



(11) **121036 B1**

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);
C07K 14/47 (2006.01);
C12Q 1/68 (2006.01);
A61K 38/17 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **97-00311**

(22) Data de depozit: **17.08.1995**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.11.2006** BOPI nr. 11/2006

(30) Prioritate:

17.08.1994 US 08/292.345;
30.11.1994 US 08/347.563;
10.05.1995 US 08/438.431;
07.06.1995 US 08/483.211

(86) Cerere internațională PCT:

Nr. **US 95/10479** **17.08.1995**

(87) Publicare internațională:

Nr. **WO 96/05309** **22.02.1996**

(73) Titular:

• **THE ROCKEFELLER UNIVERSITY,**
1230 YORK AVENUE, NEW YORK, US

(72) Inventatori:

• **FRIEDMAN JEFFREY M.,**
APARTMENT NR.17B, 500 EAST 63RD
STREET, NEW YORK, US;

• **ZHANG YIYING, APARTMENT 27 F,**
30 WATERSIDE PLACE, NEW YORK, US;
• **PROENCA RICARDO, 26-62 30TH**
STREET, ASTORIA, US;
• **MAFFEI MARGHERITA,**
APARTMENT NR. 36S, 504 EAST 63RD
STREET, NEW YORK, US;
• **HALAAS JEFFREY L., APARTAMENT 9J,**
420 EAST 70TH STREET, NEW YORK, US;
• **GAJIWALA KETAN, APARTMENT 11F,**
500 EAST 63RD STREET, NEW YORK, US;
• **BURLEY STEPHEN K., APARTMENT 20A,**
500 EAST 63RD STREET, NEW YORK, US

(74) Mandatar:

ROMINVENT S.A.,
STR. ERMIL PANGRATTI, NR.35,
SECTOR 1, BUCUREȘTI

(56) Documente din stadiul tehnicii:

WO 94/00558410;
EP 0566410

(54) **POLIPEPTIDĂ OB ȘI DERIVAȚI IMUNOGENI AI ACESTEIA,
MOLECULE ADN, PROCEDEU DE PREPARARE,
COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ ȘI UTILIZAREA ACESTEIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o polipeptidă OB ca modulator al greutatei corporale, la fragmente imunogene ale acestei polipeptide, la analogi și derivați ai acestei polipeptide, la o moleculă izolată de acid nucleic, care codifică polipeptida OB, precum și la oligonucleotida primer și la vectorul care conține molecula de acid nucleic, la procedeul de preparare a unei polipeptide OB, la un anticorp

specific pentru polipeptida OB, la o compoziție farmaceutică care conține polipeptida OB, utilizate pentru fabricarea unui medicament pentru modificarea greutatei corporale a unui animal.

Revendicări: 48

Figuri: 35



RO 121036 B1

1 Prezenta invenție se referă, în general, la controlul greutateii corporale al mamiferelor,
incluzând animale și oameni, și în special la compuși identificați aici ca modulatori ai greutateii
3 corporale, și la utilizările sale în diagnostic și terapeutică, la care pot fi folosiți astfel de
modulatori.

5 Este cunoscut faptul că obezitatea, definită ca un exces al grăsimii corporale față de
masa corporală fără grăsime, este asociată cu importante morbidități psihologice și medicale,
7 cele medicale, incluzând hipertensiunea, lipidele sanguine ridicate și Tipul II sau diabetul
zaharat non-insulino-dependent (NIDDM). În USA există 6 până la 10 milioane de indivizi cu
9 NIDDM, incluzând 18% din populația având vârsta de 65 ani (Harris și colab., *Int. J. Obes. II*:
275-283 (1987). Aproximativ 45% bărbați și 70% femei cu NIDDM, sunt obezi și diabetul
11 acestora este ameliorat substanțial sau vindecat prin reducerea greutateii (Harris, *Diabetes*
Care, 14(3): 639 - 648 (1991)). Așa cum se descrie în continuare, atât obezitatea cât și
13 NIDDM sunt puternic ereditare, chiar dacă genele predispoziției n-au fost identificate. Baza
genetică moleculară a acestor tulburări legate de metabolism este importantă, problema fiind
15 puțin înțeleasă.

