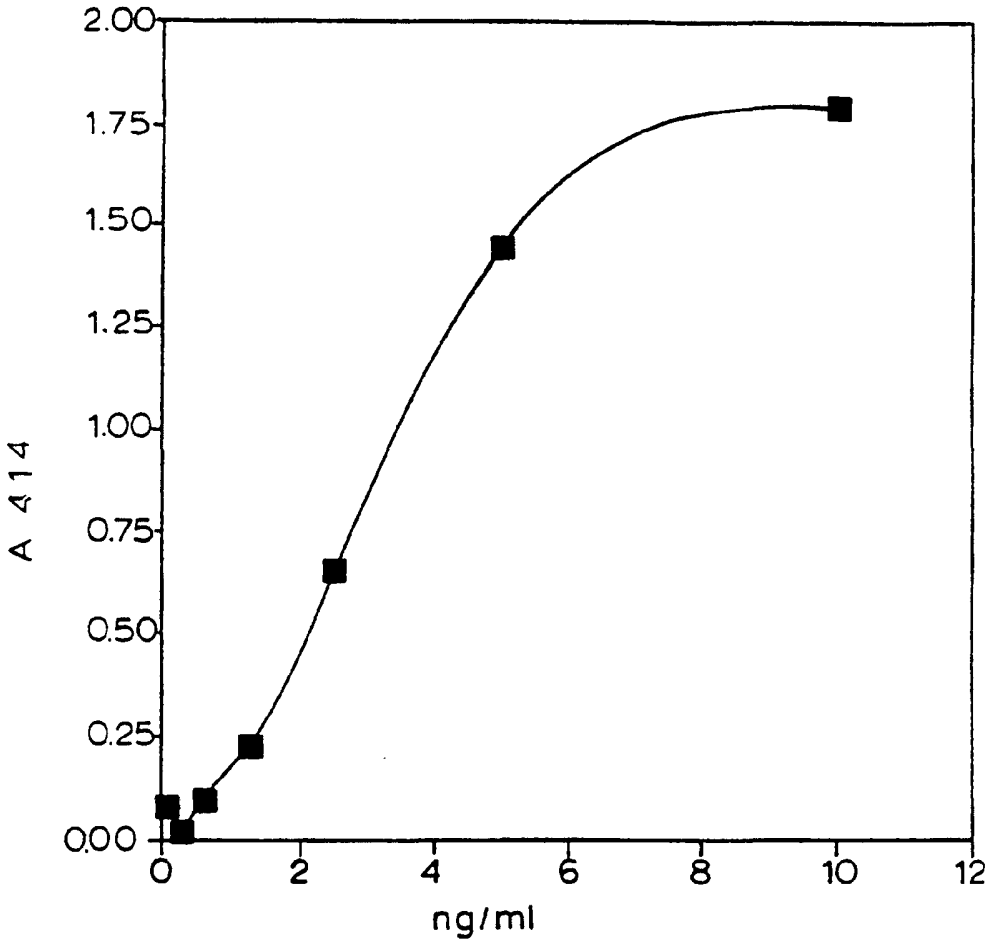
Obr. 24D

45 / 67



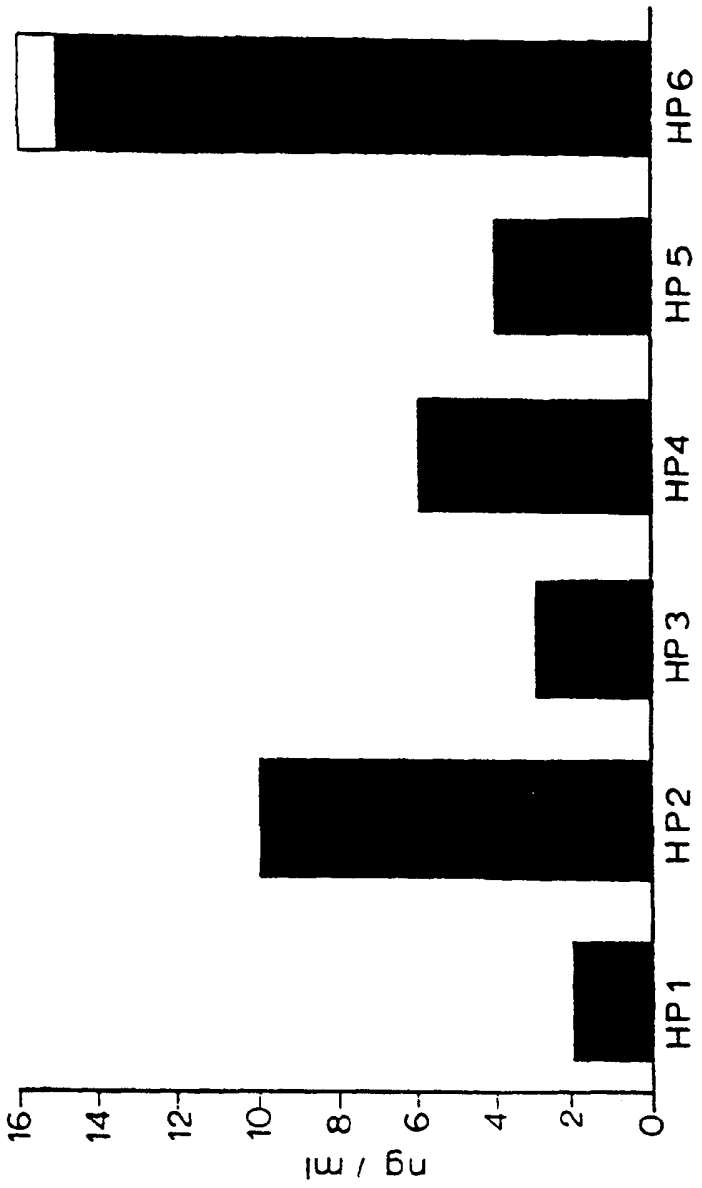
Obr. 25A

Obr. 25B

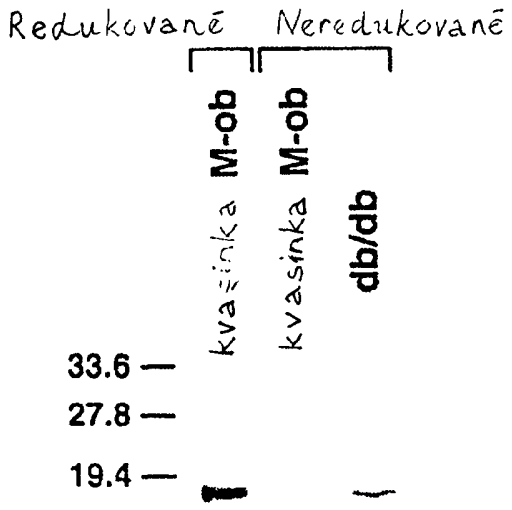


47 / 67

Obr. 25C



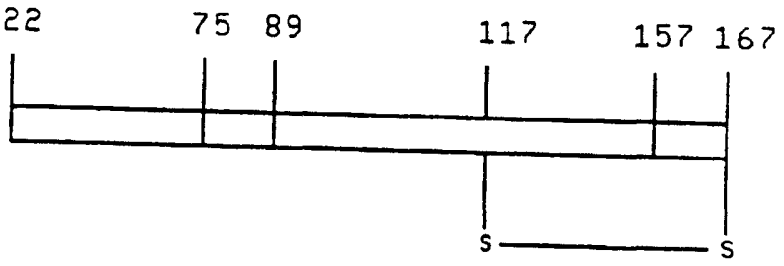
48 / 67


Redukované
Neredukované
kvasinka M-ob
kvasinka M-ob
db/db
33.6
27.8
19.4

Obr. 26A

49 / 67

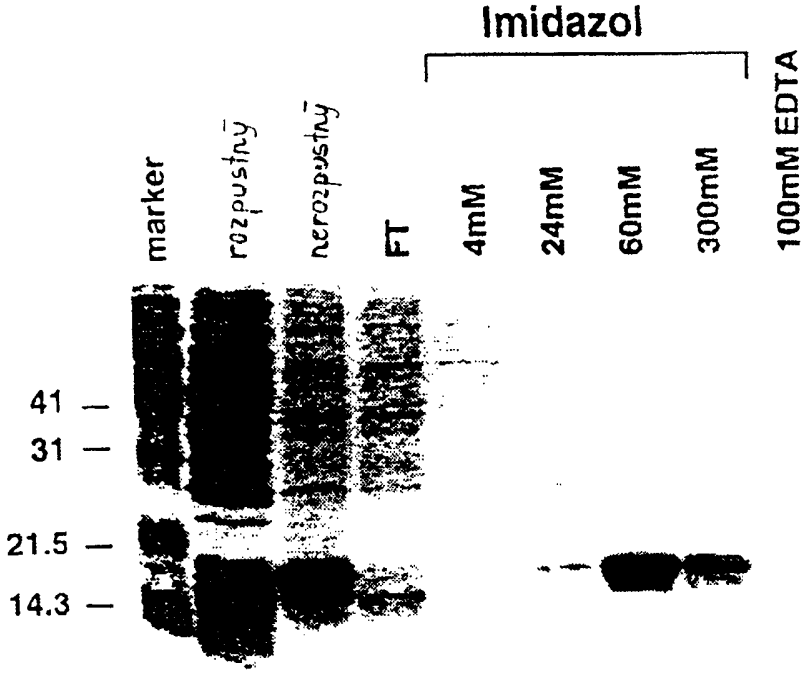
Ľudský ob



Peptid	Hmota (Da)	
	Očakávané	Získané
22-167	16,024	16,024 ± 3
22-75	5936.9	5936.6 ± 1
76-89	1562.7	N.D.
90-167	8434.5	8435.6 ± 1
158-167	1131.9	N.D.

