

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 62975 B1



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

6(51) C 12 N 15/12
C 12 N 1/21
C 07 K 14/47
A 61 K 38/17
A 61 K 47/48
 //(C 12 N 1/21,
C 12 R 1:19)

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 100558

(22) Заявено на 03.05.96

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 435777 (32) 05.05.95 (33) US
484629 07.06.95 US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 3 на 31.03.97

(45) Отпечатано на 29.12.2000

(46) Публикувано в бюлетин № 12
на 29.12.2000

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):

F. HOFFMANN - LA ROCHE AG,
BASEL (CH)

(72) Изобретател(и):

Arthur Campfield, Verona, NJ (US)
Rene Devos, Oostende
Yves Guisez, A. Brugge (BE)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Снежана Георгиева Виткова, 1404 София,
ул. "Н. Каменов" бл. 252, вх. 4, ап. 76

(86) № и дата на PCT заявка:

(87) № и дата на PCT публикация:

(54) РЕКОМБИНАНТНИ ПРОТЕИНИ НА ЗАТЛЪСТЯВАНЕТО

(57) Изобретението се отнася до протеини, които модулират телесното тегло на животни и хора и се прилагат за лечение, профилактика и контрол на затлъстяването и свързаните с него заболявания. Изобретението се отнася и до рекомбинантното експресиране на тези биологично активни протеини в пречистена и хомогенна форма.

39 претенции, 3 фигури

BG 62975 B1

(54) РЕКОМБИНАНТНИ ПРОТЕИНИ НА ЗАТЛЪСТЯВАНЕТО

Известно е, че затлъстяването е най-тривиалното хранително заболяване в западното общество (Zhang, Y. et al., *Nature* 372, 425-432 (1994). Повече от трима на всеки десет възрастни американци имат поне 20% наднормено тегло (Zhang, Y. et al.). Наднорменото телесно тегло е обществен здравен проблем, защото е свързан с голям брой медицински заболявания като диабетен мелитус тип II или неинсулинов зависим диабетен мелитус, хипертония и хиперлипидемия (Grund, SM. и Barnett, *Disease-a-Mouth* 36, 645-696 (1990). Очевидно е, че телесното тегло се регулира по физиологичен начин и затлъстяването поради това и свързаните с него състояния или заболявания се дължат отчасти на увреждания в това регулиране (Zhang, Y., et al. *supra*).

При гризачи са описани седем единични генни мутации, които водят до получаване на фенотип на затлъстяването, пет мутации, от които се намират при мишки. От тези седем модела при гризачи най-добре е изучена мутацията на гена на затлъстяването (ob гена) при мишки, който е идентифициран през 1950 г. (Ingalls, A.M. et al. *J.Hered.* 41, 317-318 (1950). Хомозиготните мишки по тази ob генна мутация са силно затлъстели, с развит диабетен мелитус тип II и са хиперфагични и хиперметаболични, като част от синдрома, приличащ на заболяването затлъстяване при човека (Friedman J.M., et al, *Genomics* 11, 1054-1054-1062 (1991).

Този ген на затлъстяването /ob ген/ се разпределя при мишия проксимален хромозом 6 и кодира протеин, например ob протеин, който е експресиран в адипозна тъкан (Zhang, Y. et al.). Хомозиготните мишки по ob генната мутация слабо или въобще не продуцират този ob протеин и съответно имат нарушено регулиране на телесното тегло, което води до затлъстяване.

Мишите или човешки ob протеини могат да се прилагат на болни, страдащи от увреждания или изменения в техния съответен ген на затлъстяването (ob ген), които увреждания или изменения предпазват или влизат във взаимодействие при продуцирането и/или функцията на ob протеините при модулирането на телесното тегло. При това тези протеини могат да се използват като хормоноподобни вещества за контрол, профилактика или лечение на затлъстяването и свързаните с него състояния при хора и

животни.

За да се използват по този начин мишите или човешки ob протеини могат да се прилагат инжекционно интраперитонеално, интравенозно, интрамускулно или подкожно в многократни дози. Тъй като се прилагат чрез многократни инжекции, важно е мишите или човешки ob протеини да бъдат пречистени, за предпочитане до хомогенност, за да са лишени от онечистващи протеинови продукти и да бъдат рекомбинантно експресирани в разтворима и биологично активна форма. За специалистите в областта е известно, че онечистващите вещества, присъстващи в инжекционната лекарствена форма, могат да причинят често странични токсични ефекти или неблагоприятен имунологичен отговор.

Докато последователността на мишия ob ген е описана от Zhang, Y. et al., то не са съобщени никакви методи за експресиране на мишия протеин на затлъстяването (ob протеин) или на съответстващия на него ob протеин, но изолиран от човек. Още по-малко са известни методи за продуцирането на тези протеини в биологично активна и разтворима форма, от която протеините могат да се пречистят до хомогенност. Следователно това е важно и един от обектите на изобретението е да се експресират и продуцират ob протеините от мишки и хора в хомогенна, разтворима и биологично активна форма.

Установено е, че рекомбинантните човешки и миши ob протеини могат да се експресират в биологично активна и разтворима форма и след това да се пречистят до хомогенност, подходяща за инжектиране на болни за лечение, профилактика или контрол на затлъстяването и свързаните с него състояния и заболявания като диабетен мелитус тип II, хипертония, хиперлипидемия и други.

Съгласно изобретението човешките и миши ob протеини могат да се продуцират рекомбинантно в биологично активна форма и пречистени до хомогенност чрез изграждане най-напред на нови експресионни вектори за *Escherichia coli* (*E.coli*).

Тези експресионни вектори съдържат промотор и ДНК последователност, която ДНК последователност кодира слят протеин, който се състои от две части: сигналният пептид на външния мембранен протеин A на *E.coli*, например sOmpA, и човешкия или миши ob протеин. Съгласно изобретението следващият етап за продуцирането на биологично активна рекомбинантна

форма на човешки и миши об протеини е да се включи този експресионен вектор в *E.coli* гостоприемник, докато се получи ефикасно експресиране и транслокация на слетия протеин в периплазматичното пространство, например между вътрешните и външните клетъчни мембрани на микроорганизма *E.coli* до момента, в който сигналният пептид се отрязва от об протеина, като по този начин освобождава об протеина в разтворима и биологично активна форма. След това об протеините ефикасно се отделят в разтворима и биологично активна форма в среда, несъдържаща клетки, с последващо третиране на клетките на гостоприемника *E. coli* чрез студен осмотичен шок, дотогава, докато об протеините се пречистят до хомогенност чрез последователно използване на анионно-обменна хроматография, хидрофобна интерактивна колонна хроматография и гел филтрация, проведени в този ред.

Изобретението се отнася също до: 1) експресионен вектор, който съдържа ДНК, кодираща слет протеин, който се състои от sOmpA сигнален пептид и човешки или миши об протеин; 2) до организъм-гостоприемник, трансфектиран или трансформиран чрез такъв експресионен вектор; 3) до последователността на ДНК, кодираща човешкия об протеин, и 4) до полиетилен или полипропиленгликоли конюгати на об протеина.

Изобретението се отнася също и до методи за експресиране на рекомбинантни човешки и миши об протеини в биологично активна и разтворима форма, и до методи за продуциране на тези протеини в пречистена хомогенна форма, подходяща за прилагане на животни и хора.

Методът за експресиране и продуциране на протеина на затлъстяването /об протеина/ от мишки съгласно изобретението се осъществява, като се използва мишият об ген, описан от Zhang, Y. et al., като този ген има нуклеотидна последователност от 702 базови двойки /бд/, която е идентифицирана тук като SEQ ID NO: 1. Тази миша об генна последователност съдържа кодираща последователност от 501 бд или отворена рамка на разчитане (ORF), която започва със стартов кодон при нуклеотид 36 и завършва със стопкодон при нуклеотид 537 и има нетранслирани последователности при 3' и 5' краищата. Отворената рамка на разчитане /ORF/ съдържа сигнална последователност с 63 бд при нуклеотид от 36 до 98.

Тази миша об генна последователност представлява и кодира мишия об протеин и

неговата сигнална последователност, чиято аминокиселинна последователност има 167 аминокиселини дължина и е идентифицирана като SEQ ID NO: 2.

В този протеин с SEQ ID NO: 2 първите 21 аминокиселини представляват сигналната последователност на мишия об протеин. Зрелият миши об протеин без неговата сигнална последователност продължава от аминокиселина 22 (Val) до аминокиселина 167 (Cys) и е представена като SEQ ID NO: 3.

Методът за експресиране и продуциране на човешки об протеин съгласно изобретението се осъществява, като се използва човешки об ген, който има нуклеотидна последователност с 690 бд, и който ген е идентифициран като SEQ ID NO: 4.

В цитираната литература Zhang, Y. et al. описват гена на затлъстяването (об гена) като високо хомоложен на мишия об ген и разкриват подходящ метод, използващ олигонуклеотидни матрици, които са ориентирани към мишия об ген. Този метод може да се използва за 1) скриниране на сДНК библиотека от клонове, получени от човешка (дипозна тъкан, 2) за идентифициране на тези клонове, имащи човешкия об ген, и 3) да се изолира и секвенира последователността на човешкия ген на затлъстяването / об ген/. Когато се секвенира по конвенционални методи, тази последователност на човешкия об ген се определя, че има нуклеотидната последователност SEQ ID NO:4.

Както мишият об ген, така и човешкият об ген съдържа кодираща последователност с 501 бд или отворена рамка на разчитане (ORF), стартираща с начален кодон при нуклеотид 37, и завършваща със стопкодон при нуклеотид 538, и имаща нетранслирани последователности при 3' и 5' краищата. Отворената рамка на разчитане съдържа 63 бд сигнална последователност от нуклеотид 37 до 99.

Тази човешка об генна последователност SEQ ID NO: 4 кодира човешки об протеин и неговата сигнална последователност, чиято аминокиселинна последователност от 167 аминокиселини дължина е идентифицирана като SEQ ID NO:5.

Първите 21 аминокиселини от този протеин със 167 аминокиселини дължина представляват сигналната последователност. Зрелият човешки об протеин, без неговата сигнална последователност, се простира от аминокиселина 22 (Val) до аминокиселина 167 (Cys) и е представен като SEQ ID NO:6.

Zhang, Y. et al. съобщават, че е установена 84% идентичност между мишия и човешкия об протеини. Те също са установили, че съществуват варианти на мишия и човешкия протеини, като един такъв вариант е охарактеризиран в двата вида чрез заличаване на глутамина.

Приблизително 30% от сДНК клоновете в библиотеките, получени от адипозна тъкан на мишки и човешка адипозна тъкан, са с липсващ кодон 49.

По-долу са представени дефинициите на използваните в описанието термини:

Миши об протеин (mob) означава протеин със SEQ ID NO: 3, чиито биологични свойства имат отношение към лечението, контрола или профилактиката на затлъстяването или свързаните с него състояния и заболявания. По-специално мишият об протеин се дефинира като включващ всеки протеин или полипептид с аминокиселинна последователност, която е по същество хомоложна на аминокиселинна последователност SEQ ID NO: 3, и освен това има следното биологично действие:

1) Когато протеинът или полипептидът се прилага чрез интрацеребровентрикуларна (ИЦВ) инжекция на възрастна затлъстяла об/ об мишка, обездвижена за 16-18 h и имаща телесно тегло поне 30 g с доза от най-малко 20 μ g, като се използват методите на Haley и McComick, Brit. J. Pharmacol. 12, 12-15 (1957), при това протеинът или полипептидът: а) редуцира усвояването на храната за период от 5 h хранителен тест с 50% в сравнение с контролна мишка, на която е инжектиран вехикул (което показва ED_{50} за редуциране усвояването на храна); и б) редуцира повишаването на телесното тегло през следващите 24 h след ИЦВ инжекция най-малко с 50% в сравнение с контролна мишка, на която е инжектиран вехикул (ED_{50} за редуциране повишаването на телесното тегло).

2) Когато протеинът или полипептидът се прилага интраперитонеално (ИП) на необездвижена възрастна об/ об мишка с тегло най-малко 30 g два пъти дневно в началото на деня и после на 3-ия h след стъмване, в продължение на една седмица, с обща дневна доза 20 μ g или по-малко, при това протеинът или полипептидът: а) редуцира 5 и 24-часовото усвояване на храната с поне 20% в сравнение с контролна мишка, инжектирана с вехикул (което е ED_{50} за редуциране усвояването на храна); и б) редуцира увеличаването на телесното тегло през следващите 24 h

след първата интраперитонеална инжекция поне с 20% в сравнение с контролна мишка, инжектирана с вехикул (което представлява ED_{50} за редуциране повишаването на телесното тегло).

Както е използван тук терминът, об протеин от мишка включва такива специално модифицирани протеини като например чрез сайт насочена мутагенеза или модифицирани случайно чрез мутации.

Човешки об протеин (hob) представлява протеин с SEQ ID NO:6, чиито биологични свойства се отнасят до лечението, профилактиката или контролирането на затлъстяването и свързаните с него състояния и заболявания. По-специално човешки об протеин е дефиниран като включващ всеки протеин или полипептид с аминокиселинна последователност, която е по същество хомоложна на аминокиселинната последователност SEQ ID NO:6, и освен това има следните биологични активности:

1) Когато протеинът или полипептидът се прилага ИЦВ на обездвижена възрастна об/ об мишка, обездвижена за 16-18 h и имаща телесно тегло поне 30 g с доза от най-малко 20 μ g, като се използват методите на Heley и MicComick, протеинът или полипептидът:

а) редуцира с 50% усвояването на храната за период от 5 h хранителен тест в сравнение с контролна мишка, на която е инжектиран вехикул (което представлява ED_{50} за редуциране усвояването на храна),

б) редуцира поне с 50% повишаване на телесното тегло през следващите 24 h след ИЦВ инжектиране в сравнение с контролна мишка, на която е инжектиран вехикул (което представлява ED_{50} за редуциране повишаването на телесното тегло).

2) Когато протеинът или полипептидът се прилагат интраперитонеално (ИП) на необездвижена възраст об/ об мишка с тегло най-малко 30 g два пъти дневно в началото на деня и после на 3-я час след стъмване, в продължение на една седмица, с обща дневна доза от 20 μ g или по-малко, при това протеинът или полипептидът: а) редуцира 5 и 24-часовото усвояване на храната поне с 20% в сравнение с контролна мишка, инжектирана с вехикул (което представлява ED_{50} за редуциране усвояването на храна), и б) редуцира увеличаването на телесното тегло през следващите 24 h след първото интраперитонеално инжектиране поне с 20% в сравнение с контролна мишка, инжектирана с вехикул (което

то представлява ED_{20} за редуциране повишаването на телесното тегло).

Както е използван тук терминът човешки об протеин включва такива специално модифицирани протеини като например чрез определено насочена мутагенеза или случайно чрез мутация. По същество хомоложен, който може да се отнася до последователност от нуклеинови киселини, също и до аминокиселинна последователност, означава, че една специфична производна, например мутантна последователност, се различава от указаната с едно или повече заместване, делеции или добавяния, окончателният ефект от които не води до неблагоприятно функционално различие между указаната и мутантната последователност. За целите на изобретението последователности, имащи повече от 95% хомоложност, еквивалентни биологически свойства и еквивалентни експресионни характеристики се смятат за хомоложни по същество. За определяне на хомоложността, съкращаването на зрялата последователност следва да се игнорира. Последователности, имащи по-ниска степен на хомоложност, сравнима био-активност и еквивалентни експресионни характеристики, се считат като еквивалентни по същество. По принцип хомоложни ДНК последователности могат да се идентифицират чрез кръстосана хибридизация при стандартни хибридизационни условия на умерен недостиг.

Фрагмент от об протеин от мишка или от човек означава всеки протеин или полипептид, имащ аминокиселинната последователност на част или на фрагмент от об протеин от мишка или от човек, и който има биологичната активност на об протеин от мишка или от човек, респективно. Фрагментите включват протеини или полипептиди, продуцирани чрез протеолитично разпадане на об протеини от мишка или от човек, или продуцирани чрез известни от нивото на техниката методи на химичен анализ.