Asimilarea, înmagazinarea și utilizarea energiei nutritive constituie un sistem central
17 homeostatic complex pentru supraviețuirea metazoarelor. În cazul mamiferelor care trăiesc
în pământ, înmagazinarea în țesutul adipos a unor cantități mari de combustibil metabolic,
19 cum sunt trigliceridele, este crucială pentru supraviețuire în perioadele în care acestea sunt
private de hrană. Necesitatea menținerii unui nivel fix de energie care se înmagazinează fără
21 modificări continue în dimensiunile și forma organismului, determină obținerea unui echilibru
între energia consumată și cea dezvoltată. Cu toate acestea, mecanismele moleculare care
23 reglează echilibrul de energie rămân a fi elucidate. Izolarea moleculelor care transmit infor-
marea nutrițională și controlul echilibrului de energie vor fi critice în ceea ce privește înțele-
25 gerea reglării greutateii corporale în caz de sănătate și boală.

Se determină genetic nivelul individual al adipozității într-o măsură mai mare. Exami-
27 narea gradului de concordanță a greutateii corporale și adipozității la gemeni monoziți și
diziți sau adoptivi, și la părinții biologici ai acestora, a sugerat că moștenirea obezitității (0,4-
29 0,8) depășește pe cea a multor alți trăsături, care sunt considerate în mod curent ca având
o componentă genetică substanțială, cum ar fi schizofrenia, alcoolismul și ateroscleroza
31 (Stunkard și colab. *N. Engl. J. Med.* 322: 1483-1487 (1990)). Au fost raportate, de asemenea,
asemnările familiale privind gradele de consum de energie (Bogardus și colab., *Diabetes*,
33 35:1-5 (1986). Analiza genetică a populațiilor delimitate geografic a sugerat că un număr
relativ mic de gene poate fi calculat pentru 30-50% din varianta compoziției corporale (Moli
35 și colab. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 1243-1255(1991)). Cu toate acestea, niciuna dintre genele
responsabile cu obezitatea la oameni n-a fost cartografiată genetic, pentru localizarea unui
37 anumit cromozom.

Pentru rozătoare, modelele de obezitate includ șapte mutații aparent monogenetice.
39 Cele mai intens studiate mutații de obezitate, la șoareci, au fost genele *ob* (obezitate) și
genele *db* (diabet). În cazul prezentării pe aceeași tulpină genetică de bază, genele *ob* și *db*
41 au ca rezultat fenotipuri metabolice și de comportament care nu se disting, sugerându-se că
aceste gene pot să funcționeze în același mod fiziologic (Coleman și colab. *Diabetologia*, 14:
43 141-148 (1978)). Șoareci homozigoți pentru fiecare mutație sunt hiperfagi și hipometabolici,
conducând la un fenotip obez, care este remarcabil la vârsta de 1 lună. Greutatea acestor
45 animale tinde să se stabilizeze la greutatea de 60-70 g (comparativ cu greutatea de 30-35 g
la șoarecii martor). Animalele *ob* și *db* manifestă o foarte multe alte modificări metabolice și
47 hormonale, ceea ce a făcut dificilă identificarea defectului primar atribuit mutației (Bray și
colab., *Am. J. Clin. Nutr.* 50: 891-902(1989)). Fiecare dintre modelele de obezitate, în cazul
49 rozătoarelor, este însoțit de modificări ale metabolismului hidraților de carbon, care sunt
asemănătoare celor de la oameni în cazul diabetului Tipul II.