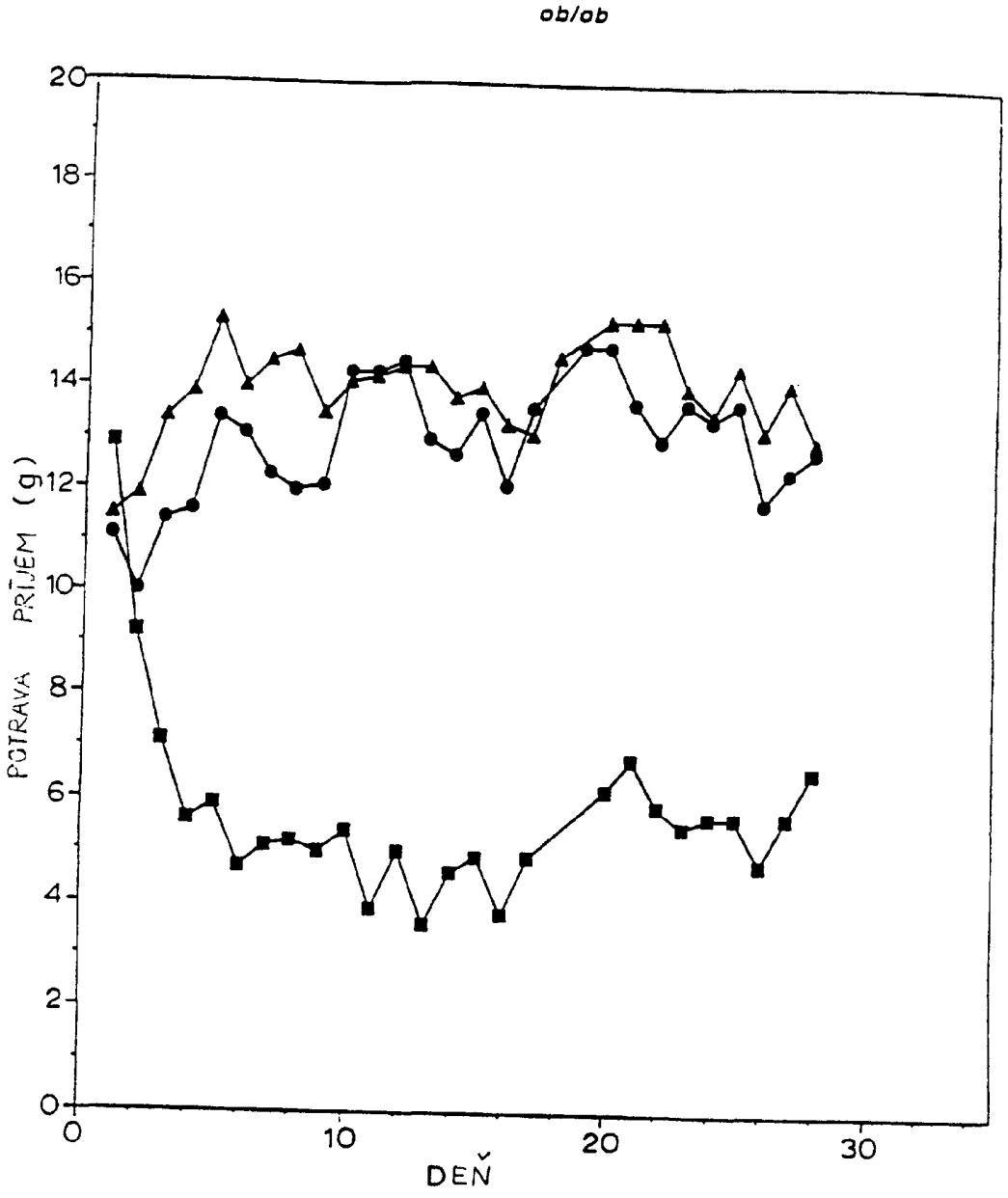
Obr. 26B

50 / 67

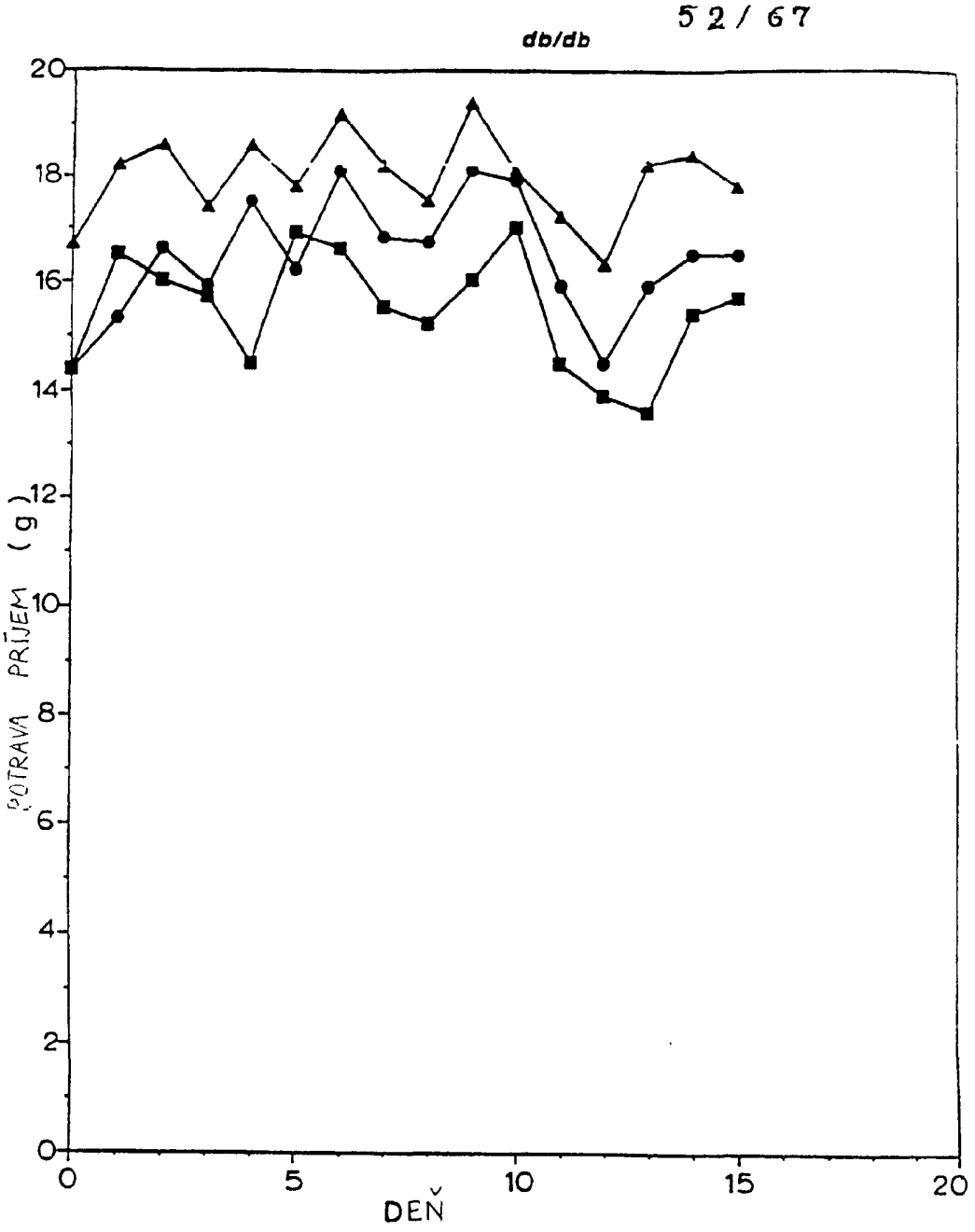

Imidazol
marker
rozpustný
nerozpustný
FT
4mM
24mM
60mM
300mM
100mM EDTA
41
31
21.5
14.3