Един об протеин или негов фрагмент е биологично активен, когато прилагането на протеина или на фрагмента му при бозайници и хора, редуцира усвояването на храната и намалява степента на напълняване при бозайниците. Определянето на тази биологична активност на об протеин от мишка или човек може да се проведе чрез конвенционални, добре известни тестове, използвани за тази цел върху един или повече видове бозайници, по-специално върху възрастна об/ об мишка. Някои от тези тестове, които могат да се използват за демонстриране на такава

биологична активност, са описани тук. При определяне на биологичната активност в съответствие с ИЦВ теста при об/ об мишка, както е описан тук, об протеинът от мишка или от човек за предпочитане има ED_{50} за редуциране усвояването на храна от 20 μ g или по-малко, ED_{50} за редуциране повишаването на телесното тегло от 20 μ g и по-малко. Съответно при определяне биологичната активност на об протеин от мишка или от човек в съответствие с ИП тест при об/об мишка, както е описано тук, об протеинът от мишка или от човек за предпочитане има ED_{20} за редуциране напълняването от 20 μ g или по-малко и ED_{20} за редуциране усвояването на храна от 20 μ g и по-малко. По принцип се предпочитат фрагменти, които проявяват гореспоменатата биологична активност.

Репликон е всеки генетичен елемент /като плазмид, хромозом, вирус/, който функционира като автономна единица от ДНК репликацията *in vivo*, например способен на репликация при неговия собствен контрол.

Експресионен вектор е репликон, като плазмид, фаг или козмид, към който може да се прикачи друг ДНК сегмент, така че да способства за репликацията на прикачения сегмент. Той се състои от транскрипционна единица, съдържаща комплекс от (1) генетичен елемент или елементи с регулаторна роля в генната експресия като промотори или усилватели, (2) структурна или кодираща последователност, която е транскрибирана в мРНК, и транслирана в протеин, и (3) подходяща последователност, иницираща транскрипцията и терминацията.

Клон е група от ДНК молекули, получени от една първоначална дължина на ДНК последователности, и продуцирани чрез бактерия или вирус, като се използват техники на генното инженерство, често включващи плаزمиди.

Сигнална последователност е последователност от нуклеинови киселини, локализирана в началото (5' края) на кодиращата последователност на протеина, който трябва да се експресираща. Тази сигнална последователност кодира сигнален пептид, N-терминален към новосинтезирания протеин, който направлява клетката на гостоприемника да транслокира протеина към или през мембраната на клетката на гостоприемника, и който сигнален пептид обикновено се скъсва по време на такава транслокация.

Стартов кодон е кодон, обикновено AUG локализиран в кодиращата последователност на

протеин, и обикновено при 5' края и сигнализира първата аминокиселина в последователността на протеина.

Стоп кодон е безмислен кодон, локализиран обикновено в 3' края на кодиращата последователност на протеина, и сигнализира края на растящата полипептидна верига.

Отворена рамка на разчитане е линейно подреждане на кодонови триплети в двуверижна ДНК кодираща аминокиселинна последователност в клетка *in vitro* или *in vivo*, когато е под контрола на подходящи регулаторни последователности. Границите на отворената рамка на разчитане се определят от стартовия кодон при 5' края и от стопкодона при 3' края. Той също може да се обясни като "кодираща последователност".

Промоторна последователност е регулаторна област от ДНК, способна да свързва РНК полимеразата в клетка и иницираща транскрипцията на насочена при 3' края отворена рамка на разчитане на един или повече структурни гени. Промоторната последователност обикновено е локализирана при 5' края на сигналната последователност или отворената рамка на разчитане и разширява посоката в 5' края, за да включи минималния брой бази или елементи, необходими да иницират транскрипция на полипептида в степен, превишаваща горния бекфон.

Кодираща последователност или отворена рамка на разчитане е под контрол на промоторна последователност, когато РНК полимеразата транскрибира кодиращата последователност в мРНК.

Състав, съдържащ А (където А е единичен полипептид), е хомогенен за А, когато няма значително количество от контаминиращи протеини или други ендогенни материали, както може да се установи чрез конвенционални начини, например чрез оцветяване на полиакриламидни гелове. За целите на изобретението терминът хомогенен означава състав, съдържащ единичен протеин или полипептид, когато поне 95% от теглото на състава е този единичен протеин или полипептид.

Следващите етапи описват методите за рекомбинантно експресиране на об протеини от мишки и човек в биологично активно състояние и разтворимо свободно от клетки състояние, очистени от други протеини от бозайници, от които об протеините после могат да се пречистят до хомогенност. Тези етапи са описани подробно в примерите.

1) Получаване на об гени от мишки и човек. сДНК с (SEQ ID NO:1), кодираща об

протеина от мишка плюс неговата естествена сигнална последователност, е описана от Zhang, Y. et al. Тази сДНК от мишка е била изолирана и амплифицирана чрез PCR техника, като се използват олигодезоксинуклеотидни ДНК праймери чрез конвенционални техники. Тези ДНК праймери и методите за получаването им са описани от Zhang, Y. et al.

сДНК (SEQ ID NO:4) кодираща човешки об протеин плюс неговата естествена сигнална последователност се получава, като се използват същите олигодезоксинуклеотидни ДНК праймери, използвани от Zhang, Y. et al., за получаването на об ген от мишка. Като се използва конвенционална техника, тази човешка сДНК е била изолирана от ламбенада фаг на сДНК библиотека, получена от РНК, дериват от човешка адипоцитна тъкан.

Човешка об сДНК или от мишки може да се получи не само от сДНК библиотеки, но и чрез други известни начини, например чрез химически синтез, или чрез клониране на геномна ДНК, или нейни фрагменти, пречиствана от желаните клетки. Тези процедури са описани от Sambrook et al. в "DNA Cloning: A Practical Approach" Vol. I. и II, D.N. Glover, 1985, MRL Press, (1977); и Grunstein Hogness, Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 3961-3965 (1975). За да се получи об сДНК от човек или от мишка от сДНК библиотеки, същите се скринират чрез конвенционални ДНК хибридизационни техники по методите на Benton и Davis, или Grunstein и Hogness пак там, като се използват праймери, приготвени чрез обратима транскрипция на полиаденилирана РНК, изолирана от адипозни клетки на мишка, съдържащи об ген от мишка. Клонове, които хибридизират в праймерите, се анализират чрез рестриктивно ендонуклеазно разцепване, агарозна гел електрофореза и допълнителни хибридизационни експерименти ("Southern blots"), включващи електрофорезните праймери. След изолирането на няколко клонове, които хибридизират до сДНК матрици от мишка хибридизираният сегмент на един клон е субклониран и секвениран чрез известни техники.

Клоновете, получени от геномна ДНК, могат да съдържат регулаторни и интронни ДНК области в добавка към кодиращите области: клоновете деривати от сДНК няма да съдържат интронни последователности. В молекулярното клониране на гена от геномна ДНК фрагменти са генерализирани, някои от които ще кодират

желания ген. ДНК може да бъде разкъсана при специални участъци, като се използват различни рестрикционни ензими. Съответно може да се използва ДНК-аза в присъствие на манган за фрагментиране на ДНК или ДНК може да бъде физически срязана, например чрез ултразвук. Линейните ДНК фрагменти после могат да се разделят в зависимост от размерите чрез стандартни техники, включително, но без да се ограничават да агарозна и полиакриламидна гел електрофореза и колонна хроматография.

В зависимост от източника, об генът от човек или мишка може да бъде молекулярно клониран в подходящ вектор за размножаване на гена чрез известни от нивото на техниката методи. Може да се използва всеки търговски достъпен вектор. Например сДНК от мишка може да бъде включен в рсДНК3 вектор и човешката сДНК може да бъде интегрирана в рВ luescriptSK вектор. Подходящи вектори за използване с бактериални гостоприемници са описани от Pouwels et al., "Cloning Vectors: A Laboratory Manual", 1985, Elsevier, N.Y. Като избрани примери, използващи клониращи вектори за бактериална употреба, могат да съдържат селектируем маркер и да имат бактериален произход на репликация, получени от търговски достъпни плазмиди, които са получени от добре известен клониращ вектор рBR322 (ATCC 37017). Такива търговски вектори включват рKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) и рGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisc., USA).

Нуклеотидните последователности на об ген от човек или от мишка, включени в тези търговски достъпни вектори, могат да се проверят чрез известни от нивото на техниката методи и чрез стандартни нуклеотидни секвенционни техники.

Могат да се използват и други нуклеинови киселини, които кодират об протеини от видове, различни от човек или мишки. Съответно, когато дадена ДНК е била клонирана и секвенирана във връзка с об ген от човек и от мишка, потенциално всеки животински адипоцит може да се използва като източник на нуклеинова киселина за протеина.

Образуване на експресионен вектор за об протеин от мишка или човек.

Човешки об протеини или от мишка, клонирани в съответствие с методите, описани по-горе, са използвани, за да се образуват експресионни вектори за об протеини от човек или миш-

ка, съответно.

За експресия на биологично активен об протеин от човек или от мишка чрез трансфектирана или трансформирана клетка от гостоприемника *E.coli* и за секретирането на об протеина в периплазмата може да се използва нов експресионен вектор. Този експресионен вектор включва промотор и ДНК последователност, кодираща слят протеин. Слетият протеин се състои от две части: първата част е сигнален пептид за външния мембранен протеин А на *E.coli* (sOmpA) и втора част на слетия протеин е об протеин от човек или от мишка (без техните собствени естествени сигнални последователности). ДНК последователността, кодираща този слят протеин, също се състои от две части: първа част, която кодира пептида sOmpA, и втората част, която кодира об протеина от човек или от мишка (без техните естествени сигнални последователности). Първата част на ДНК последователността, която кодира пептида sOmpA, е сигналната последователност, описана от De Sutter, U. et al., *Gene*, 141-163-170 (1994), и има нуклеотидната последователност SEQ ID NO:7. Втората част на състоящата се от две части на ДНК последователности кодира об протеините и хора и мишки и има нуклеотидна последователност SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:4, съответно, без тази част от нуклеотидната последователност, която кодира съответните естествени сигнални последователности.

Сигналният пептид, кодиран от sOmpA сигнална последователност със SEQ ID NO:7, има аминокиселинната последователност SEQ ID NO:8, както е описано от De Sutter, K. et al., пак там.

Новият експресионен вектор съгласно изобретението се получава чрез включване на промотора и ДНК последователността, кодираща слят протеин, към конвенционален експресионен вектор, подходящ за експресиране на рекомбинантни протеини в клетки на гостоприемник *E.coli*.

При изграждането на този нов експресионен вектор съгласно изобретението всеки промотор може да се използва толкова продължително, колкото е способен да контролира транскрипцията на слетия протеин, съдържащ sOmpA пептида и об протеина в клетката на гостоприемника *E. coli*. Когато sOmpA се използва като сигнален пептид, за предпочитане е да се използват lac-операторен промотор ($P_{O_{lac}}$) и липопротеиновият промотор (P_{pp}). Други удобни

промотори за такава експресия в *E.coli* включват T7 РНК полимеразен промотор, описан от Studier et al., J. Mol. Biol. 189, 113-130 (1986), лекс-промоторите, описани от Lauer, J.Mol. Genet. 1, 139-147 (1981) и налични от American Type Culture Collection (ATCC) като ATCC 37121, так-промоторът, описан от Maniatis, в "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbord 1982 и достъпен като ATCC 37138, промотор на алкална фосфотаза (*phoA*) и и промотор *trp*, описан от Goeddel et al., Nucleic Acids Research 8, 4057-4075 (1980). Други промотори са открити и използвани в *E.coli* и детайли, отнасящи се до техните нуклеотидни последователности, което дава възможност на специалиста в областта да направи тяхното функционално лигиране с експресионния вектор от изобретението, и те са публикувани от Siebenlist et al., Cell 20, 269-281 (1980).

Експресионният вектор съдържа по-точно:

а) промоторна последователност, и

б) ДНК последователност, която кодира слят протеин, който се състои от миши об протеин със SEQ ID NO:3 или човешки об протеин със SEQ ID NO:6, и сигналният пептид за външната мембрана на протеин А от *E.coli*.

Освен това за изграждането на този нов експресионен вектор е описан и друг метод, който по-детайлно е представен в примерите и изобразен на фиг.2 и 3. Най-напред кодиращата последователност на об протеина от хора или мишки (без тяхната естествена сигнална последователност) се инкорпорира в плазмид, съдържащ *sOmpA* сигналната последователност, такъв като плазмид *pT10sOmpArPDI*. Този плазмид и неговата конструкция и получаване са описани от De Sutter, K. et al., пак там. Веднъж инкорпориран в този плазмид, об генът от хора или мишки се слива с този *sOmpA* ген, за да създаде "хибридна генна последователност" в този плазмид. Генът *sOmpA* трябва да бъде в посока на 5' областта на об генната кодираща последователност. След това някои от описаните вече промотори, за предпочитане липопротеиновият промотор (PO_{ω}), се инкорпорират в този плазмид, съдържащ хибридната генна последователност, за да се създаде експресионният вектор на изобретението. Два варианта на тези експресионни вектори са идентифицирани като *pLPPsOmpA mob* и *pLPPsOmpA hob1* и са изобразени на фиг.2 и 3.

Може да се използва всеки известен от нивото метод за създаване на такъв плазмид. Освен това редът, в който се сливат *sOmpA* и об

генните последователности, се инкорпорират генните последователности в подходящ плазмид и се инкорпорира промоторът, за да се достигне до експресионния вектор от изобретението, не е критичен. Например *sOmpA* генната последователност може първоначално да се слее с последователността на човешкия или миши об ген, за да се създаде хибридна генна последователност. После тази хибридан последователност се включва в плазмид, имащ вече инкорпориран в него подходящ промотори. Все пак е необходимо *sOmpA* генната последователност да бъде в посока на 5' края на мишата или об генна последователност.

Открито е, че при използване на такъв нов експресионен вектор, в частност чрез използване на сигналната последователност, кодираща *sOmpA*, об протеините от хора или мишки могат да се транслокират до периплазматичното пространство, където сигналният пептид по подходящ начин се разкъсва, отделяйки незасегнети об протеините от хора или мишки в разтворима и биологически активна форма. Установени веднъж в това периплазматично пространство, об протеините ефикасно се секретират към свободно-клетъчното пространство, което не съдържа други животински протеини, при подлагане на клетките на гостоприемника на студен осмотичен шок, през което време об протеините могат да се пречистят до хомогенност в биологично-активна форма.

3. Експресиране на об протеини от хора или мишки в трансформирани *E.coli* клетки.

След това експресионните вектори, приготвени съгласно описаните процедури, се включват в клетката на гостоприемника *E.coli* за да се трансформира *E.coli* клетката. Може да се използва щам от *E.coli*, такъв като *E.coli* K-12 щам 294, както е описано в английска патентна заявка 2055382 А (ATCC № 31446). Други щамове, които могат да се използват съгласно изобретението, включват *E.coli* MC1061 [Casadaban и Cohen, J.Mol. Biol., 138, 179-207 (1980)], *E. coli* N 1776 [ATCC No. 31537] и *E.coli* W 3110 (ATCC No. 27325) или други щамове, много от които са депозирани и налични в признати депозитни институти за микроорганизми.

Трансформираните *E.coli* клетки се култивират до необходимата клетъчна плътност и се размножават чрез стандартни методи. При това развиване и култивиране на трансформираните *E. coli* гостоприемници експресионният

вектор от изобретението ефикасно и ефективно позволяват експресиране на об протеините от хора или мишки и транслокация на тези същите протеини в периплазмата на клетката на *E.coli* гостоприемника в разтворима и биологично активна форма.

Сигналният пептид sOmpA, например част 1 от слетия протеин, се отцепва по време на транслокацията на слетия протеин от периплазмата, като дава биологично активен об протеин, несъдържащ протеини от други животни или полипептиди. По-точно методът за продуциране на биологично активен рекомбинантен протеин на затлъстяването от хора или мишки, свободен от други животински протеини, съдържа стadiите:

а) конструиране на експресионен вектор с промоторна последователност и ДНК последователност, кодираща слет протеин, който представлява SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:6 и сигналният пептид за външната мембрана на протеин А от *E. coli*;

б) въвеждане на експресионния вектор в клетка на гостоприемник от *E.coli*, за да се трансформира клетката на гостоприемника *E.coli*;

в) експресиране на слетия протеин в клетката на гостоприемника от *E.coli*; и

г) третиране на клетката на гостоприемника от *E.coli* с охладен буфер за осмотичен шок до освобождаване на об протеини от мишки или хора, несъдържащи други животински протеини и сигнален пептид.