RO 121036 B1

În unele cazuri, severitatea diabetului depinde parțial de tulpina genetică de bază, la șoareci (Leiter, <i>Endocrinology</i> , 124 : 912-922 (1989)). Pentru ambele gene <i>ob</i> și <i>db</i> , șoarecii congenici C57BL/Ks dezvoltă un tip de diabet sever, cu necroză esențială β celulară și atrofie insulară, ceea ce are ca rezultat insulinopenia relativă. Spre deosebire de aceștia, șoarecii congenici C57BL/6J <i>ob</i> și <i>db</i> dezvoltă un diabet insulino-rezistent trecător, care este eventual compensat prin hipertrofia β celulară, asemănător diabetului uman de Tipul II.	1
Fenotipul <i>ob</i> și <i>db</i> la șoareci, se aseamănă cu obezitatea la oameni în alte feluri decât dezvoltarea diabetului la șoarecii mutanți care mănâncă mai mult și consumă mai puțină energie în raport cu martorii slabi (la fel cu oamenii obezi). Acest fenotip este așadar aproape similar cu cel întâlnit la animalele cu leziuni ale hipotalamusului ventromedian, ceea ce sugerează că ambele mutații pot interfera cu abilitatea de integrare proprie sau de răspuns la informația nutrițională, din sistemul nervos central. Susținerea acestei ipoteze apare ca rezultat al experimentelor de parabioză (Coleman, <i>Diabetologia</i> , 9: 294-298 (1973)), care sugerează că șoarecii <i>ob</i> sunt deficitari în ceea ce privește factorul circulant de saturație și că șoarecii <i>db</i> sunt rezistenți la efectele factorului <i>ob</i> (posibil datorită unui receptor defect <i>ob</i>). Aceste experimente au condus la concluzia că obezitatea la acești șoareci mutanți poate rezulta din diferite defecte, într-o legătură aferentă și/sau centru integrativ al mecanismului de feed-back postulat, care controlează compoziția organismului.	3
Prin utilizarea markerilor moleculari și clasici genetici, genele <i>ob</i> și <i>db</i> au fost cartate sub forma cromozomului proximal 6 și respectiv mid cromozomului 4 (Bahary și colab., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 87: 8642-8646 (1990); Friedman și colab., <i>Genomics</i> , 11: 1054-1062 (1991)). În ambele cazuri, cartarea mutațiilor în zone ale genomului de șoarece, sintenice cu cele umane, sugerează că, dacă există omologi umani de <i>ob</i> și <i>db</i> , aceștia sunt conform desenelor, cromozomi umani 7q și respectiv cromozomi umani 1p. Defectele în gena <i>db</i> au ca rezultat obezitatea în alte specii de mamifere: în cazul încrucișărilor genetice între șobolani Zucker fa/fa și jobolani Brown Norway +/+, mutația fa (cromozomul 5 la șobolan) fiind flancată în aceeași poziție ca și mutația <i>db</i> flancată la șoarece (Truett și colab. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 88:7806-7809(1991)).	5
Datorită unei multitudini de factori care par a influența greutatea corporală, n-a fost posibil să se precizeze ce factori și, în special, ce mecanisme homeostatice sunt determinative în primul rând ale greutateii corporale. Astfel, problema principală menționată în prezenta invenție este de a se prevedea modulatori ai greutateii corporale care să permită controlul adipozității și conținutului de grăsimi la mamifere.	7
Problema pe care o rezolvă invenția este de a prezenta o polipeptidă <i>ob</i> , un fragment imunogenic al unei polipeptide, un analog al polipeptidei, un derivat al unei polipeptide <i>ob</i> , o moleculă izolată de acid nucleic, o oligonucleotidă primer pentru aplicarea ADN genomic uman, un vector care conține o moleculă ADN, un procedeu de preparare a unei polipeptide <i>ob</i> , un anticorp specific pentru o polipeptidă <i>ob</i> , compoziție farmaceutică și utilizarea polipeptidei <i>ob</i> pentru fabricarea unui medicament pentru modificarea greutateii corporale a unui animal.	9
Polipeptida <i>ob</i> , conform invenției, înlătură dezavantajele menționate prin aceea că este aleasă din grupul format din:	11
a) o polipeptidă care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID. NR.: 2, 4, 5 sau 6;	13
b) o polipeptidă activă biologic care este o alelă al unei polipeptide cu SECV. ID NR.: 2, 4, 5 sau 6, în care respectiva alelă activă biologic modulează greutatea corporală a unui animal;	15
c) un analog activ biologic al unei polipeptide cu SECV. ID NR. 2, 4, 5 sau 6, în care numitul analog activ biologic modulează greutatea corporală a unui animal; și	17
d) un fragment activ biologic al oricărei polipeptide (a), (b) sau (c) în care numitul fragment activ biologic modulează greutatea corporală a unui animal.	19

1 Analogul polipeptidei conform invenției înlătură dezavantajele menționate prin aceea
că este un analog al polipeptidei *ob* umane cu SECV. ID NR.: 4, în care unul sau mai mulți
3 amino acizi aleși din grupul format din amino acizii 53, 71, 85, 89, 92, 98, 110, 118, 121, 122,
126, 127, 128, 129, 132, 139, 157, 159, 163 și 188 este substituit cu un alt aminoacid.

5 Derivatul conform invenției înlătură dezavantajele menționate prin aceea că are unul
sau mai multe fragmente chimice atașate acesteia, în care fragmentul chimic este un polimer
7 solubil în apă, polimerul solubil în apă este polietilen glicol care este *mono-*, *di-*, *tri-* sau tetra-
pegilat sau N-terminal monopegilat.