Obr. 27

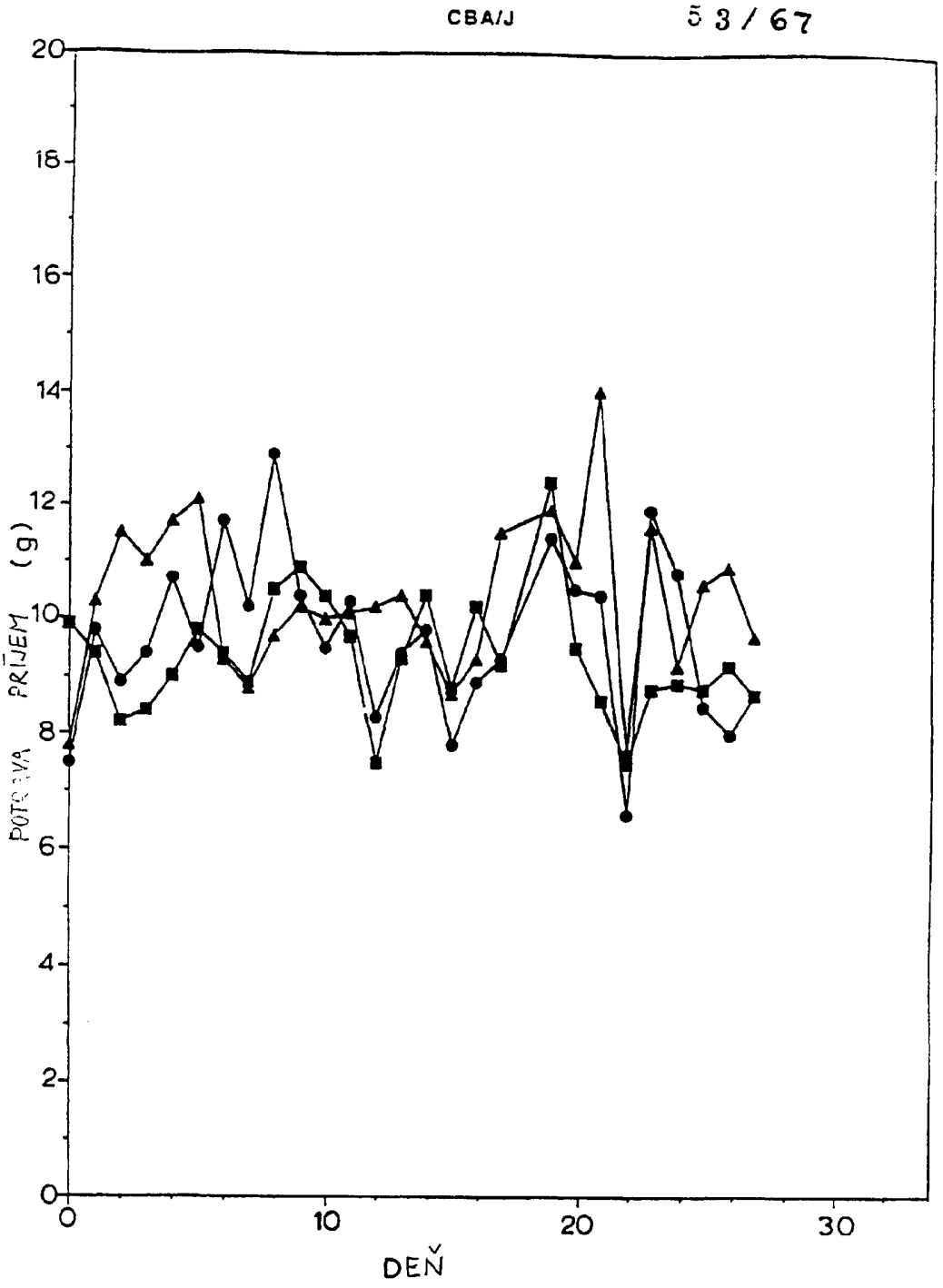
51/67



Obr. 28A

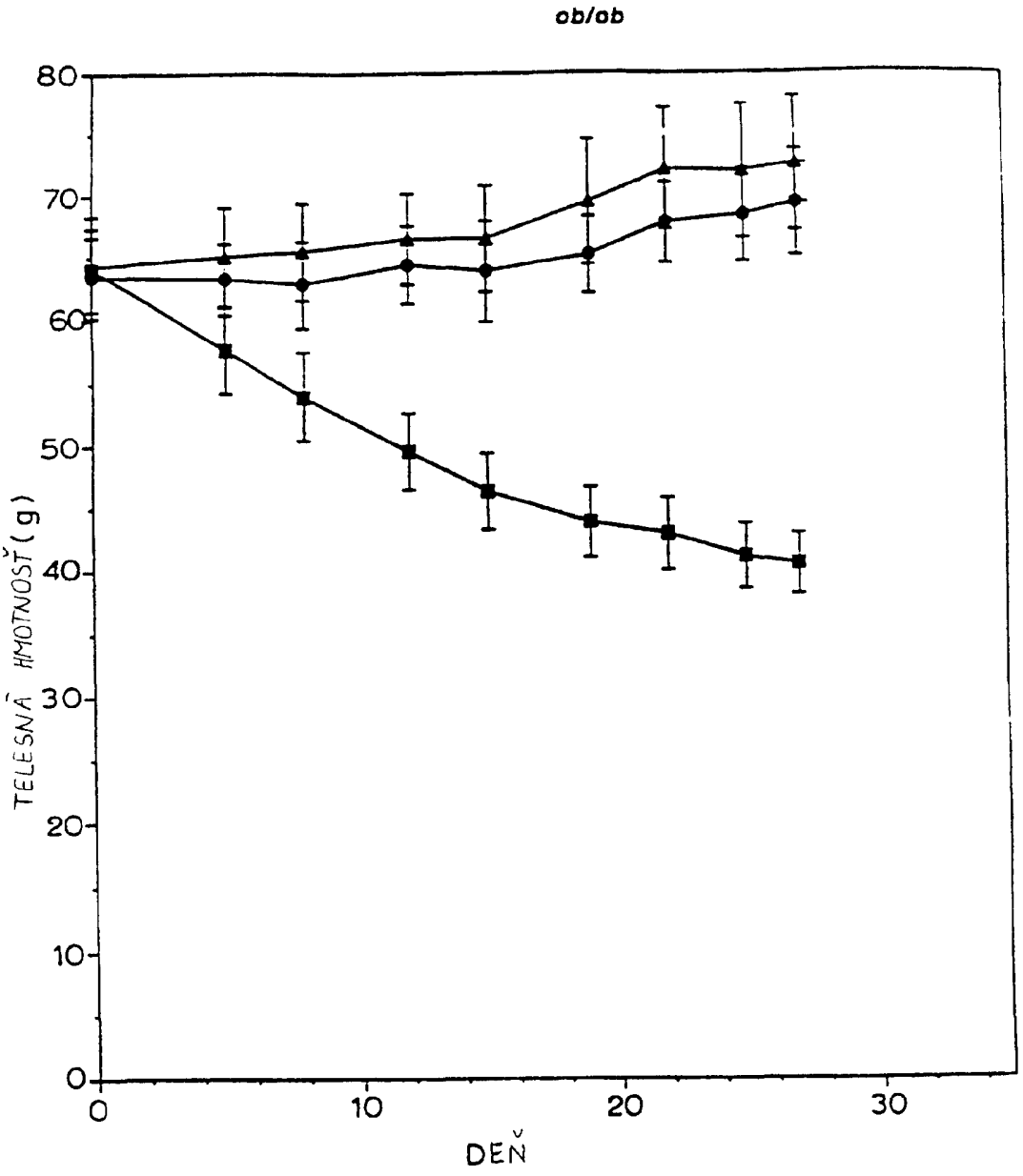

52 / 67
db/db
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
20
DEŇ
PRÍJEM POTRAVY (g)