Рекомбинантно получените об протеини от хора или мишки в разтворимо биологично активно състояние от периплазмата на трансформирани *E.coli* клетки след това се пречистват до хомогенност.

Рекомбинантните об протеини от хора или мишки, транслокирани в клетъчната периплазма съгласно описаните процедури, могат ефективно да се секретират вън от клетката чрез подлагане на клетките на гостоприемника на студен осмотичен шок чрез известни от нивото методи и описани от Koshland, D. и Botstein, D., Cell 20, 749-760 (1980). Използването на студен осмотичен шок освобождава от бактериите *E.coli* об протеините в тяхното биологично активно състояние, лишени от други животински протеини или полипептиди.

Об протеините от хора или мишки, намиращи се в осмотичната течност след студения осмотичен шок на трансформирани *E.coli* клетки, съгласно описаните процедури, са биологично

активни и могат да бъдат пречистени до хомогенност, като се използва комбинация от анионно-обменна колонка хроматография, колонна хроматография с хидрофобно взаимодействие и гел филтрация. Анионно обменната и хидрофобно взаимодействащата хроматография могат да се проведат във всякакъв ред, само че използването на една от тях трябва да предшества гел филтрация.

Стадият на анионен обмен може да се проведе по известни начини. Предпочитана колона за анионно-обменна хроматография е Q-Sepharose Fast Flow колона. Подходящи среди за анионно-обменна хроматография включват различни неразтворими матрици, съдържащи диетил-аминоетил (DEAE) или диетил-(2-хидроксипропил)аминоетил (QAE) групи. Матриците могат да бъдат от акриламид, агароза, декстран, целулоза или други видове, които обикновено се използват за пречистването на протеини. Особено предпочитан материал за анионно-обменна хроматография е DEAE-Сефацел (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Когато се използват среди, съдържащи DEAE групи, се прилагат екстракти, съдържащи об протеини от хора или мишки при слабо основно рН 8.1. Свързаните об протеини от хора или мишки могат да се елуират в по-високо пречистена форма чрез прилагане на соли като градиент в подходящ буфер като трис-HCl. По принцип характеристиките на градиента могат да се определят чрез експерименти на предварително елуиране, включващи малко количество от рекомбинантен протеин.

Материалът, съдържащ об протеин от хора или мишки, получен чрез използване на анионно-обменна хроматография, когато тя е използвана като първи етап на пречистване, след това се подлага на хроматография чрез хидрофобно взаимодействие. Хроматографията с хидрофобно взаимодействие е техника на разделяне, при която веществата се разделят на базата на различни сили на хидрофобно взаимодействие с ненатоварен пласт от материал, съдържащ хидрофобни групи. Типично колоната с хидрофобно взаимодействие най-напред се уравновесява при условия, благоприятни за хидрофобното свързване, например висока йонна сила. За елуиране на пробата може да се използва сол като низходящ градиент.

Може да се използва всяка колона с хидрофобно взаимодействие. Предпочитана хидрофобна колона е фенил Сефароза, но бутил Сефароза

също може да се използва. Съгласно изобретението материалът, носещ /съдържащ/ рекомбинантния об протеин от хора или мишки, който се елуира от анионната колона, се зарежда в колона, съдържаща относително силен хидрофобен гел като фенил-сефароза. За да се подобри хидрофобното взаимодействие с хидрофобния гел, се използва разтворител, който съдържа например амониев сулфат, който е 0.4 М за предпочитане. Така колоната и пробата се нагласяват до 0.4 М амониев сулфат в 50 mM трис-буфер и пробата се зарежда в колоната. Колоната се промива с 0.4 М буфер от амониев сулфат. После об протеинът се елуира с разтворители, които намаляват хидрофобното взаимодействие, например низходящи градиенти от соли, етилен или пропиленгликол или карбамид. Предпочитан вариант включва промиване след това на колоната с трис-буфер и три-буферът, съдържащ 20% етиленгликол. След това об протеинът се елуира от колоната с градиент от амониев сулфат с намаляваща концентрация и с повишаваща концентрация на етиленгликол в трис-буфера. Общата и последователна употреба на анионнообменна хроматография и колонна хроматография с хидрофобно взаимодействие, във всякакъв ред, води до получаване на об протеин от хора или мишки по рутинен начин при установена чистота 90%.

Стадият на гел филтрационна хроматография следва стадията на анионно-обменната хроматография и колонната хроматография с хидрофобно взаимодействие, посочени по-горе, и може да се проведе чрез всяка конвенционална процедура на гел филтрация. Елуираният об протеин от колоната с хидрофобно взаимодействие или анионно-обменната колона, тази колона, която е използвана на края, може да се концентрира и диализира до по-малък обем, като се използва мембрана с изолирано молекулно тегло от 10 000/AMICION-YM10 мембрана/. Концентрираният материал може после да се зареди в колона, съдържаща среда за гел филтрация като G100-Sephadex, (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Полученият об протеин после може да се раздели от други примеси на базата на тяхното молекулно тегло чрез стандартни техники, като се използва SDS-PAGE.

Общото и последователно използване на анионно-обменна хроматография, колонна хроматография с хидрофобно взаимодействие и гел филтрацията обикновено дават добив от об протеин от хора или мишки с 95% чистота.

N-терминалното аминокиселинно секвениране на пречистения об протеин от хора или мишки може да се осъществи по известни от нивото на техниката методи, като електротрансфер съгласно методите на Laemmli, U.K., Nature 227, 680-685 (1970) или чрез процедурите, описани от Matsudaira, P., J.Biol. Chem. 262, 10035-10038 (1987). Вътрешно секвениране също може да се проведе чрез известни от нивото на техниката методи. Например пептидни фрагменти могат да се генерират чрез асимилиране на М ивица (върху нитроцелулоза) с ендопротеиназа лизин С и после разделяне на HPLC (BETX) система.

Биологичната активност на пречистените об протеини от хора или мишки от изобретението са такива, чието многократно прилагане на об протеините по инжекционен начин на хора или мишки има за резултат понижаване усвояването на храна и понижаване степента на повишаване на теглото в сравнение с неинжектирани контролни групи от обекти.

Биологичната активност на об протеини от хора или мишки или техни фрагменти, получени и пречистени съгласно изобретението, могат да се тестват чрез рутинни методи като повтарящи се или единични интрацеребровентрикуларни (ИЦВ) инжекции на об/об мишки според процедурите на Kd.ey T.J., et al. пак там, както е описано подробно в примери 13 и 16. На базата на този ИЦВ тест могат да се определят ED_{50} за редуциране поемането на храна и ED_{50} за редуциране увеличаването на телесното тегло. Освен това биологичната активност на об протеините от хора или мишки или техни фрагменти могат да се определят чрез многократни ИП инжекции на об/ об мишки, както е описано детайлно в пример 15. На базата на ИП тест могат да се определят ED_{20} за редуциране поемането на храна и ED_{20} за редуциране повишаването на телесното тегло.

Биологичната активност на об протеините от хора или мишки или техни фрагменти, получени и пречистени съгласно изобретението, могат също да се определят при хора чрез известни от нивото на техниката методи като измерване редуцията на теста за поемане на храна, последвано от ИВ администриране на об протеин на тест-субекти от затлъстели хора, в сравнение с ИВ прилагане на контрола с физиологичен разтвор съгласно методите на Muurahainen, N.E. et al., Am.J.Physiol. 260, 672-

680 (1991) и както е описано в детайли в примери 14 и 17. Алтернативно, способността на пречистените об протеини от мишки и хора съгласно изобретението да редуцират степента на напълняване /или да индуцират загубата на тегло могат да се определят чрез многократно ИВ прилагане на тествани субекти от затлъстели хора по методите, описани от Drent, M.L., et al., *Int. J. Obesity*, 19, 221-226 (1995), както е описано подробно в пример 18.

Човешки и миши об протеини, когато са пречистени, както е описано в изобретението, имат биологична активност, проявяваща се в това, че:

1) Когато те се прилагат чрез интрацеребровентрикуларна инжекция (ИЦВ) на обездвижена за 16-18 h затлъстяла об/об мишка с телесно тегло поне 30 g в доза от 20 g или по-малко, като се използват методите на Haley и McCormick, пак там, протеинът или полипептидът: а) редуцира поемането на храна по време на 5-часов хранителен тест с 50% в сравнение с контролна мишка, на която е инжектиран вехикул (ED_{50} за редуциране поемането на храна, и б) редуцира повишаването на телесното тегло през следващите 24 h след ИЦВ инжекция поне с 50% в сравнение с контролна мишка, на която е инжектиран вехикул (ED_{50} за редуциране повишаването на телесното тегло); и

2) Когато те се прилагат интраперитонеално /ИП/ на необездвижена зряла об/об мишка с телесно тегло поне 30 g двукратно на ден в началото на деня и после 3 h преди стъмване за една седмица, с тотална дневна доза от 20 g или по-малко, протеинът или полипептидът: а) редуцира 5 и 24-часовото поемане на храна поне с 20% в сравнение с контролна мишка, на която е инжектиран вехикул (ED_{20} за редуциране поемането на храна), и б) редуцира увеличаването на телесното тегло през 24 h, следващи първата ИП инжекция с поне 20% в сравнение с контролна мишка, на която е инжектиран вехикул (което представлява ED_{20} за редуциране на увеличаването на телесното тегло).

Освен това редуцирането на телесното тегло и поемането на храната често се проявява в дози под 20 g или по-ниски, дори в степен на дозиране, приложена ИЦВ от 1 g или по-малко, особено когато протеините са пречистени до хомогенност.

Биологичните изследвания, посочени по-горе и описани детайлно в примерите за определяне на биологичната активност на об протеини от хора и/или мишки, могат да се използват за определяне биологичната активност на фрагменти от тези протеини, когато тези фрагменти са продуцирани чрез протеологично разпадане на об протеините, чрез химически синтез чрез рекомбинантна протеинова експресия на частична ДНК последователност за об протеините или чрез всеки друг метод, известен на специалиста в областта.

Съгласно друг вариант на изобретението об протеините от хора или мишки, получени по изобретението, могат да бъдат свързани с полиетиленови или полипропиленгликолови хомополимери, които могат да бъдат незаместени или заместени чрез естерификация на една от хидроксигрупите при един от техните краища с нисша алкилна група. Тези конюгати дават протеина в стабилна форма и подобряват полуживота на тези протеини. Освен това, използването на тези конюгати, образувани от полиетиленгликол или полипропиленгликолови хомополимери, предоставя начин за повишаване активния полуживот на об протеините в тялото. Също така е намерено, че тези конюгати имат допълнителни предимства като повишаване стабилността и времето на циркулация на терапевтичните об протеини в организма, докато също се намалява имуногенността на об протеина. Тези пегилирани об протеини могат също лесно да се адсорбират в човешкия организъм и осигуряват повишено възприемане в кръвоносната система.

Предпочитаните полиетиленови или полипропиленгликолови хомополимери, които се свързват с об протеините, имат молекулно тегло приблизително 15 до 60 kDa за получаване на протеин, който може да бъде моно- или полипегилиран с полиетилен или полипропиленгликолови молекули. В предпочитания случай об протеинът е моно- или дипегилиран, за да образува конюгат с полиетилен или полипропиленгликолови единици, които в конюгата имат тотално молекулно тегло от 15 до 60 kDa, за предпочитане от 35 до 45 kDa. По принцип конюгатите се получават като смеси на полиетилен и полипропиленгликолови конюгати, тъй като полиетилен- и полипропиленгликоловите изходни материали се продават като смес от различни хомополимери с различни молекулни

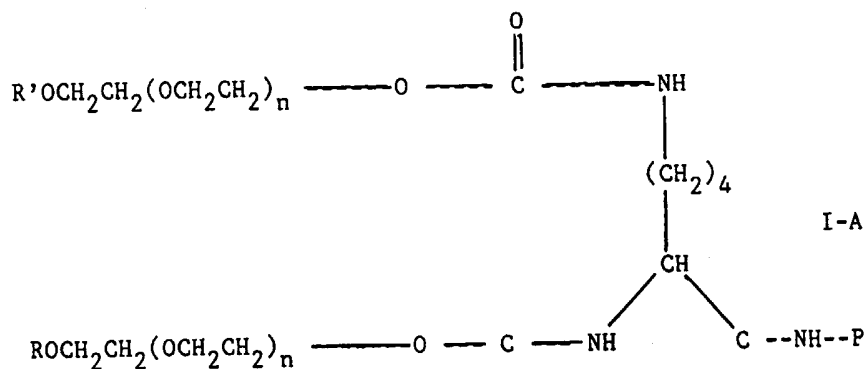
тегла. Посоченото преди това молекулно тегло е средно молекулно тегло на сместа от така получените об конюгати. Тези смеси могат да бъдат разделени по желание на индивидуални конюгати по известни начини като колонна хроматография, която включва HPLC. Обаче по принцип за лечение тези конюгати се използват като смеси.

Полиетиленгликоловите или полипропиленгликоловите полимери /ПЕГ/ могат да бъдат прикачени към об протеина чрез свободната N-терминалната аминокиселина на протеина до образуването на конюгат по който и да е известен метод. Методите за прикачване на полиетилен или полипропиленгликол за образуване на конюгати с об протеина могат да бъдат които и да са от известните достъпни. Полиетилен или полипропиленгликол може да бъде ковалентно свързан чрез N-терминалната аминокиселина на протеина, както и през различни лизинови остатъци на протеина.

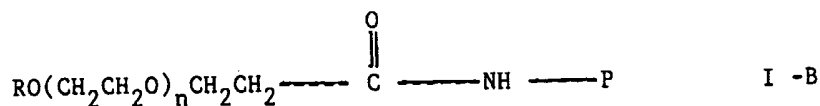
Също така полиетилен или полипропиленгликоловите хомополимери могат да се конюгира-
т към об протеина чрез би- или полифункционални свързващи групи. При получаването
на монополиетилен или полипропиленгликолови
хомополимерни конюгати се използват бифункционални линкери и хомополимерът е конюгиран
към една функционална група от този линкер,

докато N-терминалната аминокиселина, както и лизиновата група на об протеина може да се конюгира към друга функционална група на този линкер. Три- или поли- [полиетилен или полипропиленгликол] полимерни конюгати с об протеина се образуват чрез използване на три- или полифункционални линкери. Хомополимерът може да се конюгира към две или повече такива функционални групи, като една остатъчна функционална група от линкера се прикачва към об протеина. Между тези линкери са и тези полифункционални линкери, които имат amino- и карбоксифункционални групи. Аминогрупите могат да конюгират с функционализирана хид-роксигрупа на полиетилен или полипропиленгликола до образуване на аминокръзка. Карбоксигрупи могат да конюгират с аминокгрупите на об протеина до образуване на амидна връзка и с функционализираната хидроксигрупа на гликола до образуване на естер. Известни са различни видове свързващи групи, които могат да се използват за образуване на конюгати между об протеина и ПЕГ, и които са описани в US 4 902 502, US 5 034 514, US 4 609 546, US 5 122 614 и US 4 847 325.