Obr. 28B

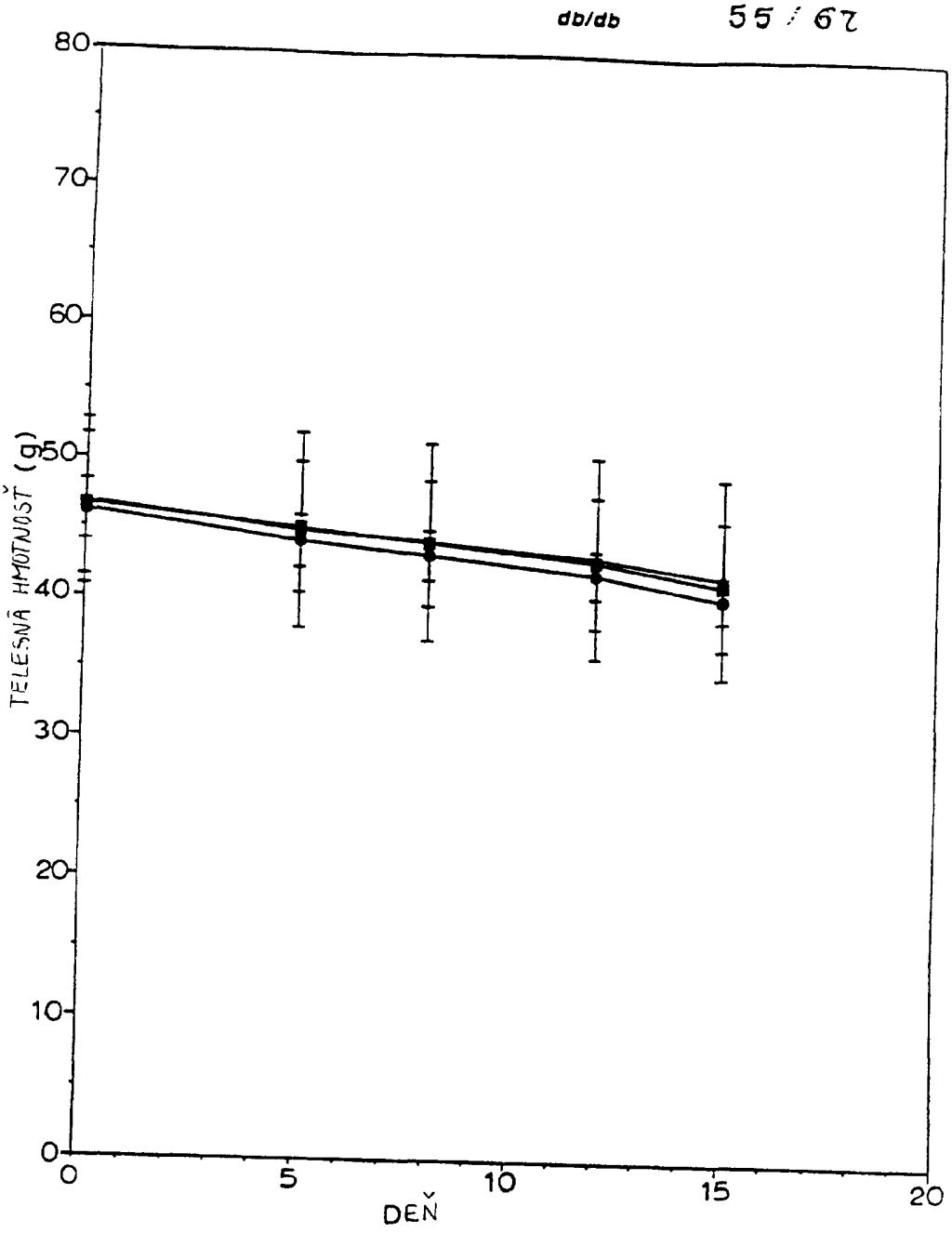


Obr. 28C

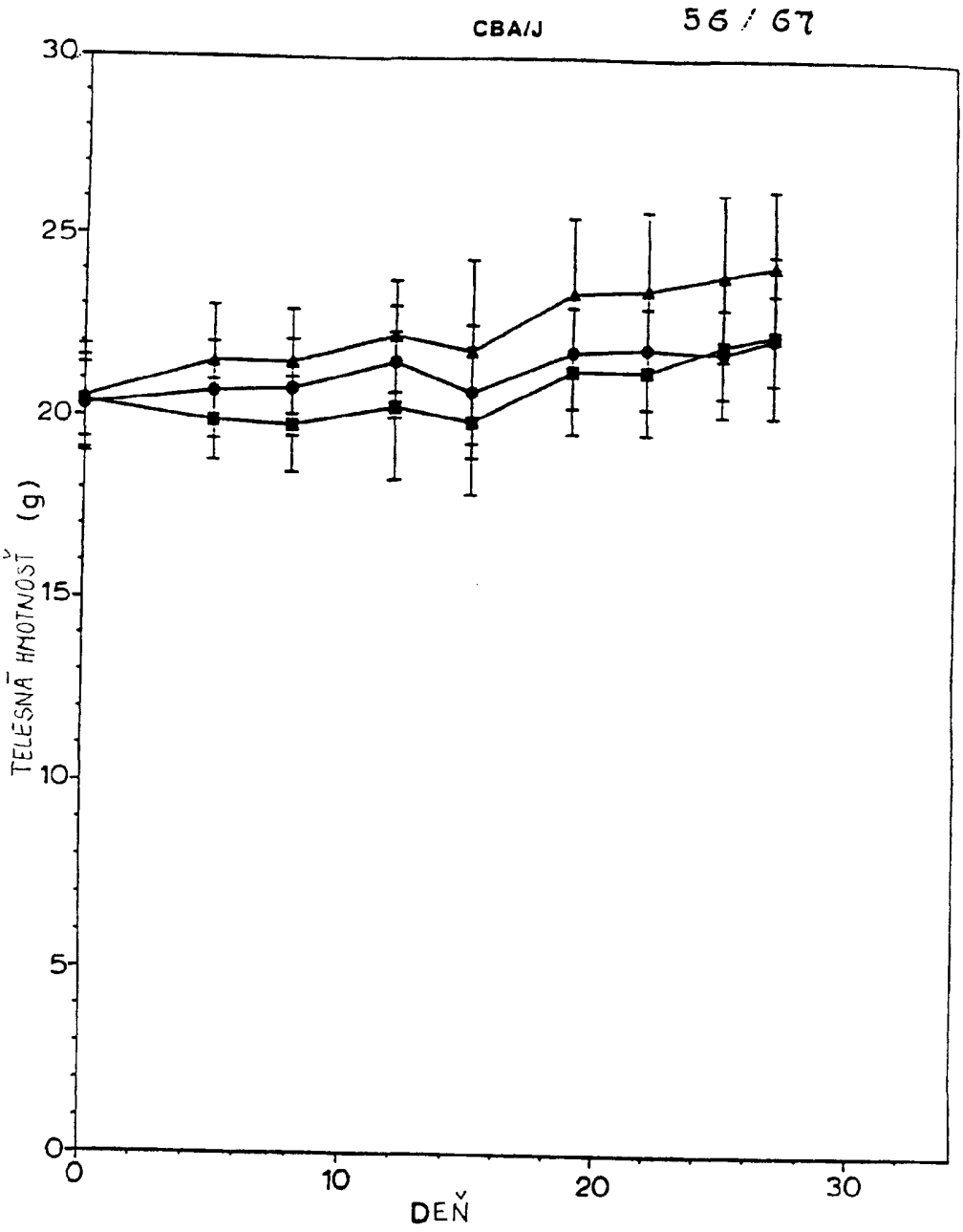
54 / 67



Obr. 28D

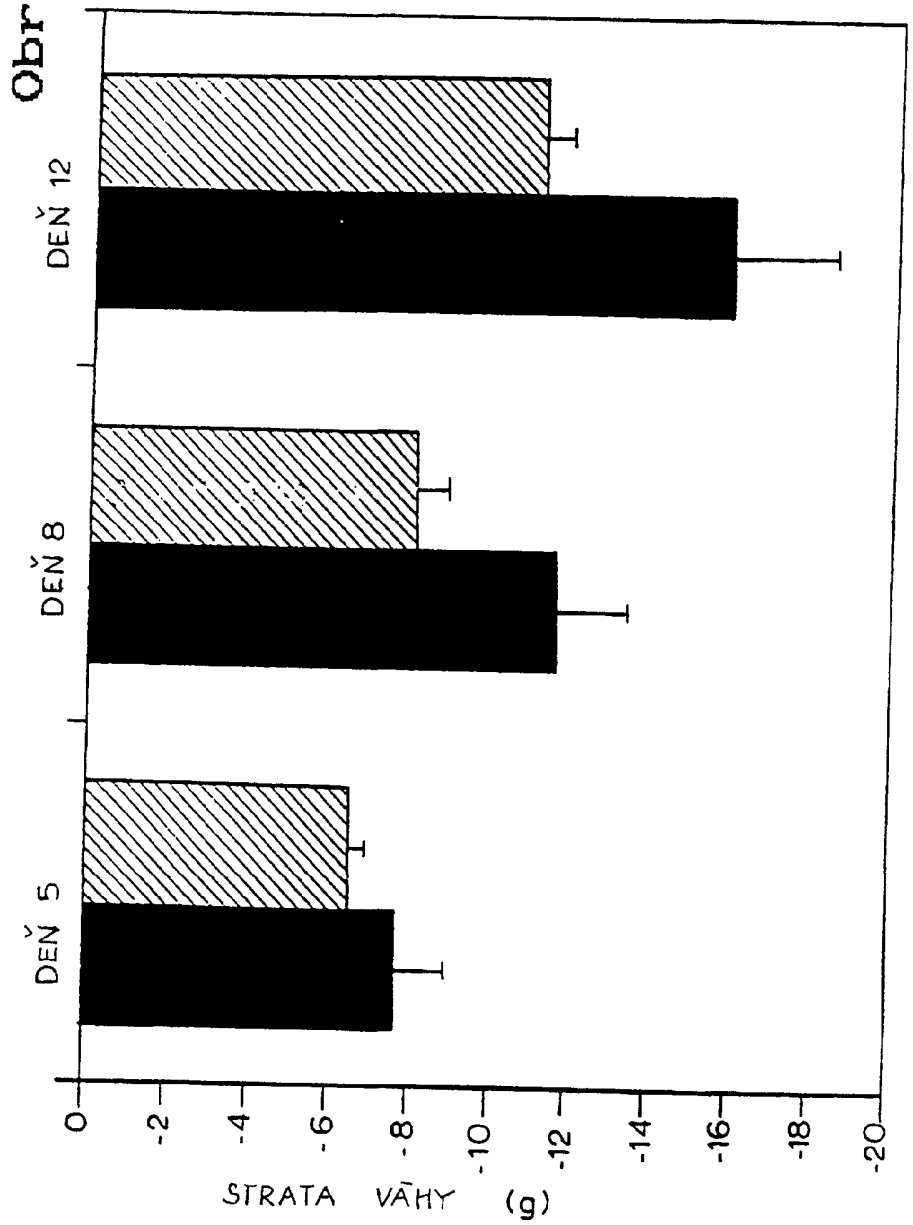

db/db
55 / 67
80
70
60
50
40
30
20
10
0
TELESNÁ HMOTNOSŤ (g)
0
5
10
15
20
DEŇ

Obr. 28E