Особено предпочитан вариант на изобретението представляват конюгатите, които имат следните формули:



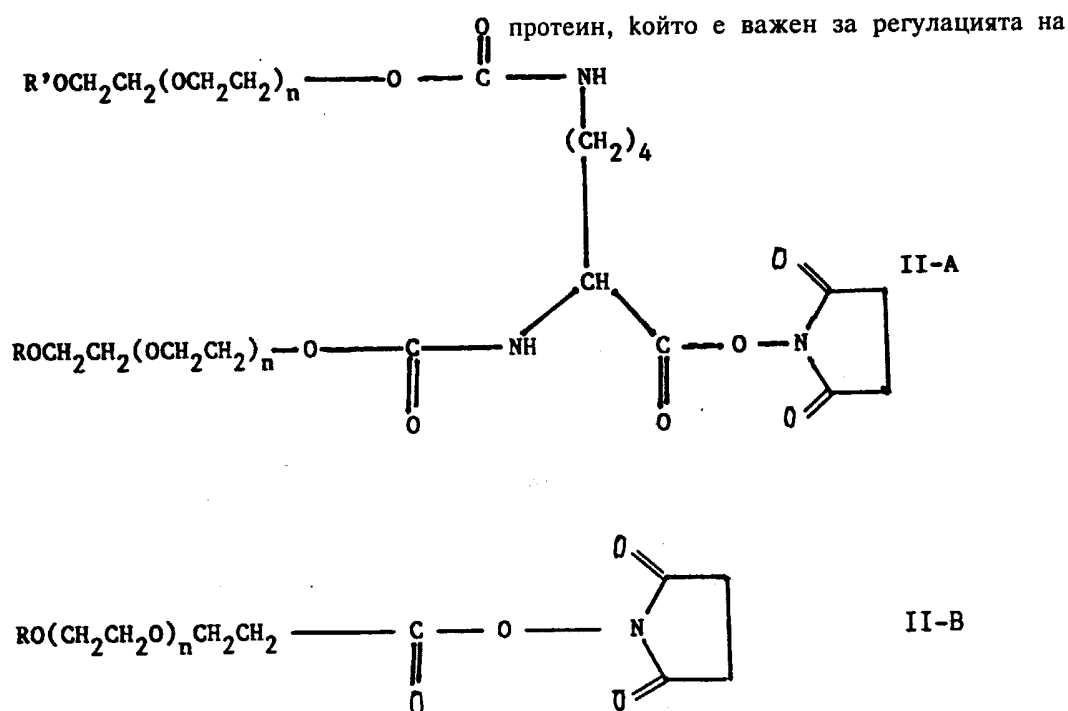
И



в които Р е описаният тук об протеин от хора или мишки; п и п' са числа, чиято сума е от 300 до 1200, така че средното молекулно тегло на всички ПЕГ единици да е от 15 до 60

kDa и общото молекулно тегло на конюгата е от 30 kDa до 80 kDa, а R и R' са нисш алкил.

Съединенията с формула I-A и I-B да се получат от известни полимерни материали



чрез кондензирането им с об протеин от хора или мишки, описан в изобретението. Всеки конвенционален метод на реакция на активиран естер с амин до образуване на амид може да се използва. В посочената по-горе реакция илюстрираният сукцинимидилов естер е отделящата се група, която обуславя образуването на амид. Когато се използва съединение с формула II-B за получаването на съединение с формула I-B, реакцията с мишия или човешки об протеин се осъществява по същия начин, описан във връзка с превръщането на съединението с формула II-A в съединението с формула I-A. Такива сукцинимидилови естери като съединенията с формула II-A, които продуцират конюгати с протеини, са описани от Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.*, 6, 62-69 (1995).

При съединението с формула I-A сумата от n и n' е от 300 до 1500, така че да се получи конюгат общо със средно молекулно тегло на ПЕГ единиците от 15 до 60 kDa, за предпочитане от 35 до 45 kDa. В предпочитания вариант на формула I-A сумата от n и n' е от около 800 до 1200 със средна сума на n и n' от 850 до 1000. Обикновено предпочитаното съотношение на n и n' в съединенията с формула I-A и II-A е от 0,5 до 1,5, като най-предпочитано е от 0,8 до 1,2. В случая на съединението с формула I-B е за предпочитане между 300 и 1500 за получаването на съединение, имащо от 300 до 1500 ПЕГ единици с общо молекулно тегло

от 15 до 60 kDa, за предпочитане от 35 до 45 kDa. В предпочитания вариант n е от около 850 до 1000.

Човешките или миши об протеини, получени съгласно изобретението, могат да се изготвят във фармацевтични състави, подходящи за инжекции, със съвместими фармацевтично приемливи носители или вехикули по известни от нивото на техниката методи. Носителите могат да бъдат органични или неорганични материали, подходящи за ентерално, перкутанно или парентерално приложение. Подходящите носители включват вода, желатин, гума арабика, лактоза, нишесте, магнезиев стеарат, талк, растителни масла, полиалкиленови гликоли, петролево желе и други. Освен това фармацевтичните състави могат да съдържат и други фармацевтично активни агенти. Могат да бъдат добавяни и добавки като оцветители, консерванти, стабилизатори, емулгиращи агенти, буфери и други в съответствие с приетата практика за създаване на фармацевтични форми. Между предпочитаните носители за формулиране на хомогенни об протеини от изобретението са човешки серумен албумин, човешки плазмени протеини и др.

Прилагането на рекомбинантен хомогенен об протеин, като може да бъде от хора или от мишки или негова комбинация, води до понижаване усвояването на храна и загубата на тегло при затлъстели хора и животни. При това прилагането на об протеина възстановява този

телесното тегло. Фармацевтични състави, съдържащи човешки или миши об протеини, могат да бъдат приготвени с трайна ефективност за прилагане по различни начини на хора или животни, на които се експериментират ненормални колебания в телесното тегло, или самостоятелно, или като част от неблагоприятно медицинско състояние или заболяване, каквото е тип II диабетен мелитус. Могат да се използват различни техники на инжекционно прилагане като подкожно, интравенозно и интраперитонеални инжекции. Средното количество от об протеин може да варира, в частност би трябвало да се базира на препоръките и предписанията на квалифициран лекар или ветеринар.

Представените примери илюстрират изобретението, без да се ограничават по никакъв начин.

Описание на фигурите

Фигура 1 е схема на два клона за човешки об протеин, например hob c11 и hob c12, които схематично очертават разположението и типовете на рестрикционните сайтове, локализиращи при 5' и 3' краищата на об сДНК последователност при хора;

фигура 2 – схематично изображение на структурата на rLPPsOmpA mob експресионния вектор;

фигура 3 – схематично изображение на структурата на rLPPsOmpA hob1 експресионния вектор.

Пример 1. Получаване на човешка об сДНК.

Човешка об сДНК се получава чрез скриниране на търговски налична ламбда фаг сДНК библиотека ("Clonthech"), получена от РНК, дериват от човешка адипоцитна тъкан. От тази библиотека два ламбда фага, всеки съдържащ приблизително 2,5 килобази фрагмент, съответстващ на човешката об сДНК последователност, са получени чрез хибридизация на ламбда фагни библиотеки. Чрез тези две техники са идентифицирани два клона: hob1 сДНК и hob2 сДНК. Човешкият об ген се субклонира до плазмиден вектор ДНК pBluescriptSk⁺, търговски наличен от Stratagene. Получените вектори, съдържащи тези човешки об генни последователности, се наричат pBluescriptSk⁺-hob1 и pBluescriptSk⁺-hob2.

Човешката об генна последователност в

тези pBluescriptSk⁺-hob1 и pBluescriptSk⁺-hob2 се проверява чрез нуклеотидно секвениране. Аминокиселинната последователност на протеина, извлечен от нуклеотидното секвениране, съответства на човешкия об протеин, кодиран с SEQ ID NO:4 и както е публикуван от Zhang, Y. et al., там. Векторът pBluescriptSk⁺-hob1 има Т-С мутация след стоп кодона на hob1 сДНК. Тази мутация води до загубата на StuI рестрикционния сайт, който би трябвало да се намира в нуклеотидната последователност на hob1, както следва:

hob1

...GGG.TGG.TGA GGCCT TGA...

Gly Cys stop

pBluescriptSk⁺-hob1

...GGG.TGC.TGA GGCCC TGA...

Gly Cys stop

pBluescriptSk⁺-hob2

...GGG.TGC.TGA GGCCT TGA

Gly Gys stop

Тъй като тази мутация в pBluescriptSk⁺-hob1 се локализира след стоп кодона на човешката об сДНК последователност, тя не води до промяна в аминокиселинната последователност на човешкия об протеин, както е описано от Zhang Y. et al.

Относно нуклеотидната последователност на сДНК, присъстваща в pBluescriptSk⁺-hob2, чрез рестрикционен ензимен анализ е показано, че този плазмид има StuI рестрикционна област, локализирана след стоп кодона на последователността на човешка об сДНК.

В допълнение към факта, че pBluescriptSk⁺-hob1 има мутация в StuI рестрикционната област, следваща стоп кодона, pBluescript pBluescriptSk⁺-hob1 има също и един EcoRI рестрикционен сайт след отворената рамка за разчитане (OPP) в hob1 сДНК, което отсъства в hob2 сДНК /фиг. 1/.

Пример 2. Конструирание на плазмид за миши об протеин (mob).

Об сДНК от мишка, имаща SEQ ID NO:1, се получава по метода, описан от Zhang Y. et al., и след това се включва в pCDNA3 вектора, достъпен търговски от San Diego, California, USA. Така полученият миши об ген се използва за конструирание на експресионния вектор rLPPsOmpA-mob за експресирането на об протеина от мишка (mob). Този експресионен вектор и неговата структура са дадени подробно на фиг. 2.

Първият етап от конструирането се състои в осъществяване на сливането на сигнално-кодиращата последователност на sOmpA гена със зрялата кодираща област на мишия об ген, например без неговата естествена сигнална последователност. Фрагментът на ДНК с 501 бд, кодиращ зрелия миши об протеин, включен в pCDNA3 вектора, се амплифицира от вектора чрез полимеразна верижна реакция (PCR), като се използва Vent ДНК полимераза от New England Biolabs, преден праймер (праймер 1), започващ с първия нуклеотид от кодона, кодиращ валин, който е първата аминокиселина в зрелия mob (Zhang, Y. et al) и реверсивен праймер (праймер 2), съответстващ на mob областта, съдържаща стоп кодона на mob. Праймерът 2 съдържа също и последователност, съответстваща на HindIII рестрикционен сайт.

Праймер 1: 5' GTG CCT ATC CAG AAA GTC 3'
Val Pro Ile Glu Lys Val

Праймер 2:

5' TCCCAAGCTT TCAGCATTCAGGGCTAAC 3'
HindIII stop

Амплифицираният ДНК фрагмент с 501 бд се пречиства чрез агарозна гел електрофореза и се фосфорилира с T4 полинуклеотидна киназа от Бюрингер и после се смилва с рестрикционния ензим HindIII, за да се създаде 5' леплив край на мястото на праймера 2. Полученият фрагмент има тъп край, съответстващ на първия нуклеотид от сДНК, кодираща зрял mob, и 5' леплив край, съответстващ на разкъсаната HindIII област.

След това sOmpA плазмидът pT10s-OmpArDI, получен по методите на De Sutter K. et al., се слива с mob гена до създаване на плазмид pT10sOmpA-mob. За осъществяването на това mob фрагментът се клонира чрез лигиране с T4 лигаза (New England Biolabs) към pT10sOmpArPDI векторната ДНК, която предварително е асимилирана с рестрикционните ензими NaeI и HindIII чрез известни от нивото на техниката методи (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Този pT10sOmpArPDI плазмид се получава от плазмид p714. (Parker и Wiley, Gene, 83, 117-134 (1989). Този плазмид съдържа сДНК, кодираща сДНК на зряла протеинова дисулфидна изомераза от плъх (зПДИП), която сДНК е слята с sOmpA последователността.

Това сливане на последния кодон на

sOmpA (аланин) с първия кодон на сДНК на зрялата ПДИП (глицин) създава NaeI рестрикционната област, която след разкъсване с NaeI освобождава като тъпи краища последния кодон на sOmpA последователността и първия кодон на сДНК, кодираща последователността на протеиновата дисулфидна изомераза от плъх (ПДИП).

NaeI

5'.....GCC / GGC.....3'

Ala Gly

sOmpA сДНК/сДНК на зряла протеинова дисулфидна изомераза от плъх (ПДИП)

Участъкът HindIII съществува в края на кодиращата сДНК на ПДИП. След това смилането на този плазмид с HindIII освобождава основната част на сДНК на ПДИП и създава 5' леплив край, съвместим с един от краищата на фрагмента на полимеразната верижна реакция. Полученият плазмид, в който сДНК, кодираща протеиновата дисулфидна изомераза от плъх (ПДИП), е заменена от кодиращата сДНК на възрастна об мишка, е наименован pT10sOmpA-mob и е изобразен на фиг. 2.

Лигираната ДНК се включва в щам MC1061 на E.coli, като се използва стандартна електропорация и получените колонии се скринират чрез рестрикционен ензимен анализ за наличието на зрял об ДНК фрагмент. Клонът pT10sOmpA-mob има последователността, кодираща зрелия об протеин от мишка, слята с последователността, кодираща sOmpA.

После експресирането на mob на E.coli в този pT10sOmpA-mob се поставя под контрола на липопротеинов промотор (P_{lip}) и на лак-промоторния оператор (PO_{lac}). За да се осъществи това хибридна гена sOmpA-mob последователност се трансферира от плазмид pT10sOmpA-mob към плазмидния вектор pLPPsOmpArPDI чрез стандартни процедури, описани от De Sutter et al. Както вече беше споменато, плазмидът pLPPsOmpArPDI е дериват от плазмид p714 (Parker и Wiley, Gene 83, 117-134 (1989). За осъществяване на този стадий, ДНК на плазмид pT10sOmpA-mob се разкъсва с рестрикционните ензими XbaI и HindIII. Фрагментът, съдържащ кодиращата ДНК на sOmpA-mob, после се лигира до плазмид pLPPsOmpArPDI, от който кодиращата ДНК на sOmpA-ПДИП предварително се отделя чрез разкъсване с рестрикционните ензими XbaI и HindIII. Полученият плазмид се наименова pLPPsOmpA-mob.

Пример 3. Експресиране на миши об протеин в *E.coli* (MC1061).

Експресиране на мишия об протеин в *E.coli* се постига по следния начин. Плазмидът pLPPs-ОmpA_{mob}, създаден съгласно пример 2, се въвежда чрез електропорация в щам MC1061 на *E.coli*. Клетките *E.coli* MC1061, които приемат плазмида pLPPsОmpA_{mob}, се култивират цяла нощ при 28°C в среда Luria-Bertania (Difco Laboratories), захранена с антибиотика карбеницилин (100 µg/ml, Becton Dickinson). Тази култура после се използва като инокулат (при разреждане 100 пъти) за култура 30 ml, цяла нощ при 28°C в същата среда. Тази култура после се разрежда 100 кратно в 3 l (например 6 x 0,5 l в 1 l ерленмайерови колби) в горната среда и се разбърква при 28°C във въздушен шейкър New Brunswick (300 об./мин) за около 4 h, докато се постигне плътност A_{600} от 0,3 до 0,5. В това време лак-промоторът се индуцира чрез прибавяне на 2 mM крайна концентрация от изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), Boehringer, както е описано от De Sutter et al., supra. Клетките след това се инкубират при 28°C за около 5 h, докато клетъчната плътност достигне A_{600} от 1,3 до 1,5. После клетките се събират чрез центрофугиране в ротор JA10 (Бекман центрофуги, модели J2-21 или J2-21M) за 6 min при 6750 об./min (8000 x g) при 4°C. Супернатантната течност се отделя и клетъчните пелети бързо се ресуспендират в 250 ml леденостуден осмотичен шок буфер (100 mM трис-HCl, pH 7,4, съдържащ 20% сукроза 10 mM EDTA) и се инкубират върху лед за 10 до 20 min, както е описано от Koshland и Botstein, supra.

След това суспензията се пренася в пластмасови центрофужни епруветки и клетките се събират чрез центрофугиране при 8200 об./min (8000 x g) за 5 min при 4°C в ротор JA20. Супернатантната се отделя и клетъчните пелети бързо се ресуспендират в 120 ml ледена вода при енергично разбъркване и се инкубират върху лед за още 10 min. Суспензията после се центрофугира в ротора JA20 за 6 min при 4°C при 11 500 об./min (16 000 x g) и супернатантната, съответстваща на периплазмичната фракция (осмотична шоква течност), се събира – около 120 ml. Прибавят се натриев азид и трис-HCl (pH 7,5) до крайна концентрация съответно 0,05% и 50 mM. Осмотичната шоква течност, съдържаща мишия об протеин, се съхранява при -20°C до следваща употреба.

Пример 4. Експресиране на миши об протеин в *E.coli* (MC1061).

Експресиране на миши об протеин се осъществява съгласно процедурата, описана в пример 3, с тази разлика, че се използва антибиотикът триацилин (100 g/ml) в добавка към средата Luria-Bertaria (по-често от карбеницилин).

Пример 5. Пречистване на миши об протеин от *E.coli* осмотичната течност.

Мишият об протеин, поставен в 120 ml замразена осмотична шоква течност съгласно пример 4, се пречиства по следния начин. Осмотичната шоква течност 120 ml, съдържаща мишия об протеин, се размразява и центрофугира при 4°C за 20 min при 16000 об./min в ротор JA20 за отделяне на неразтворимите онечиствания. Супернатантната после се разрежда директно в колона, съдържаща 30 ml обем слой от Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia), предварително буфериран с 50 ml трис-HCl (pH 7,5) буфер. След промиване с 50 ml трис-HCl (pH 7,5) буфер моб протеинът се елуира с 50 ml трис-HCl (pH 7,5) буфер, съдържащ 0,1 NaCl.

След това се прибавя твърд $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ към елуирания материал от колоната, съдържаща Q-Sepharose Fast Flow с крайна концентрация 1,0 M, и сместа се зарежда в колона, съдържаща 7,5 ml слой от бутил-сефароза Fast Flow (Pharmacia), предварително буферирана с 50 ml трис-HCl (pH 7,5) буфер, съдържащ 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. След промиване с трис-HCl (pH 7,5) буфер, съдържащ 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ протеинът моб се елуира чрез прилагане на градиент от 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 50 mM трис-HCl (pH 7,5) буфер към 20% етиленгликол във вода. Протеинът моб елуира от бутил-сефароза Fast Flow колона в самия край на градиента, докато повечето онечиствания елуират много по-рано. Чистотата на моб протеина на този етап е 90%, което се установява чрез съдържаща сребърно оцветяване полиакриламидна гел електрофореза (PAGE).

Протеинът моб в материала, елуиран от бутил-сефароза Fast Flow, съдържаща колона, после се пречиства чрез гел филтрационна хроматография. За провеждането на това мишият об протеин се концентрира при 4°C до обем 1 ml на мембрана UM10 (Amicon), като се използват 8MC концентриращи единици (Amicon) и се прилага на колона (1,0 cm x 50 cm), съдържаща 39 ml G100-Цефадекс (Pharmacia), предварително балансирана във фосфатен бу-

ферен разтвор. Фракциите, съдържащи mob протеина, се изливат и протеинът се концентрира на мембрана UM10. На този етап mob протеинът има повече от 95% чистота, установено чрез PAGE и оцветяване със сребро. SDS-PAGE проявява единична протеинова ивица при Mr 15000.

Пример 6. Анализ за последователност на миши об протеин.

N-терминална аминокиселинна последователност на мишия об протеин, получен и пречистен по процедурите от примери 2, 3, 4 и 5, се провежда по метода на Laemli, U.K. След електротрансфер на протеините, подложени на електрофореза в поли(4-винил-N-метил-пиридиниев йодид) обвити слоеве от стъклени фибри, описано от Bauw, G. et al., J.Biol.Chem. 7, 194-196 (1988), ивицата на протеина с Mr 15 000 се изрязва от мембраната и N-терминалната аминокиселинна последователност се определя чрез Едманово разпадане на 470A газов секвентор, снабден с 120A онлайн фенилтиохидаントин аминокиселинен анализатор (Applied Biosystems). N-терминалната аминокиселинна последователност на мишия об протеин, получена чрез описаните процедури, е Val-Pro-Ile-Gln, съответстваща на зрелия миши об протеин от SEQ ID NO:3.

Пример 7. Създаване на експресионен вектор за човешки об протеин/hob/.

Човешкият об протеин, получен по процедурите от пример 1, се използва за създаване на експресионен вектор rLPPsOmpAhob1 за експресиране на човешки об протеин. Това конструиране е подобно на конструирането на rLPPsOmpAhob, описано в пример 2, и дадено в детайли на фиг. 3. Изисква се трифрагментно лигиране, за да се запълни ДНК фрагментът, съдържащ пълната зряла човешка об кодираща последователност.

В първия стадий на конструирането hob нуклеотидната последователност, започваща с първия нуклеотид на кодона, кодиращ първата аминокиселина от зрелия човешки об протеин (валин) се слива със сигналната кодираща последователност от OmpA (sOmpA), така че sOmpA последователността е по посока на 5' края на hob нуклеотидната кодираща последователност. Този ДНК фрагмент се получава чрез амплификация на смес на полимеразна верижна реакция, съдържаща плазмид рBluescriptSK-hob1, Vent ДНК полимеразата и два праймера. Предният праймер (праймер 1) започва с първия нуклеотид на кодона, кодиращ първата аминокиселина на зре-

лия човешки об протеин, и противоположният праймер (праймер 2) съдържа последователността на човешката сДНК, съдържаща стоп кодона. Реакцията на амплификация води до получаване на ДНК фрагмент от 501 бд, съдържащ последователността, кодираща зрелия човешки об протеин. Краят 5' на този ДНК фрагмент после се фосфорилира с Т4 полинуклеотидна киназа и асимилира с рестрикционния ензим HINDIII, като се получава 353 бд ДНК фрагмент, имащ тъп край, съответстващ на първия нуклеотид от сДНК, кодираща зрелия hob, с позиция, съответстваща на праймера 1 и 5' леплив край, съответстващ на разцепената HindIII област. Този 353 бд ДНК фрагмент се пречиства чрез агарозна гел електрофореза и се клонира в плазмид рT10sOmpArPDI, който предварително е бил асимилиран с рестрикционните ензими NaeI и HindIII. Полученият плазмид рT10sOmpAhob1 (частично) има ДНК фрагмента, кодиращ част от зрелия човешки об протеин (амино-терминална част), слят с последователността, кодираща sOmpA.

Праймер 1:

5' GTGCCCCATCCAAAAAGTC 3'

Праймер 2:

5' TCCCAAGCTTTTCAGCACCCAGGGCTGAG 3' стоп

Във втория стадий ДНК последователността, кодираща карбокситерминалната част на човешкия об протеин, например фрагмент 2, е лигатиран към ДНК фрагмента, кодиращ аминокиселинната част на зрелия hob, и полученият фрагмент, кодиращ цялата зряла hob последователност, слята с sOmpA, се трансформира до плазмид рLPPsOmpArPDI за провеждане на експресията на зрял човешки об протеин в E.coli под контрола на липопротеинов промотор и лак-промоторен оператор. За осъществяване на това плазмид рT10sOmpAhob1 (частично) се асимилира с XbaI и HindIII и ДНК фрагментът 1 с 400 бд от hob се изолира чрез агарозна гел електрофореза (фрагмент 1). След това плазмидът рBluescriptSK-hob1 се разцепва с HindIII и EcoRI и се изолират 450 бд чрез агарозна гел електрофореза (фрагмент 2). Накрая плазмидът рLPPsOmpArPDI се разцепва с XbaI и EcoRI и векторният фрагмент, изолиран с агарозна гел електрофореза (фрагмент 3). ДНК фрагментите 1, 2 и 3 след това се лигатира един до друг и лигатурната смес се въвежда в E.coli щам MC1061. Колонията, съдържаща крайния конструиран плазмид рLPPsOmpAhob1, се използва за експресиране и

секретирание на зрял човешки об протеин.

Пример 8. Експресиране на човешки об протеин в *E.coli* (MC1061).

Създаденият плазмид pLPPsOmpA_{hob1} съгласно пример 7 се използва да трансформира *E.coli* щам MC1061 за експресиране на човешки об протеин в разтворима биологично активна форма в периплазмата на клетките на гостоприемника *E.coli*. Инсерирането на плазмид в тези клетки на гостоприемника *E.coli* се осъществява чрез електропорация. Клетките на *E.coli* (MC1061), които интегрират плазмида pLPPsOmpA_{hob1}, се развиват при 28°C в среда Luria-Bertania (Difco Laboratories), допълнена с антибиотика карбеницилин (100 µg/ml, Beecham) до съответната плътност, след което лак-промоторът се индуцира чрез прибавяне на 2 mM крайна концентрация от изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ, Boehringer), както е описано от De Sutter et al. След това клетките се култивират до достигане на клетъчна плътност 1.3 A₆₀₀. После клетките се събират чрез центрофугиране (8000 x g при 4°C) и клетъчните пелети бързо се ресуспендират в леденостуден осмотичен шок буфер (100 mM трис-HCl, pH 7,4, съдържащ 20% сукроза и 10 mM EDTA), и се инкубират върху лед за 10 min, както е описано от Koshland и Botstein, supra.

След това клетките отново се събират чрез центрофугиране както по-горе и клетъчните пелети се ресуспендират в ледена вода и се инкубират на лед за 10 min. Суспензията после се центрофугира за 5 min при 16 000 x g и супернатантата (осмотична шокова течност) се събира. Прибавят се натриев азид и трис-HCl (pH 7,5 до крайна концентрация 0,05% и 50 mM, съответно). Осмотичната шокова течност, съдържаща човешки об протеин, се съхранява при -20°C до следващата употреба.

Пример 9. Експресиране на човешки об протеин в *E.coli* (MC1061).

Експресиране на човешки об протеин се провежда, като се използва процедурата от пример 8 с тази разлика, че като антибиотик се използва триацилин (100 g/ml) вместо карбеницилин за допълване на средата Luria-Bertaria.

Пример 10. Пречистване на човешки об протеин от осмотична течност на *E.coli*.

За пречистване на човешки об протеин в осмотичната шокова течност от пример 9 се прибавя NaCl към течността до крайна концентрация 0,1 M и след това течността се зарежда директно в колона, съдържаща 30 ml обем подложка от

Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia), предварително балансирана с 50 mM трис-HCl буфер с pH 7,5.

След това се прибавя твърд (NH₄)₂SO₄ към изтичащия материал, елуиран от колоната, съдържаща Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) до крайна концентрация 1,0 M и сместа се зарежда в колона, съдържаща 7,5 ml слой от бутил-Sepharose Fast Flow (Pharmacia), предварително буфериран с 50 mM трис-HCl буфер с pH 7,5, съдържащ 1,0 M (NH₄)₂SO₄. След промиване с трис-HCl с pH 7,5 буфер, съдържащ 1,0 M (NH₄)₂SO₄, об протеинът се елуира чрез използване на градиент от 1,0 M (NH₄)₂SO₄ в 50 mM трис-HCl буфер с pH 7,5 към 20% етиленгликол във вода. Човешкият об протеин, елуиран от колоната, съдържаща бутил-Sepharose Fast Flow в самия край на градиента, докато повечето онечиствания се елуират много по-рано. Чистотата на об протеина на този етап е 90%, установено чрез сребърно-оцветена полиакриламидна гел електрофореза (PAGE).

Човешкият об протеин в материала, елуиран от колоната, съдържаща бутил-Sepharose Fast Flow, след това се пречиства чрез гел филтрационна хроматография. За целта човешкият об протеин се концентрира при 4°C до обем 1 ml върху мембрана UM10 (Amicon), като се използват 8MC концентрационна единица (Amicon) и се зарежда на колона (1,0 cm x 50 cm), съдържаща 39 ml G-100 Sephadex (Pharmacia), предварително балансиран във фосфатен буферен разтвор. Фракцията, съдържаща об протеина, има чистота, повече от 95%, установено чрез PAGE и сребърно оцветяване. SDS PAGE анализът на елуата разкрива единична протеинова ивица при Mr 15 000.

Пример 11. Пречистване на човешки об протеин от осмотична течност на *E.coli*.

За пречистване на човешки протеин в осмотичната шокова течност от пример 9 се използва процедурата от пример 10 със следните изменения: преди да се прибави твърд (NH₄)₂SO₄ към изтичащия продукт, се осъществяват следните стадии, които са свързани с осмотичната течност от пример 9.

Човешкият об протеин в осмотичната шокова течност от пример 9 се зарежда директно в колона, съдържаща 30 ml подложка от Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia), предварително балансирана с 50 ml трис-HCl (pH 7,5) буфер. След промиване с 50 ml буфер от трис-HCl (pH 7,5)

hob протеинът се елуира с 50 ml буфер трис-HCl (pH 7,5), съдържащ 0,1 M NaCl.

Пример 12. Анализиране последователността на човешки об протеин.

N-терминалната аминокиселинна последователност на човешки об протеин, пречистен и получен по процедурите, описани в примери 7-11, се осъществява съгласно метода на Laemli, U.K. *supra*. След електротрансфер на протеините, подложени на електрофореза върху слой от стъклени влакна, обвит с поли(4-винил-N-метилпиридиниев йодид), както е описано от Bauw et al., ивицата на протеин с Mr 15 000 се изрязва от мембраната и после N-терминалната аминокиселинна последователност после се определя чрез Едманово разпадане върху 470A газово-фазов секвенатор, снабден със 120 A онлайн фенилтиохидантоин аминокиселинен анализатор.

N-терминалната аминокиселинна последователност на hob протеина, получен по описаните процедури, е Val-Pro-Ile-Gln, съответства на зрелия човешки об протеин SEQ ID NO:6.

Пример 13. Биологична активност на об протеин от мишка: интрацеребровентрикуларно /ИЦВ/ инжектиране на об/об мишка.

Биологичната активност на зрял миши об протеин, пречистен според пример 5, се определя, като се използва ИЦВ метод по следния начин. Инфузна канула се имплантира в латералната кухина на мозъка на анестезирана женска затлъстяла об/об мишка (на възраст от 6-13 седмици), като се използват следните размери: 2 mm латерално от средната линия, 0,6 mm от шевовете, 2 mm отдолу) съгласно методите на Haley и McCormick. Краят на канулата се наглася на черепа, използвайки бижутерски винт и зъболекарски цимент. Мишките са поставени поотделно в пластмасови клетки със свободен достъп до храна (с изкл. на нощта преди ИЦВ инжекция) и вода. Следващо възстановяване от хирургическата намеса чрез преценка на ежедневното усвояване на храна и повишаване на телесното тегло мишките се изследват в няколко момента след ИЦВ инжекция от 1 µl с един от следващите тестови разтвори:

- 1) изкуствена церебро-спинална течност (ЦСТ);
- 2) бактериален контролен разтвор;
- 3) об протеин (0,6 до 1 µg/мишка), или
- 4) без инфузия.

Инжектирането на един от горните тестови разтвори интрацеребровентрикуларно на всяка мишка е последвано от 1 µl изкуствена церебро-

спинална течност /ЦСТ/, за да се избистри канулата. За целите на този експеримент бактериалният контролен разтвор е образец, идентично продуциран и получен съгласно методите, изложени в примери 2-4, с разликата, че плазмидът, инсериран в E.coli бактерия не съдържа миши об ген.

Мишките се обездвижват за 18 h (цяла нощ) преди ИЦВ инжекция. Мишките са слабо задържани и 10 µl Хамилтонова спринцовка, пригодена с парче от прекалибрирана полиетиленова (PE) тръба (PE20), се използва за инжектиране на 1 µl от изпитвания разтвор в канюлата, поставена в латералната кухина. След това мишките веднага се поставят в опитна клетка с блюдо с храна, съдържащо предварително претеглено количество храна за мишки под формата на пелети и бутилка с вода. Мишките се наблюдават визуално и се измерва поемането на храна през следващите 7 h. Измерванията на поемането на храна се отчитат на 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 и 7 h след интрацеребровентрикуларната /ИЦВ/ инжекция. За всяко животно се измерва телесното тегло преди ИЦВ инжекция и 24 h след това. Успешното поставяне на канюлата се доказва чрез повишаване на двучасовото усвояване на храната след ИЦВ инжекция на 10 mg невропептид У при мишка, обездвижена за 2 h, по метода на Morley, J.B. et al., *American J. Physiol.*, 253, 516-522 (1987).

Резултатите от ИЦВ изпитване, описано по-горе, са следните.

А. Редуциране поемането на храна.

По време на първите 30 min след ИЦВ инжекция почти всички мишки ядат с кратка латентност и консумират приблизително 0,5 g. Мишките, които не са третирани с инжекция или с церебро-спинална течност /ЦСТ/, продължават да ядат през следващите 6,5 h и достигат кумулативно 7-часово усвояване от 3,2 g /таблица 1/. Обратно, мишките, третирани ИЦВ с об протеин, спират да ядат след първите 30 min и после не се хранят. Така тяхното кумулативно усвояване на храна остава редуцирано през следващите 6,5 h на около 0,5 g /таблица 1/. Мишките, третирани ИЦВ с контролен разтвор на вехикул, също спират да ядат след 30 min и започват да ядат отново едва след 6 и 7 h.