Obr. 28F

Obr. 29A



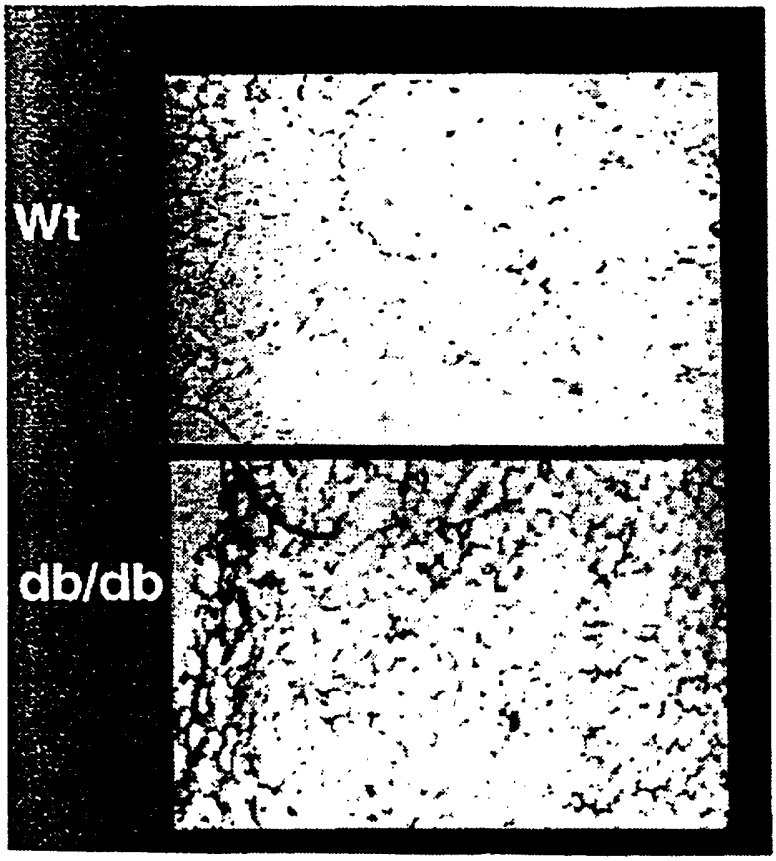


Obr. 29B

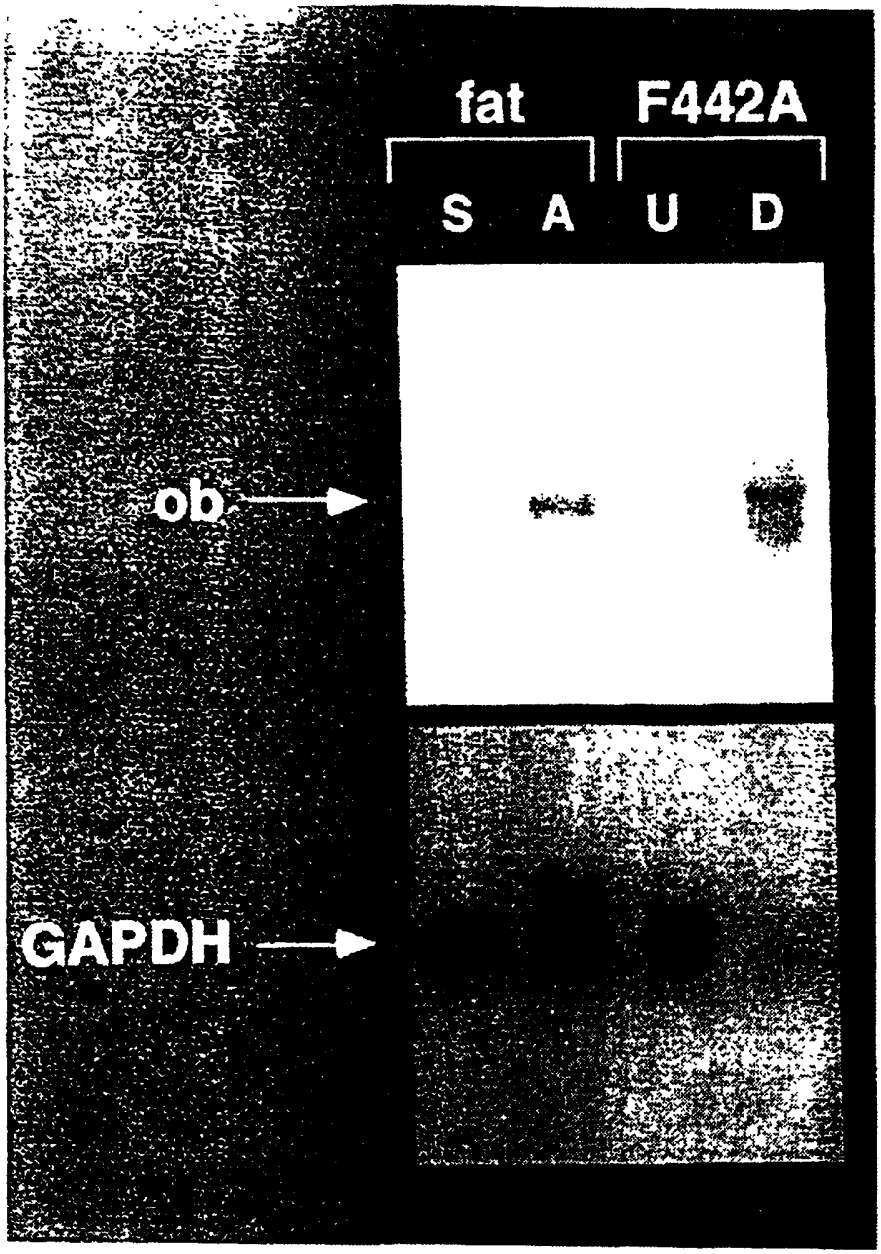


Obr. 29C

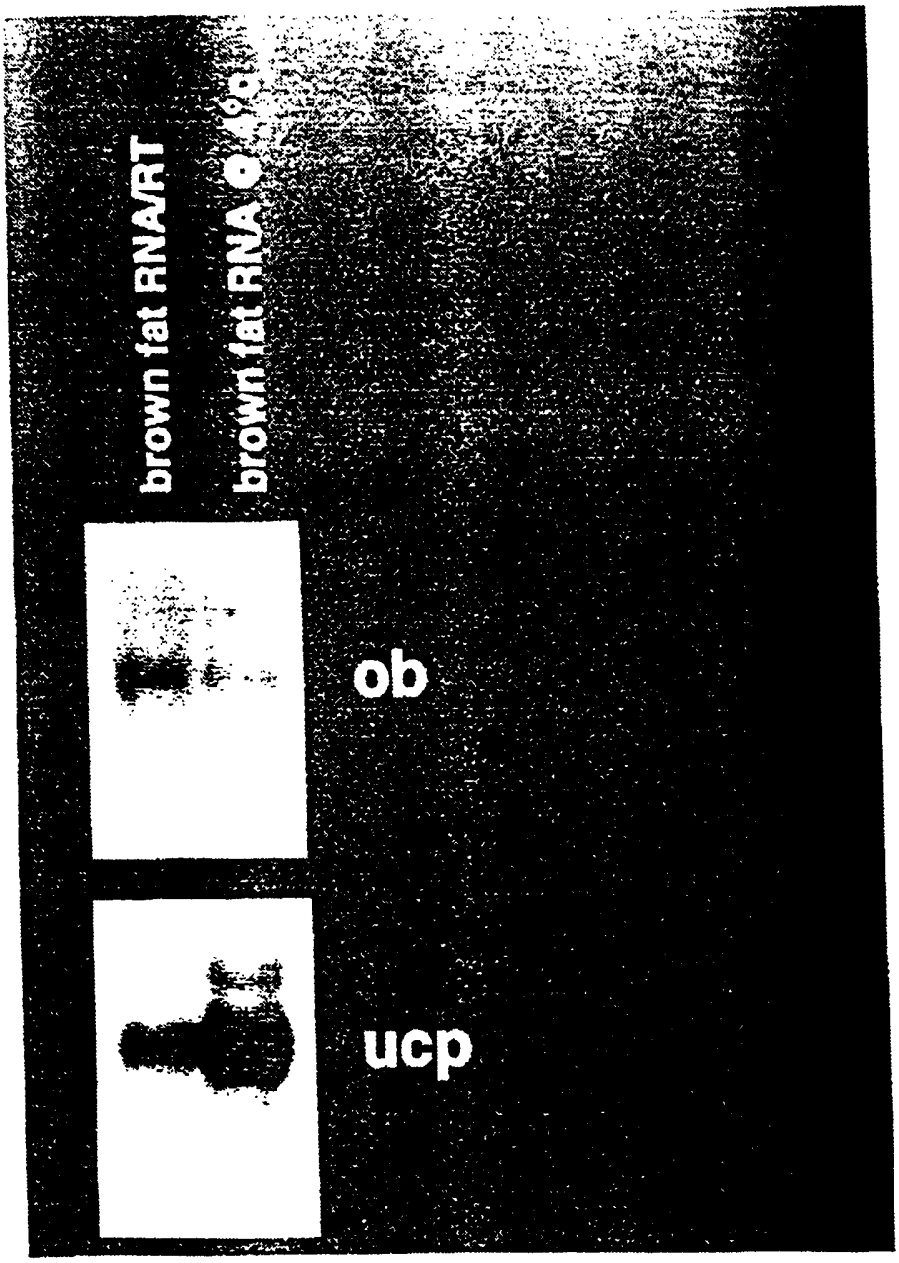
60 / 67



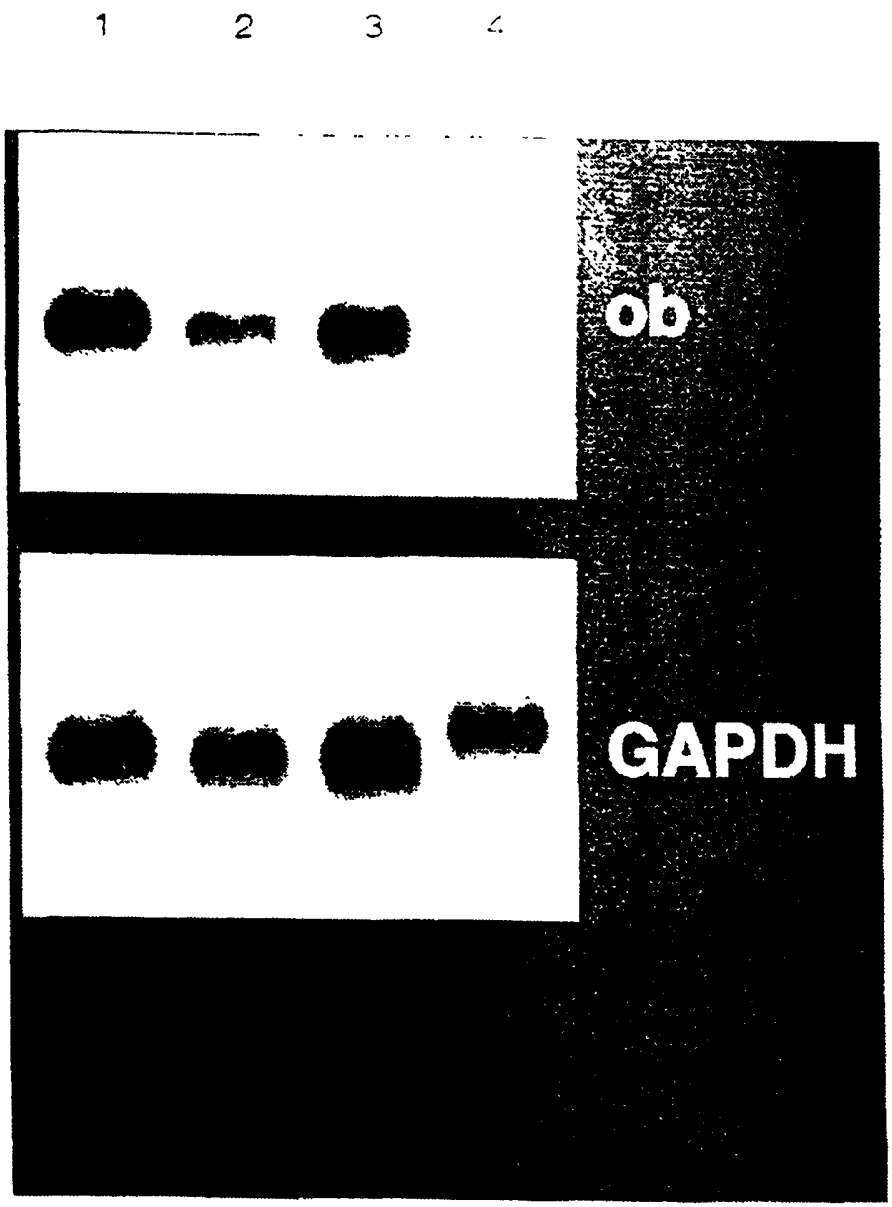
Obr. 30



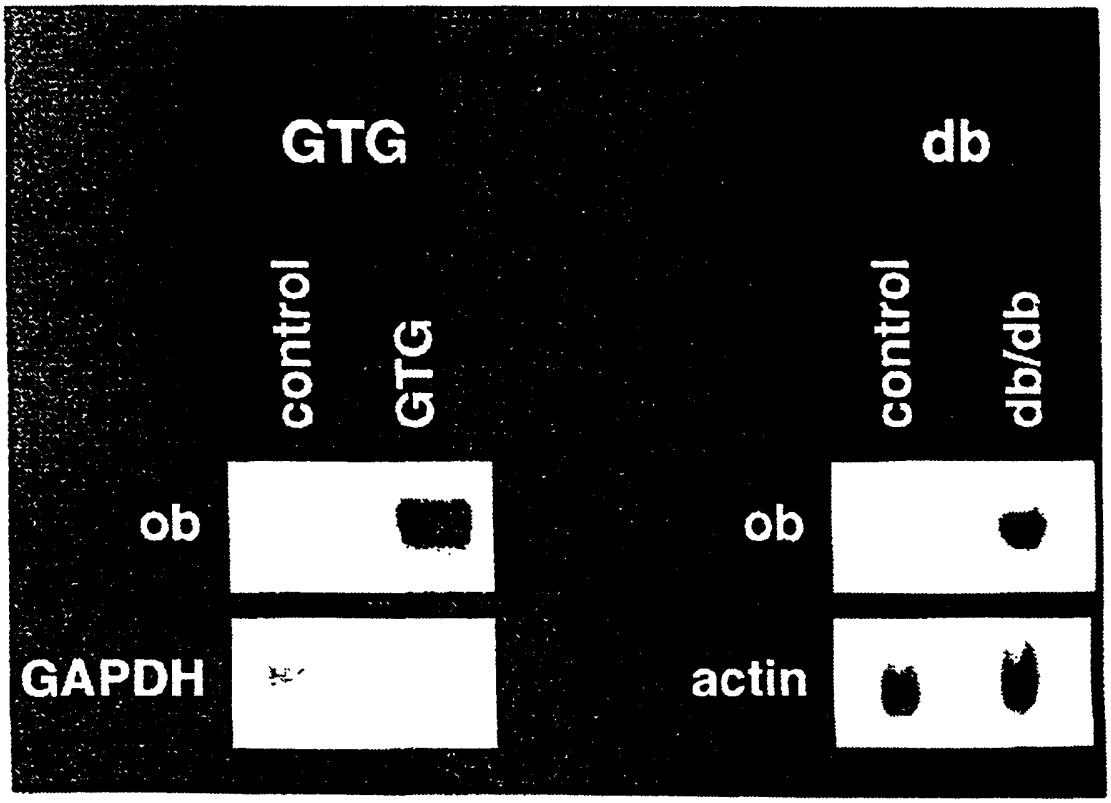