Б. Редуциране повишаването на телесното тегло.

Изменението за 24 h в телесното тегло на мишките, инжектирани с контролен вехикул, е слабо редуцирано в сравнение с това на миш-

ки, третирани с изкуствена ЦСТ, или на неин-
жектирани мишки /таблица 1/. Обаче процент-
ното изменение в телесното тегло на мишките,
инжектирани с об протеин, е приблизително ну-
ла и е значително редуцирано в сравнение с
мишки, инжектирани с контролен вехикул /таб-
лица 1/.

В. Заключение

Наблюдаваният ефект на директно прила-
гане на рекомбинантен миши об протеин (1,1 µg/
мишка в 1 µl в мозъка) се изразява в продължи-

телно и значително редуциране на усвояването
на храна и увеличаването на телесното тегло на
женска об/об мишка. Това показва, че об про-
теинът може да действа директно върху мозъка
и е съвместим с ефекта на об протеина, когато
се инжектира интраперитонеално. Този пример
също потвърждава биологичната активност на
бактериално експресиран рекомбинантен миши
об протеин при женска затлъстяла об/об мишка
съгласно изобретението.

Таблица 1

Третирания	Поемане на храна (0,7 h)		Увеличаване телесното тегло (0-24 h)	
	g	%**	g	%
Изкуствена церебро- спинална течност	3,2 ± 0,2	100	3,8 ± 0,3	100
Контролен вехикул	0,9 ± 0,3	28,1	2,9 ± 0,2	76
об протеин (1 µg/мишка)	0,5 ± 0,1*	15,6	0,3 ± 0,5*	8

* показва значителни различия между об
протеин и изкуствена церебро-спинална течност
/ЦСТ/ групи с $p < 0,05$

** показва процент от контрола

Пример 14. Биологична активност на миши
об протеин, приложен интравенозно /ИВ/ при
об/об мишки.

Биологичната активност на миши об про-
теин, получен и пречистен според примери 2, 3, 4
и 5, се изпитва чрез интравенозно инжектиране
при затлъстели об/об мишки по следния начин.

Мъжки и женски затлъстели об/об мишки
(на възраст 6 – 13 седмици) се имплантират с
хронични югуларни канули под анестезия с пен-
тобарбитал (80 mg/kg телесно тегло) по метода
на Mokhtarian, A., et al., Physiol. Behav. 54, 895 –
898 (1993). Мишките се пазят поотделно в пласт-
масови клетки при постоянни условия с цикъл от
12 h тъмнина и 12 h осветление. Телесното тегло
се измерва при смесване през деня и очевидността
на канулитите се проверява и поддържа всеки след-
ващ ден чрез инфузия на ≤0,1 ml стерилен хе-
парин/физиологичен разтвор (50 U/ml в 0,9 %
физиологичен разтвор). След пълно възста-
новяване от хирургичната намеса, което се преце-
нява от повишаването телесното тегло, мишките
се обездвижват 16 – 18 h /цяла нощ/. Следващата
сутрин мишките се претеглят и се поставят в
експерименталната клетка за 45 min за аклима-

тизиране преди опита. Непрекъснато са заредени
с вода. Интравенозно се инжектира 3 µg в 0,1 ml
миши об протеин или еквивалентен обем от конт-
ролен вехикул или 0,9 % физиологичен разтвор.
Раздвижените мишки леко се ограничават и се
използва 0,5 ml инсулинови спринцовки за ин-
жектиране 0,1 ml от опитния разтвор, послед-
вано от 0,05 ml хепарин/физиологичен разтвор.
Опитите са разделени през 3 дни. След това
мишките бързо се поставят отново в опитната
клетка с предварително претеглено петри с храна,
съдържащо пелети от миша храна. Мишките се
наблюдават и се измерва приемането на храна
за следващите 7 дни на 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 и 7 h
след ИВ инжекция. Телесното тегло се измерва
преди ИВ инжекция и отново 24 h след това.
Две отделни групи канулирани мишки (11 об/
об и 12 мършави) се използват в пет индивиду-
ални опита. Повечето мишки получават об про-
теин и една или две контролни инжекции в проти-
вовесен ред. В този опит се използват два от-
делни препарата на миши об протеин. Предста-
вените тук данни са комбинация от резултатите
от тези индивидуални репликации.

А. Резултати

Резултатите от горния експеримент са
следните.

По време на първите 30 min след ИВ ин-
жекция повечето затлъстели и мършави мишки

ядат с кратка латентност и консумират приблизително 0,3 – 0,5 g. Усвояването на храна при затлъстели мишки, инжектирани с физиологичен разтвор и контролен вехикул, се увеличава по време на експеримента. Кумулативното усвояване на храна от затлъстели ob/ob мишки, инжектирани с контролен вехикул, не е различно от усвояването на храна по подобно обездвижени мишки, които са инжектирани с физиологичен разтвор. Напротив, усвояването на храна от затлъстели ob/ob мишки, инжектирани с рекомбинантен об протеин, е значително редуцирано и остава понижено на 57 % от контролата (таблица 2). Не се наблюдават други ефекти на поведение при групите с контролен вехикул и об протеин през 7-часовия период на наблюдение. Както се очаква, 24-часовото повишаване на теглото след инжекцията не е различно в третираните групи

(таблица 2), което се дължи на ограничената продължителност на действие на единичен ИВ болус от миши об протеин.

Б. Заключение.

Тези резултати показват, че рекомбинантен миши об протеин значително редуцира кумулативното 7-часово усвояване на храна след ИВ прилагане (3 µg/мишка) при затлъстели ob/ob мишки. Способността на рекомбинантния миши об протеин да редуцира усвояването на храна при затлъстели ob/ob мишки съпада с резултатите за усвояване на храна, получени след неколкостепенни ИП инжекции на об протеин на затлъстели ob/ob мишки. Този пример също потвърждава биологичната активност на бактериално експресиран рекомбинантен миши об протеин при женски затлъстели ob/ob мишки.

Таблица 2.

Интравенозно приложение на миши об протеин при ob/ob мишки.

Третираня	Усвояване на храна, 0 – 7 h		Увеличаване телесното тегло, 0 – 24 h	
	g	%**	g	%
Физиологичен разтвор (n = 4)	1,8 ± 0,2		2,9 ± 0,3	
Контролен вехикул (n = 7)	1,4 ± 0,3	100	2,2 ± 0,6	100
ob протеин (1 µg/мишка) (n = 8)	0,8 ± 0,2*	57	1,4 ± 0,6	64

Данните са осреднени ± sem

n = показва броя на индивидуалните мишки; sem означава "стандартна грешка на стойността"; * показва значителни различия между групите об протеин и изкуствена церебро-спинална течност с $p < 0,05$.

** показва процентите на контролата.

Пример 15. Биологична активност на мишия об протеин: неколкостепенни инжекции при ob/ob мишки.

Биологичната активност на мишия об протеин, получен и пречистен съгласно примери 2 – 5, е изпитан чрез неколкостепенно интраперитонеално инжектиране при затлъстели ob/ob мишки, както следва. Изучават се три групи от шест женски затлъстели ob/ob мишки. Мишките се държат в пластмасови клетки (по три в клетка) при постоянни условия на околната среда при 12 h тъмнина и 12 h светлина. 24 – часовото усвояване на храна и повишаването на телесното

тегло се измерват всеки ден. След един период на адаптация към околната среда и всекидневно третиране и инжектиране мишките се изваждат в три групи на третиране. Всяка мишка получава две интраперитонеални инжекции при всяко дневно третиране (малко преди началото на тъмната фаза от цикъла тъмнина/светлина и 3 h по време на тъмната фаза) с 0,1 ml от следващите тестови разтвори:

1. физиологичен разтвор 0,9 %;
2. бактериален контролен разтвор, или
3. миши об протеин (3 µg/0,1 ml)

Бактериалният контролен разтвор е образец, идентично процедиран и получен в съответствие с процедурите от примери 2 – 4 за получаване и пречистване на миши об протеин, с изключение на това, че плазмидът, въведен в E.coli бактериите, не съдържа миши об ген. Мишките се третират два пъти дневно за пет дни и после не се третират в продължение на два дни. Във всяка клетка се

измерва поемането на храна на 2, 3, 5 и 24 h след първата ИП инжекция за всеки ден на третиране.

А. Резултати.

Редуциране приеждането на храна.

Приемът на храна не е различен при мишки, инжектирани с физиологичен разтвор или бактериален контрол в дните на третиране и нетретиране в продължение на една седмица експеримент /таблица 3/. Все пак приеждането на храна се редуцира при шестте мишки, инжектирани с 6 µg об протеин в дните на третиране по време на експеримента. Редуцирането на приема на храна се наблюдава на 2, 3, 5 и 24 h след първата инжекция в дните на третиране при мишки, получаващи об протеин, в сравнение с групите с бактериално контролно и контролно третиране с физиологичен разтвор.

Редуциране увеличението на телесното тегло

Кумулативното увеличаване на телесното тегло за петте дни на третиране на групата с об протеин е $-3,3 \pm -0,7$ g в сравнение с $-0,9 \pm -0,2$ g

в групите с физиологичен разтвор и $-0,7 \pm -0,4$ g в бактериалната контролна група /таблица 3/.

Заклучение.

Този пример показва, че двудневно ИП инжектиране на бактериално експресиран рекомбинантен об протеин (6 µg/мишка/ден) има като резултат значително забавено редуциране на усвояването на храна и значително понижаване степента на увеличаване на теглото при третиране женски об/об мишки в сравнение с третиране с физиологичен разтвор и бактериален контролен разтвор об/об мишки. Тези резултати показват, че бактериалният експресиран миши об протеин е биологично активен и има очакваното действие срещу затлъстяване при генетично затлъстели об/об мишки съгласно изобретението. В таблица 3 резултатите от 2 и 5 h представляват средното дневно усвояване на храна, докато резултатите за 24 h представляват 5-дневното кумулативно усвояване на храна.

Таблица 3.

Неколкократно прилагане интраперитонеално на миши об протеин при об/об мишки.

Третиране	Усвояване на храната, g/3 мишки						Повишаване на телесното тегло
Без инжекция Контрол об протеин	2 h		5 h		24 h		g
	g	% контр.	g	% контр.	g	% контр.	
	5,5 ± 0,5		14,5 ± 0,5		44,3 ± 3,5		-0,9 ± 0,2
	7,0 ± 0,5	100	16,5 ± 0,5	100	49,5 ± 6,1	100	-0,7 ± 0,4
	3,5 ± 0,5	50	5,5 ± 1,0*	33	25,5 ± 4,6*	52	-3,3 ± 0,7*

% контрола

Данните са осреднени $\pm$ sem за шест об/об мишки във всяка група. Усвояването на храна е средното кумулативно усвояване за клетките с три мишки по време на петте дни с третиране на 2, 5 и 24 h след първата ИП инжекция. Повишаването на телесното тегло е кумулативното изменение в телесното тегло по време на петте дни на третиране. * показва значителните разлики между об протеин и вехикулните групи с $p < 0,05$.

Пример 16. Биологична активност на човешки об протеин: интрацеребровентрикуларно инжектиране /ИЦВ/ при об/об мишки.

Използваните методи за определяне биологичната активност на човешки об протеин чрез интрацеребровентрикуларна /ИЦВ/ инжекция при об/об мишки са същите както в пример 13, с тази разлика, че тестовите разтвори са:

- рекомбинантен човешки об протеин,

получен в пример 11 (0,05 µg) във фосфатен буферен физиологичен разтвор /ФБФР/, съдържащ 0,1 % миши серумен албумин, и

- фосфатен буферен физиологичен разтвор /ФБФР/, съдържащ 0,1 % (т/об) миши серумен албумин (албуминов контрол) като вехикулния контролен разтвор.

А. Редуциране на приема на храна.

През първите 30 min след ИЦВ инжекция почти всички мишки ядат с кратка латентност и консумират приблизително 0,5 g. Мишките, които не са инжектирани, продължават да ядат през следващите 6,5 h и достигат 7 h приемане на 1,8 g /таблица 4/. Мишките, които получават ИЦВ албуминов контролен разтвор, също спират да ядат след 30 min и отново започват да ядат едва между 3 и 7 h. Напротив, мишките, третирани с човешки об протеин ИЦВ, ядат значително по-малко в първите 30 min /0,2 g/ и ядат много

малки количества през следващите 6,5 h. Така тяхното кумулативно приемане на храна остава понижено през следващите 6,5 h при приблизително 0,4 g /таблица 4/.

Б. Редуциране увеличаването на телесното тегло.

24-часовото изменение на телесното тегло на мишки, инжектирани с контролен вехикул, е малко по-ниско от това на инжектирани с изкуствена церебро-спинална течност /ЦСТ/ или неинжектирани мишки /таблица 4/. Все пак процентното изменение в телесното тегло на мишките, инжектирани с човешки об протеин, е около нула /таблица 4/.

В. Заключение.

Наблюдаваният ефект на директно прилагане на рекомбинантен човешки об протеин (0,05 µg/мишка в 1 µl) в мозъка за получаване на забавено и значително редуциране в усвояването на храна и увеличаването на телесното тегло на женски об/об мишки показва, че об протеинът може да действа директно на мозъка и е съвместим с ефекта на об протеина, когато се инжектира ИП. Този пример потвърждава също биологичната активност на бактериално експресиран рекомбинантен човешки об протеин при женски затлъстели об/об мишки.

Таблица 4.

ИЦВ прилагане на човешки об протеин при об/об мишки.

Третирания	Приемане на храна, Увеличаване телесното тегло,			
	0,7 h		0 – 24 h	
	g	%**	g	%**
Без инжектиране (n = 3)	1,8 ± 0,2		3,1 ± 0,4	
Албумин контрол (n = 3)	1,0 ± 0,4	100	1,7 ± 0,6	100
Човешки об протеин (1 µg/мишка) (n = 5)	0,4 ± 0,2*	40	0 ± 0,8	0

Данните са осреднени ± sem. II = показва броя на отделните мишки. * - значителни разлики между човешкия об протеин и изкуствената церебро-спинална течност групи с $p < 0,05$. ** - проценти на контролата.

Пример 17. Биологична активност на об протеин при затлъстели хора: редуциране поемането на опитна храна след ИВ прилагане.

Биологичната активност на мишия и човешки об протеини, получени и пречистени съгласно примери 7 – 11, се определя чрез определяне поемането на опитна храна след ИВ прилагане при хора по следния начин.

Слаби и затлъстели хора доброволци са представени с опитна храна с фиксирано калорично съдържание в лаборатория по хранене на два пъти, като се използва методът на Mithra-hainen, N. E. et al. Най-малко 1 h преди поднасяне на храната ИВ катетър се поставя в антекубителната вена или вената на ръката и се държи отворен с хепаринов лок. Визуални аналогични данни за глад се получават 15 min преди, 15 min след поднасяне на храна и при приключване на тестовото хранене. След това се инфузира ИВ миши или човешки об протеин или физиологичен разтвор 20 min преди поднасяне на храната. Всеки

доброволец се инструктира да яде толкова от опитната храна, колкото желае, докато се почувства заситен. Количеството от тестова храна, погълната от всеки доброволец, се измерва. После всеки от тях получава инфузия от 0,5 mg/kg телесно тегло човешки об протеин, или 0,5 mg/kg телесно тегло миши или човешки протеин, или физиологичен разтвор и разликата в количеството на погълнатата тестова храна при тези условия се изчислява. В групата с човешки или миши об протеин се наблюдава намалено количество на консумирана храна поне с 20 %.

Пример 18. Биологична активност на об протеин при затлъстели хора: предизвикване на отслабване чрез неколкократно ИВ прилагане.

Биологичната активност на миши и човешки об протеини, получени и пречистени съгласно примери 7 – 11, се определя чрез измерване загубата на тегло след неколкократно ИВ прилагане на об протеин по следния метод.

Осъществено е плацебо контролирано, двойно сляпо изследване на загубата на тегло. Затлъстели пациенти с индекс на телесната маса /ИТМ/, по-висок от 27, се премерват и се поставят на диета с 1500 kcal за 2 – 4 седмичен период. В края на този период всички затлъстели

пациенти, които са загубили поне 1 kg телесно тегло, се разделят в две третирани групи, съответно на загубата на тегло до края на периода. Пациентите получават дневно ИВ администриране на 0,5 mg/kg/ден човешки или миши об протеин или плацебо /физиологичен разтвор/ поне за 6 седмици. Телесното тегло се записва седмично. Пациентите, получили човешки или миши об протеин, показват значително намаляване на телесното тегло в сравнение с плацебо групата след 6 седмици на третиране.

Пример 19. Получаване на полиетиленгликол, конюгиран с об протеин от клетки на E.coli.

50 g клетъчни пелети от E.coli, получени, както е описано в пример 8, преди да бъдат ресуспендирани, се суспендират с 1 l от 50 mM трис-HCl (pH 8,5), съдържащ 5 mM ЕДТА. Суспензията се инкубира 15 min при 37°C, разрежда се допълнително още с 1 l до 50 mM трис-HCl (pH 8,5), съдържащ 5 mM ЕДТА. След това суспензията се хомогенизира чрез хомогенизатор за 15 min при 50 % инсталационна мощност. Суспензията се избистря чрез центрофугиране при 8000 об./min при 4°C за 1 h. Отпадъчните пелети се изхвърлят. Супернатантата се разрежда с вода до проводимост 1,8 mS и директно се зарежда в колона, снабдена с 200 ml Q-Sepharose Fast Flow (силно анионна йонообменна смола), буферизирана с 50 mM трис-HCl (pH 8,5). След промиване с балансиращия буфер адсорбираните об протеин се елуираща от колоната със същия буфер, който допълнително съдържа 100 mM NaCl. Полученият елуат след третиране на колоната с балансиращия буфер, съдържащ натриев хлорид, се наименова Q-Sepharose елуат.

Към Q-Sepharose елуата се прибавя твърд натриев хлорид до постигане на крайна проводимост до 82 mS. След това елуатът се зарежда в хидрофобна интерактивна колона /ХИК/, запълнена с 200 ml бутил-Sepharose Fast Flow, пребуферизирана с 50 mM трис-HCl (pH 8,5), съдържащ 1M NaCl. Неадсорбираните материали се промиват с балансиращия буфер и адсорбираните об протеин се елуираща с 50 mM амониев ацетат (pH 6,9) до получаване на HCl елуат. Определено е чрез обратнo-фазова ВЕТХ, че об протеинът в HCl елуата е с чистота 95 %. Пречистеният об протеин се концентрира до 3,7 mg/ml, като се използва калибрирана мембрана УМ-10. Калибрираната мембрана е мембрана, която задържа молекули с 10 000 Da и повече. След този етап на концентриране чрез калибрирана мембрана об протеинът се диафилт-

рира през 100 mM боратен буфер (pH 8,0), който се използва като об запасен разтвор.

Б. Пегилация на об протеин.

При провеждане на тази реакция на пегилация се използва реагентът PEG₂-NHS с формула II A, където R е CH₃, сборът от n и n' е от 820 до 1040, като средната сума е около 930 и има средно молекулно тегло от 40 kDa, който се набавя от Shearwater Polymers Huntsville, Alabama. Това е смес от реагенти PEG₂-NHS с формула II A, където съотношението n към n' е приблизително 1,0 и сумата n и n' в тази смес е от 820 до 1040 единици, със средно молекулно тегло на PEG-веригата в тази смес да е приблизително 20 kDa, така че средното молекулно тегло на реагента да е около 40 kDa със средна сума на n и n' в тази смес около 930. Към 2 mg или 0,54 ml от 3,7 mg/ml от пречистения човешки об запасен разтвор, получен в параграф A [125 nm об протеин] се прибавят 250 nm на споменатия разтвор на реагента PEG₂-NHS. Този разтвор съдържа 10 mg или 0,1 ml от 100 mg/ml разтвор на реагента PEG₂-NHS в 1 mM HCl. Общата реакционна смес се наглася до 0,67 ml чрез прибавяне на 100 mM борат с pH 5,0. Финалното молекулно съотношение на протеин към реагент е 1 : 2. Тази смес се разбърква при 4°C за 4 h и реакцията се спира чрез прибавяне на 1 µl ледена оцетна киселина до получаване на крайно pH 4,5. Получената реакционна смес от 0,67 ml се разрежда с вода до образуване на 27 ml разтвор, който се зарежда в колона, съдържаща 1,7 ml карбоксиметилирана катионно-обменна смола (Perseptive, Framingham, Massachusetts). Колоната се буферира с 3,3 µM HEPES/MES/ натриев ацетатен буфер с pH 5,0. Разредената реакционна смес се зарежда в колона и неадсорбираните PEG₂-NHS реагент се измива от колоната. Адсорбираните пегилани немодифицирани об протеини се елуираща със степенни солеви градиенти (15 колонни обема всеки) от 80, 150 и 500 mM NaCl. От тези елуати 2 ml се събират отделно на порции и проба от всяка фракция се подлага на SDS-PAGE анализ. След този анализ елуатите се класифицират като високо пегилани конюгати, желани разклонени моно-PEG-ob (PEG₂-ob) и немодифицирани об протеини. Всяка от тези фракции се поставя в посочените горе класификации и вторият резервоар, съдържащ желани разклонен моно-PEG₂-ob протеин. Този желан протеин има структурата на съединение с формула I A, където сумата от n и n' е приб-

лизително 820 – 1040 или средно около 930, n и n' са CH_3 и средното молекулно тегло на всяка PEG-верига е около 20 kDa. Пегилираният продукт има средно молекулно тегло около 56 kDa. Резервоарът, съдържащ PEG_2 -об, се концентрира до 3,7 mg/ml с мембрана УМ 10. Това е калибрирана мембрана, задържаща молекулите с тегло от 10 000 Da или по-високо. След стадия на калибриране концентрираният материал се диалитрира през фосфатен буферен разтвор с рН 7,3 и се съхранява замразен при -20°C . Този складиран продукт е пегилирания об протеин с формула I А, където сумата от n и n' е приблизително 820 до 1040 и средното молекулно тегло е приблизително 20 kDa. Средното молекулно тегло на PEG протеина в тази протеинова конюгирана смес е 56 kDa.

Пример 20. Биологично изследване на пегилиран човешки об протеин: Единично ИП инжектиране при об/об мишки.

Методи.

Две групи от шест женски затлъстели об/об мишки са изследвани. Мишките се държат в пластмасови клетки по три в клетка при постоянна околна среда с цикъл от 12 h тъмно/12 h светло. Всеки ден се измерва поемането на храна за 24 h и телесното тегло. След период на приспособяване към околните условия, дневно третиране и инжекции мишките се разпределят в две третирани групи. Всяка мишка се инжектира в първия ден от експеримента точно преди началото на тъмната фаза от цикъла тъмно/светло с една ИП инжекция от 0,1 ml от следните инжекции: 0,9 % физиологичен разтвор, 30 mg/0,1 ml съхраняван разтвор на човешки об протеин, приготвен по параграф А на пример 19, и 30 mg/0,1 ml пегилиран контролен разтвор /като идентично получена и пречистена проба без човешки об протеин/, или 30 μg /0,1 ml пегилиран об протеин, получен, както е описано в пример 19. Мишките се инжектират само веднъж в първия ден. Дневното поемане на храна в клетката и телесното тегло на всяка мишка се измерва през следващите три дни и после отново на шестия ден.

Резултати.

А. Редуциране на поемането на храна.

Дневното поемане на храна не е различно при мишките, инжектирани с физиологичен разтвор и пегилиран контрол при единично третиране за два последователни дни /таблица 5/. Обаче дневното поемане на храна се редуцира при шестте мишки, инжектирани с 30 μg човешки об

протеин и пегилиран човешки об протеин в деня на третиране (5,2, 8,2 срещу 11,9 и 11,4 g), в сравнение с мишките, инжектирани с физиологичен разтвор и пегилиран контролен разтвор.

5 Поемането на храна от мишките, инжектирани с човешки об протеин, отговаря на контролните нива, докато поемането на храна от мишките, инжектирани с пегилиран човешки об протеин, остава намалено в следващите дни на експеримента. Намаляването на приема на храна се наблюдава 48 h след единичното инжектиране в групата с пегилиран човешки об протеин. Кумулативното поемане на храна за 24 h през трите дни от експеримента е значително редуцирано до 49 %

10 от контролното за пегилирания човешки об протеин в сравнение с групите, получили физиологичен разтвор и пегилиран контролен разтвор.

Б. Редуциране увеличаването на телесното тегло.

20 Изменението в телесното тегло не е различно при мишките, инжектирани с физиологичен разтвор и пегилиран контролен разтвор за единично третиране в два последователни дни /таблица 6/. Обаче телесното тегло е намалено

25 при шестте мишки, инжектирани с 30 μg човешки об протеин и пегилиран човешки об протеин в деня на третиране /-0,9, -0,7 срещу 0,1 и 0,3 g/, в сравнение с мишките, инжектирани с физиологичен разтвор и пегилиран контролен разтвор.

30 Телесното тегло на мишките, инжектирани с човешки об протеин, съвпада с контролните нива, докато телесното тегло на мишките, инжектирани с пегилиран човешки об протеин продължава да намалява в следващите дни на експеримента.

35 Продължаването на спада на телесното тегло се наблюдава 48 h след единичната инжекция в групата с пегилиран човешки об протеин. Кумулативното изменение в телесното тегло след шестте дни от експеримента е -1,6 g, в сравнение

40 с 0,4 g в групата с об протеин, 0,7 g в групата с физиологичен разтвор и $1,1 \pm 0,2$ g в пегилационната контролна група.

Заклучения. Този опит показва, че единична ИП инжекция на 30 μg /мишка пегилиран човешки об протеин предизвиква значително и постоянно редуциране на поемането на храна и значително понижаване в телесното тегло на третирани женски об/об мишки за три дни в сравнение с об/об мишки, третирани с физиологичен разтвор и пегилиран контрол. Тези резултати показват, че пегилираният човешки об протеин има продължителна и висока биологична

активност и има очаквания ефект срещу затлъс-

тяване при генетично затлъстели об/об мишки.

Таблица 5.

Дневно поемане на храна при об/об мишки с единично ИП прилагане на пегилиран човешки об протеин.

Третиране	Поемане на храна, 3 мишки/ден					
	Ден 1		Ден 2		Ден 3	
	g	% контрола	g	% контрола	g	% контрола
Физиологичен разтвор	11,9	100	13,7	100	13,6	100
Пегилиран контрола	11,4	95,8	4,5	106	13,4	99
об протеин	5,2	43,7	11,7	85,4	12,5	92
Пегилиран об протеин	8,2	68,9	6,0	43,8	4,9	36

Данните са осреднени за шест об/об мишки от всяка група. Поемането на храна е дневното поемане на храна за клетки с три мишки за всеки ден от експеримента след единичната ИП инжекция

в първия ден. Не се наблюдава постоянно редуциране в дневното поемане на храна, освен в групата с пегилиран об протеин.

Таблица 6.

Изменение в телесното тегло при об/об мишки с единично ИП прилагане на пегилиран човешки об протеин.

Третиране	Изменение в телесното тегло, g			
	Ден 1	Ден 2	Ден 3	Ден 6
Физиологичен разтвор	0,1	0,6	0,01	-0,01
об протеин	-0,9	1,1	0,2	НД
Пегилиран контрола	0,3	0,4	0,6	-0,2
Пегилиран об протеин	-0,7	-0,6	-0,9	0,6

Данните са осреднени за шест об/об мишки във всяка група. Мишките получават единична ИП инжекция само в ден 1. Изменение в телесното тегло е изменението в телесното тегло във всеки ден от експеримента. Не се наблюдава постоянно понижаване на теглото само в групата с пегилиран об протеин. НД в таблицата означава неопределен.

Патентни претенции

1. Хомогенен биологично активен човешки протеин на затлъстяването или негов фрагмент, който фрагмент има биологичната активност на протеина.

2. Протеин или негов фрагмент съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че биологичната активност на този протеин или на неговия фрагмент се характеризира чрез намаляване приема на храна и редуциране степента

на повишаване на теглото на бозайници.

3. Протеин съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че съдържа SEQ ID NO: 6.

4. Рекомбинантен биологично активен човешки протеин на затлъстяването, свободен от други животински протеини или техни фрагменти, които фрагменти имат биологичната активност на посочения протеин.

5. Протеинът или фрагментът съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че неговата биологична активност се характеризира чрез намаляване приема на храна и редуциране степента на увеличаване теглото на бозайници.

6. Протеин съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че съдържа SEQ ID NO: 6.

7. Хомогенен биологично активен миши протеин на затлъстяването или негов фрагмент, който фрагмент има биологичната активност на посочения протеин.

8. Протеинът или фрагментът съгласно претенция 7, характеризира се с това, че биологичната активност на този протеин или фрагмент се характеризира чрез намаляване приема на храна и редуциране степента на повишаване на теглото при бозайници.

9. Протеин съгласно претенция 7, характеризира се с това, че се състои от SEQ ID NO: 3.

10. Рекombинантен биологично активен миши протеин на затлъстяването, свободен от други животински протеини или негов фрагмент, който фрагмент има биологичната активност на посочения протеин.

11. Протеин съгласно претенция 10, характеризира се с това, че биологичната активност на споменатия протеин се характеризира чрез намаляване приема на храна и редуциране степента на увеличаване теглото при бозайници.

12. Протеин съгласно претенция 10, характеризира се с това, че съдържа SEQ ID NO: 3.

13. Експресионен вектор, който се състои от:

а/ промоторна последователност, и

б/ ДНК последователност, кодираща слят протеин, който слят протеин съдържа мишия об протеин със SEQ ID NO: 3, или човешкия об протеин със SEQ ID NO: 6 и сигналния пептид за външния мембранен протеин А на *E.coli*, който експресионен вектор е способен да експресира слетия протеин в клетките на гостоприемника *Escherichia coli*.

14. Експресионен вектор съгласно претенция 13, характеризира се с това, че промоторната последователност се състои от lac-промоторен оператор и липопротеинов промотор.

15. Слят протеин, съдържащ мишия протеин на затлъстяването или човешкия протеин на затлъстяването, и сигналния пептид за външния мембранен протеин А на *Escherichia coli*.

16. Слят протеин съгласно претенция 15, характеризира се с това, че мишият протеин на затлъстяването съдържа SEQ ID NO: 3 и човешкият протеин на затлъстяването съдържа SEQ ID NO: 6.

17. ДНК последователност, състояща се от първа и втора част, където:

а/ първата част е *sOmpA* генната последователност със SEQ ID NO: 7, кодираща *sOmpA* пептида, и

б/ втората част е нуклеотидната последователност, кодираща мишия об протеин, или нуклеотидната последователност, кодираща човеш-

кия об протеин.

18. ДНК последователността съгласно претенция 17, характеризира се с това, че мишият об протеин съдържа SEQ ID NO: 3.

19. ДНК последователността съгласно претенция 17, характеризира се с това, че човешкият об протеин се състои от SEQ ID NO: 6.

20. Организъм гостоприемник *E.coli*, трансформиран с експресионния вектор, съгласно претенция 13.

21. Метод за получаване на биологично активен рекombинантен човешки или миши протеин на затлъстяването, свободен от други животински протеини, характеризира се с това, че се състои от следните етапи:

а/ конструира се експресионен вектор с промоторна последователност, и ДНК последователност, кодираща слят протеин, който слят протеин се състои от SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 6, и сигналния пептид за външния мембранен протеин А на *E.coli*;

б/ инсертира се експресионният вектор в клетките на гостоприемника *E.coli* за трансформиране на клетките на гостоприемника *E.coli*;

в/ експресира се слетият протеин в клетките на гостоприемника *E.coli*, и

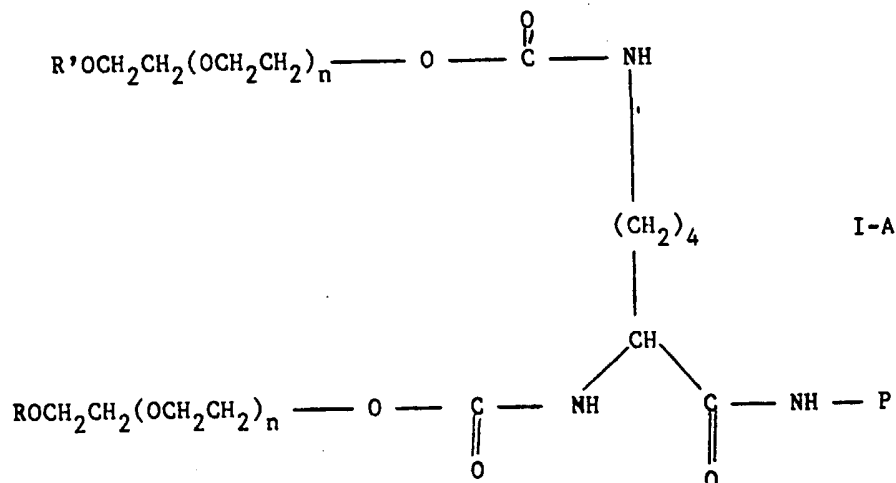
г/ третира се клетката на гостоприемника *E.coli* със студен осмотичен шок буфер, за да се освободи мишият или човешкият об протеин от други животински протеини и от сигналния пептид.