Obr. 31



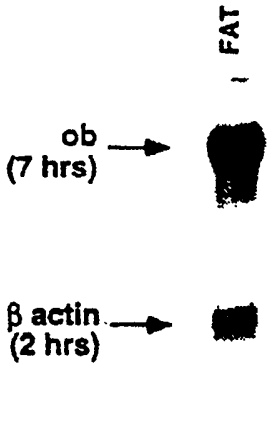
Obr. 32B



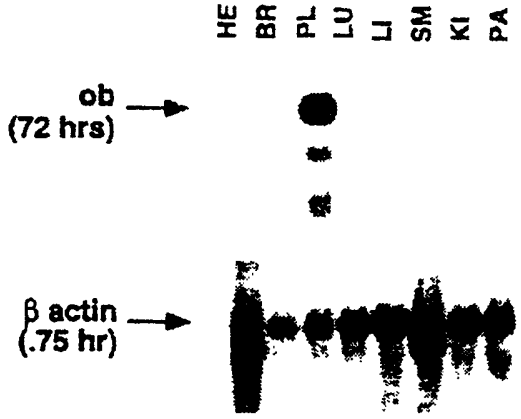
Obr. 32A



Obr. 33

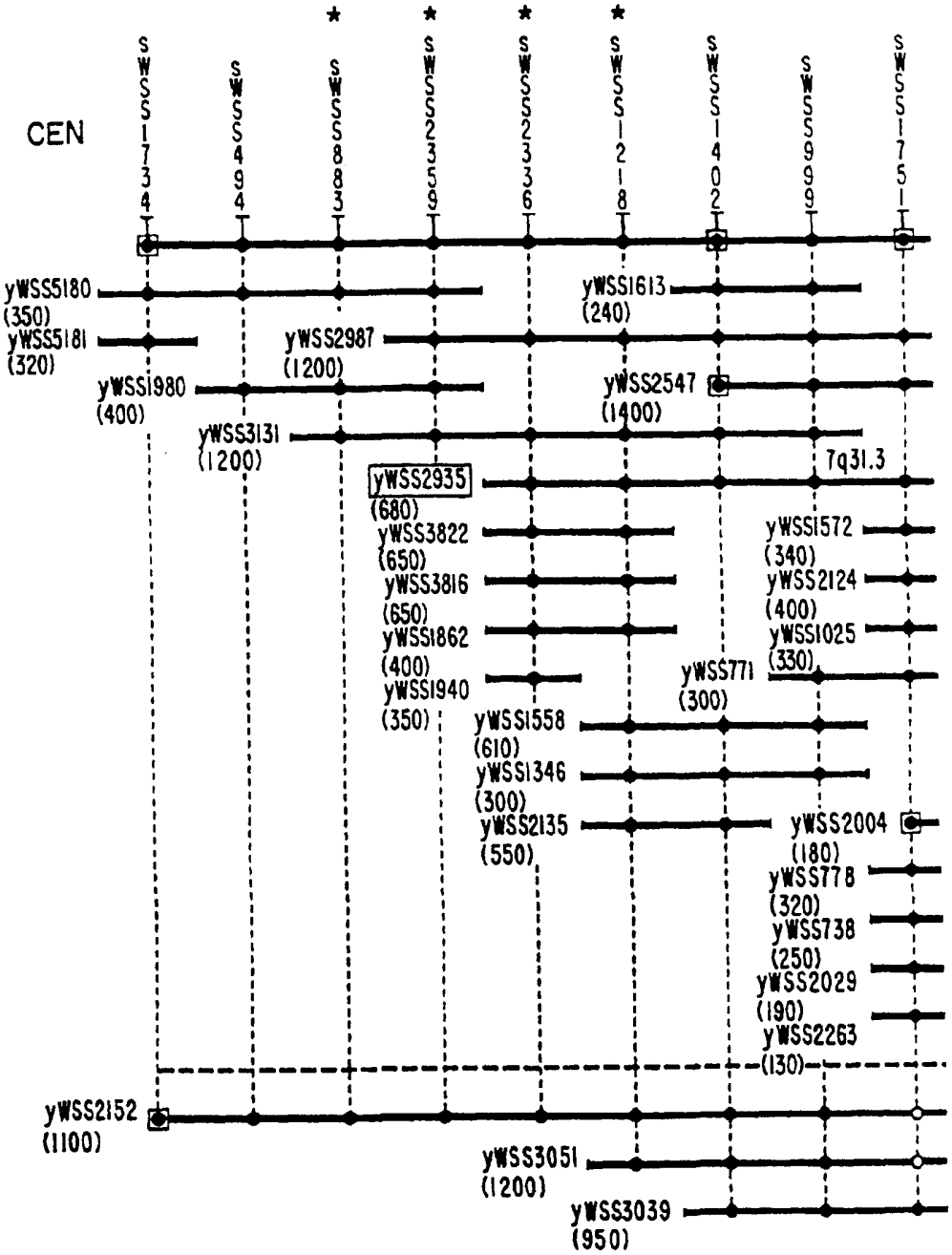


Obr. 34A



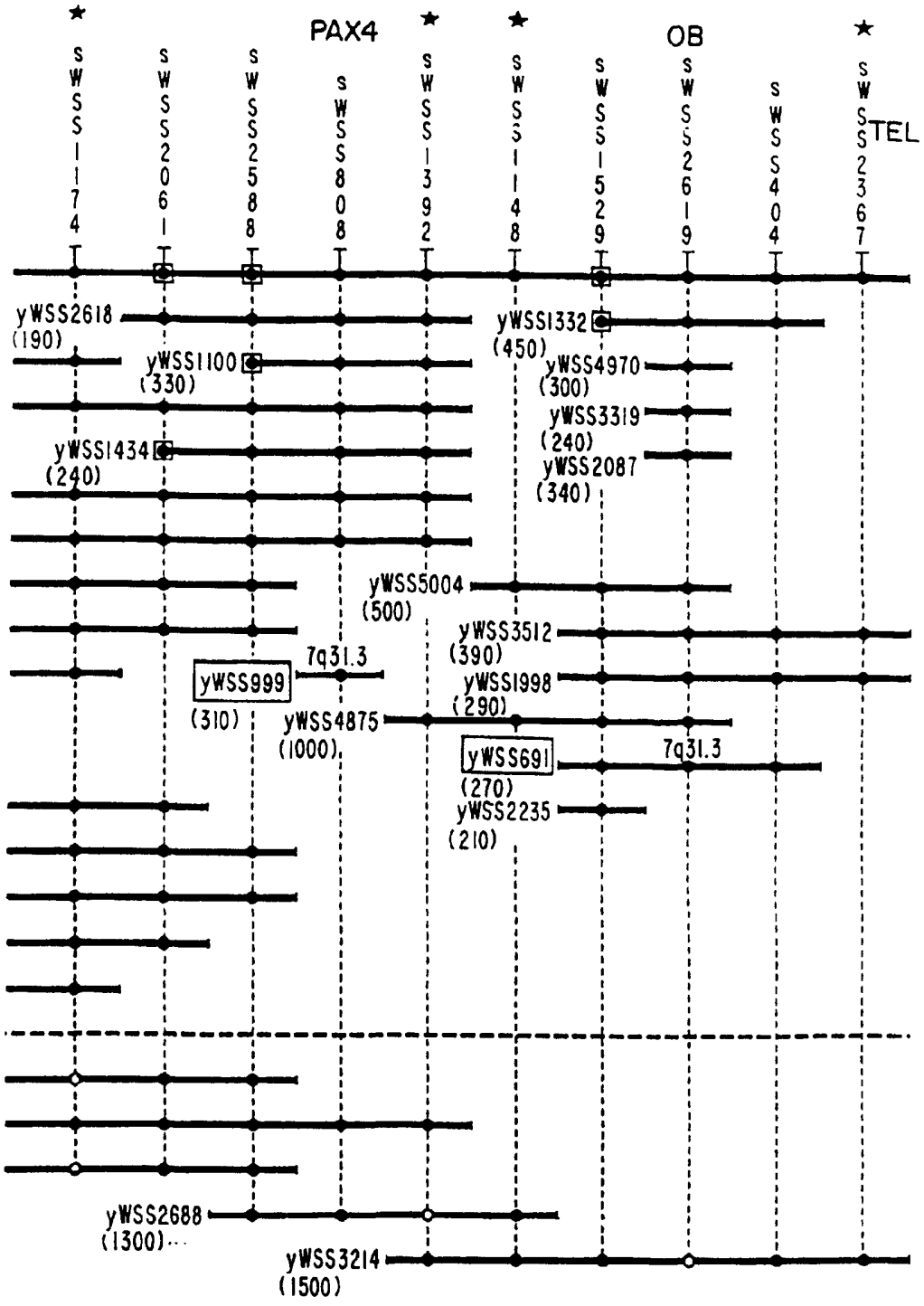
Obr. 34B

Obr. 35A


CEN
SWSS1734
SWSS494
SWSS883
SWSS2359
SWSS2336
SWSS2128
SWSS1402
SWSS999
SWSS1751
yWSS5180
(350)
yWSS5181
(320)
yWSS1980
(400)
yWSS3131
(1200)
yWSS2987
(1200)
yWSS1613
(240)
yWSS2547
(1400)
7q31.3
yWSS2935
(680)
yWSS3822
(650)
yWSS3816
(650)
yWSS1862
(400)
yWSS1940
(350)
yWSS1572
(340)
yWSS2124
(400)
yWSS1025
(330)
yWSS771
(300)
yWSS1558
(610)
yWSS1346
(300)
yWSS2135
(550)
yWSS2004
(180)
yWSS778
(320)
yWSS738
(250)
yWSS2029
(190)
yWSS2263
(130)
yWSS2152
(1100)
yWSS3051
(1200)
yWSS3039
(950)

67/67

Obr. 35B



Koniec dokumentu