22. Човешка об генна последователност, която се състои от SEQ ID NO: 4.

23. Метод за получаване на хомогенен биологично активен рекombинантен човешки или миши протеин на затлъстяването, характеризира се с това, че осмотичната течност, съдържаща човешкия или мишия об протеин, се подлага на комбинация от анионно-обменна колонна хроматография, колонна хроматография с хидрофобно взаимодействие и гел филтрация.

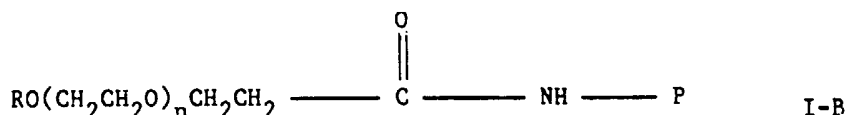
24. Състав, характеризира се с това, че съдържа един или повече конюгати на полиетиленгликол и/или полипропиленгликол, свързани с човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12, като средното молекулно тегло на полиетиленгликоловите или полипропиленгликоловите единици в споменатите конюгати на посочения състав е от 15 до 60 kDa.

25. Състав, характеризира се с това, че съдържа един или повече конюгати с формула



в която Р е човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12, п и п' са числа, имащи сума от 300 до 1500, средното молекулно тегло на полиетиленгликоловите единици в споменатите конюгати на състава е от 15 до 60 kDa, и R и R' са нисш алкил.

26. Състав съгласно претенция 25,



в която Р е човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12, п е цяло число и има стойности от 300 до 1500, средното молекулно тегло на полиетиленгликоловите единици в споменатите конюгати на състава е от 15 до 60 kDa, и R е нисш алкил.

28. Състав съгласно претенция 27, характеризиращ се с това, че п е около 850 до 1000 и средното молекулно тегло на полиетиленгликоловите единици в споменатите конюгати в посочения състав е от 35 до 45 kDa.

29. Човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12 или състав съгласно претенции от 24 до 28 като терапевтично активно средство.

30. Човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12 или състави съгласно претенции от 24 до 28 като терапевтично активно средство за лечение, профилактика и контрол на затлъстяването и свързаните с него заболявания.

31. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че съдържа човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12 или състави съгласно претенции от 24 до 28 и съвместим фармацевтично приемлив носител.

32. Използване на човешки или миши об

характеризиращ се с това, че сумата на п и п' е от 800 до 1200 и средното молекулно тегло на полиетиленгликоловите единици в споменатия конюгат на състава е от 35 до 45 kDa.

27. Състав, характеризиращ се с това, че съдържа един или повече конюгати с формула

протеин съгласно претенции от 1 до 12 или състав съгласно претенции от 24 до 28 за приготвяне на фармацевтични състави.

33. Използване на човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12 или състав съгласно претенции от 24 до 28 за приготвяне на фармацевтични състави за лечение, профилактика и контрол на затлъстяването и свързаните с него заболявания.

34. Използване на човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12 за идентифициране на об протеинов рецептор/и.

35. Използване на експресионен вектор съгласно претенции 13 и 14 за продуциране на човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12.

36. Използване на ДНК последователност съгласно претенции от 17 до 19 за продуциране на човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12.

37. Използване на организъм гостоприемник от *Escherichia coli* за продуциране на човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12.

38. Хомогенен биологично активен рекомбинантен човешки или миши об протеин, получен

по метод, съгласно претенция 21 или 23.

39. Метод за лечение, профилактика или контрол на затлъстяване и свързаните с него заболявания, характеризиращ се с това, че се прилага

човешки или миши об протеин съгласно претенции от 1 до 12 и 33, или състав съгласно претенции от 24 до 28.

Списък на последователностите

5 (1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
(B) STREET: Grenzacherstrasse 124
0 (C) CITY: Basle
(D) STATE: BS
(E) COUNTRY: Switzerland
(F) POSTAL CODE (ZIP): CH-4070
(G) TELEPHONE: 061 - 688 42 56
5 (H) TELEFAX: 061 - 688 13 95
(I) TELEX: 962292/965542 hlr ch

Заглавие: РЕКОМБИНАНТНИ ПРОТЕИНИ НА ЗАТЪЛЪСТЯВАНЕТО

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 8

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
5 (B) COMPUTER: Apple Macintosh
(C) OPERATING SYSTEM: System 7.1 (Macintosh)
(D) SOFTWARE: Word 5.0

(2) Информация за SEQ ID NO: 1:

Характеристики на последователността:

(A) Дължина: 702 базови двойки

(B) Тип: нуклеинова киселина

(B) Извивки: единична

(Г) Топология: линейна

Молекулен тип: сДНК

Хипотетичен: не

Антисенс: не

Описание на: SEQ ID NO: 1:

```

CAAGGTGCAA GAAAGAGAAAG ATCCAGGGA GAAAGATGTG CTGGAGGCC CTGTGTGGG 90
TCCTGTGGCT TTGGTCSTAT CTGTCTTATG TTCAAGCAGT GCCTATCCAG AAAGTCCAGG 120
ATGACACCAA AACCCATCATC AAGACCATTG TCACCAGGAT CAATGACATT TCACACACGC 180
AGTCGGTATC CGCCAAGCAG AGGGTCACTG GCTTGGACTT CATTCCTGGG CTTACACCCA 240
TTCTGAGTTT GTCCAAGATG GACCAGACTC TGGCAGTCTA TCAACAGGTC CTCACCAGCC 300
TGCCTTCCCA AAATGTGCTG CAGATAGCCA ATGACCTGGA GAATCTCCGA GACCTCCTCC 360
ATCTGCTGGC CTTCTCCAAG AGCTGCTCCC TGCTCAGAC CAGTGGCCTG CAGAAGCCAG 420
AGAGCCTGGA TGGCGTCTTG GAAGCCTCAC TCTACTCCAC AGAGGTGGTG GCTTTGAGCA 480
GGCTGCAGGG CTCTCTGCAG GACATTCTTC AACAGTTGGA TGTTAGCCCT GAATGCTGAA 540
GTTTCAAAGG CCACCAGGCT CCCAAGAATC ATGTAGAGGG AAGAAACCTT GGCTTCCAGG 600
GGTCTTCAGG AGAAGAGAGC CATGTGCACA CATCCATCAT TCATTTCTCT CCCTCCTGTA 660
GACCACCCAT CCAAGGCAT GACTCCACAA TGCTTGACTC AA 702

```

Информация за: SEQ ID NO: 2:

Характеристики на последователността:

(A) Дължина: 167 аминокиселини

(B) Тип: аминокиселина

(B) Верижност: нерелевантна

(Г) Топология: неизвестна

Молекулен тип: пептид

Хипотетичен: не

Антисенс: не

Описание на последователност: SEQ ID

NO: 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

```

Информация за: SEQ ID NO: 3:

Характеристики на последователността:

(A) Дължина: 146 аминокиселини

(Б) Тип: аминокиселина

(В) Верижност: нерелевантна

(Г) Топология: неизвестна

Молекулен тип: пептид

Хипотетичен: не

Антисенс: не

Описание на SEQ ID NO: 3:

```

Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1           5           10           15
Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ala
20           25           30
Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
35           40           45
Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Val
50           55           60
Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp Leu
65           70           75           80
Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
85           90           95
Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly
100          105          110
Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115          120          125
Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser Pro
130          135          140
Glu Cys
145

```

Информация за SEQ ID NO: 4:

Характеристики на последователността:

(A) Дължина: 690 базови двойки

(Б) Тип: нуклеинова киселина

(В) Верижност: единична

(Г) Топология: линейна

Молекулен тип: сДНК

Хипотетичен: не

Антисенс: не

Описание на последователност SEQ ID NO: 4:

```

GTGCAAGGC CCAAGAAGCC CATCCTGGGA AGGAAAATGC ATTGGGGAAC CCTGTGCGGA      60
TTCTTGTCGC TTGGCCCTA TCTTTTCTAT GTCCAAGCTG TGCCCATCCA AAAAGTCCAA      120
GATGACACCA AAACCCTCAT CAAGACAATT GTCACCAGGA TCAATGACAT TTCACACACG      180
CAGTCAGTCT CCTCCAAACA GAAAGTCACC GGTTTGGACT TCATTCTCGG GCTCCACCCC      240
ATCCTGACCT TATCCAAGAT GGACCAGACA CTGGCAGTCT ACCAACAGAT CCTCACCAGT      300
ATGCCTTCCA GAAACGTGAT CCAAAATATCC AACGACCTGG AGAACCTCCG GGATCTTCTT      360
CACGTGCTGG CCTTCTCTAA GAGCTGCCAC TTGCCCTGGG CCAGTGGCCT GGAGACCTTG      420
GACAGCCTGG GGGGTGTCCT GGAAGCTTCA GGCTACTCCA CAGAGGTGGT GGCCCTGAGC      480
AGGCTGCAGG GGTCTCTGCA GGACATGCTG TGGCAGCTGG ACCTCAGCCC TGGGTGCTGA      540
GGCCTTGAAG GTCACCTCTC CTGCAAGGAC TACGTTAAGG GAAGGAACTC TGGCTTCCAG      600
GTATCTCCAG GATTGAAGAG CATTGCATGG ACACCCCTTA TCCAGGACTC TGTCAATTTC      660
CCTGACTCCT CTAAGCCACT CTTCCAAAGG      690

```

Информация за SEQ ID NO: 5:

Характеристики на последователността:

(A) Дължина: 167 аминокиселини

(Б) Тип: аминокиселина

(В) Верижност: единична

(Г) Топология: неизвестна

Молекулен тип: пептид

Хипотетичен: не

Антисенс: не

Описание на последователност: SEQ ID

NO: 5:

```

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

```

Информация за SEQ ID NO: 6:

Характеристики на последователността:

(A) Дължина: 146 аминокиселини

(Б) Тип: аминокиселина

(В) Верижност: нерелевантна

(Г) Топология: неизвестна

Молекулен тип: пептид

Хипотетичен: не

Антисенс: не

Описание на последователността: SEQ ID NO: 6:

```

Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1           5           10           15
Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
20           25           30
Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
35           40           45
Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
50           55           60
Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
65           70           75           80
Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
85           90           95
His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
100          105          110
Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115          120          125
Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro
130          135          140
Gly Cys
145

```

Информация за SEQ ID NO: 7:

Характеристики на последователността:

(А) Дължина: 63 базови двойки

(Б) Тип: нуклеинова киселина

(В) Верижност: двойна

(Г) Топология: линейна

Молекулен тип: ДНК (геномна)

Хипотетичен: не

Антисенс: не

Описание на последователността: SEQ ID

NO: 7:

ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTAGCGCAG
GCC

Информация за SEQ ID NO: 8:

Характеристики на последователността:

(А) Дължина: 21 аминокиселини

(Б) Тип: аминокиселина

(В) Верижност: нерелевантна

(Г) Топология: неизвестна

Молекулен тип: пептид

Хипотетичен: не

Антисенс: не

Описание на последователността: SEQ ID

NO: 8:

```

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1           5           10           15
Thr Val Ala Gln Ala
20

```

Приложение: 3 фигури

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

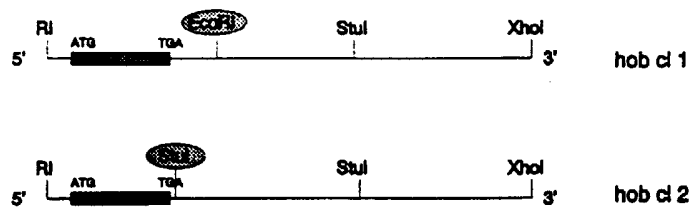
Експерт: Д.Кацарова

Редактор: А.Семерджиева

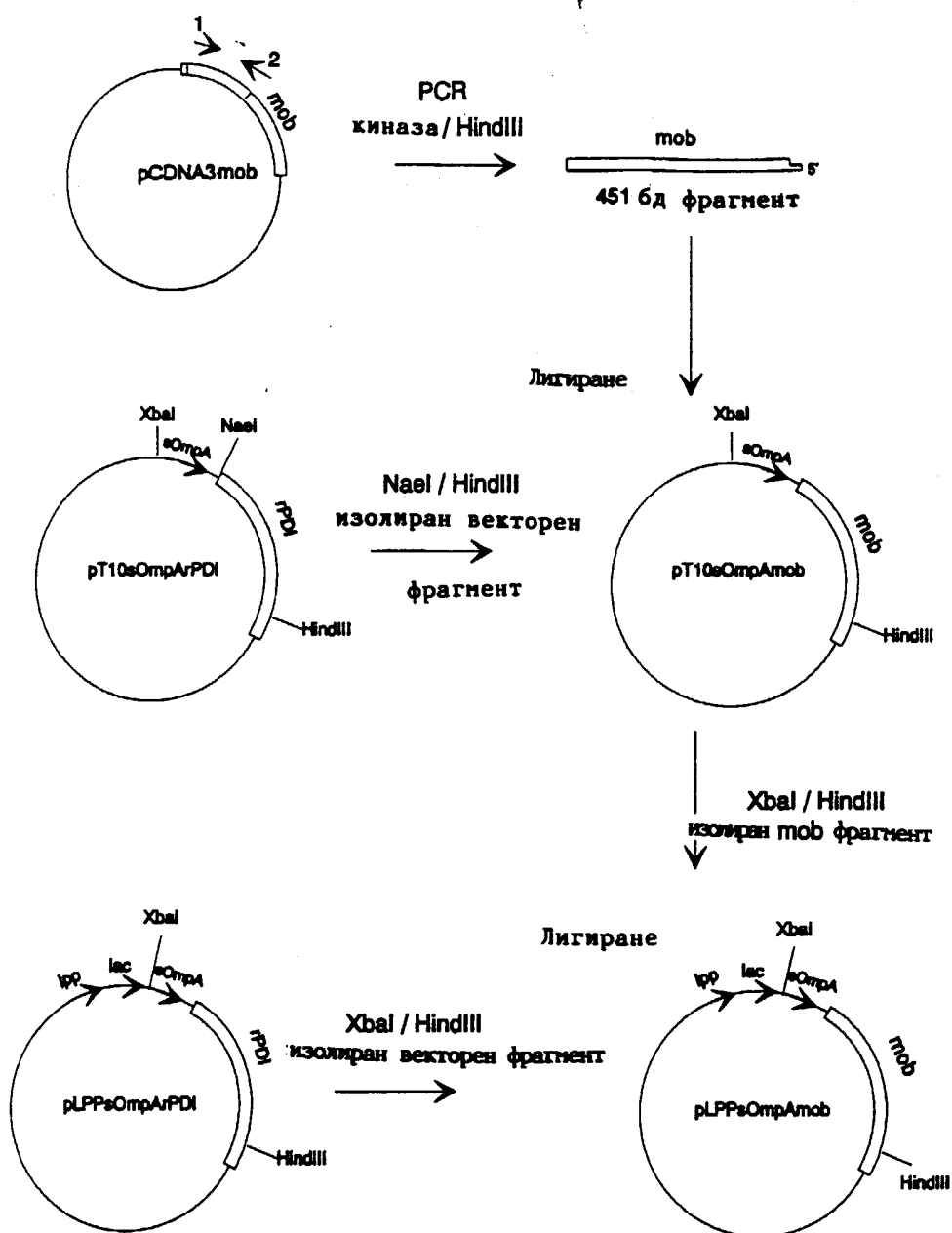
Пор. 40408

Тираж: 40 MB

Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3