9 Molecula izolată de acid nucleic, care codifică a polipeptidă *ob* conform invenției, înlă-
tură dezavantajele menționate prin aceea că are activitatea biologică de modulare a greutateii
11 corporale a unui mamifer, ADN-ul fiind ales din grupul format din:

a) molecule ADN din SECV. ID NR.: 1 și 3 sau fragmente ale acestora;

13 b) molecule ADN care hibridizează în condiții stricte la molecule ADN definite în (a)
sau fragmente hibridizabile ale acestora care hibridizează în condiții stricte; și

15 c) molecule ADN care codifică o exprimare pentru secvența de aminoacizi codificată
de oricare dintre moleculele ADN anterioare.

17 Oligonucleotida primer, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate prin
aceea că are o lungime de cel puțin 20 de nucleotide pentru amplificarea ADN genomic
19 uman, care codifică o polipeptidă *ob* definită în oricare dintre revendicările 1 la 19.

Vectorul conform invenției înlătură dezavantajele menționate prin aceea că conține
21 o moleculă ADN conformă cu oricare dintre revendicările 27 la 33, asociată operativ cu o
secvență de control al exprimării.

23 Procedul de preparare a unei polipeptide *ob* conform invenției înlătură dezavantajele
menționate prin aceea că acesta cuprinde:

25 (a) cultivarea unei celule transfectate sau transformate cu o moleculă de ADN definită
în revendicarea 29, în condiții care asigură exprimarea polipeptidei *ob*;

27 (b) recuperarea polipeptidei *ob* exprimate;

(c) izolarea selectivă a polipeptidei *ob* prin purificare de afinitate sau schimb ionic;

29 (d) purificarea poliproteinei *ob* prin filtrare pe gel.

Anticorpul specific pentru o polipeptidă *ob*, conform invenției, înlătură dezavantajele
31 menționate prin aceea că este definit în oricare dintre revendicările 1 la 19 sau este obținut
printr-un procedeu conform revendicărilor 39 și 40.

33 Compoziția farmaceutică conform invenției înlătură dezavantajele menționate prin
aceea că aceasta conține o polipeptidă *ob* definită în oricare dintre revendicările 1 până la
35 19 și un purtător acceptabil farmaceutic.

Utilizarea unei polipeptide este definită în oricare dintre revendicările 1 până la 19
37 pentru fabricarea unui medicament pentru modificarea greutateii corporale a unui animal.

Conform prezentei invenții, problema controlului adipozității și conținutului de grăsimi
39 la animale, în special la mamifere, a fost rezolvată prin aceea că au fost prevăzute molecule
de acid nucleic și polipeptide de obezitate (*ob*), așa cum s-a descris în această invenție.
41 Invenția de față prezintă în primul rând polipeptidele izolate, utilizate pentru modularea, de
exemplu, pentru controlul și reglarea greutateii corporale și a adipozității, ca și secvențele de
43 acizi nucleici conținute în aceste polipeptide care nu numai că permit producerea recombi-
nantă a polipeptidelor *ob*, dar ele însele sunt utilizate pentru modularea greutateii corporale.

45 Polipeptidele (*ob*) pentru obezitate, conform prezentei invenții, au aproximativ 145
până la aproximativ 167 de aminoacizi, fiind capabile de modularea greutateii corporale la ani-
male, în special la mamifere și includ variantele alele sau analogii acestora, incluzând frag-
47 mente și având astfel aceeași activitate biologică. Polipeptidele pot fi preparate prin metode

RO 121036 B1

recombinante sau prin metode chimice sintetice. Polipeptidele *ob* preferate în prezent, includ pe cele având o secvență de aminoacid SECV ID Nr. 2, 4, 5 sau 6 sau variantele alele sau analogii acestora, incluzând fragmentele acestora.

Fragmentele imunogene ale polipeptidelor *ob* conform prezentei invenții, includ: Val-Pro-Ile-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr (SECV. ID Nr. 18); Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala (SECV. ID Nr.19); Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp (SECV. ID Nr.20); și Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys (SECV. ID Nr. 21). Analogii polipeptidei umane *ob* includ acele polipeptide care au secvențele umane de aminoacizi de SECV. ID Nr. 4 și 6, în care unul sau mai mulți aminoacizi 53, 56, 71, 85, 89, 92, 95, 98, 110, 118, 121, 122, 126, 127, 128, 129, 132, 139, 157, 159, 163 și 166 (potrivit numerotării SECV. ID Nr. 4) este substituit cu un alt aminoacid, cum ar fi aminoacidul divergent al polipeptidei *ob* la șoarece, potrivit SECV. ID Nr. 2 sau alaninei. Astfel de compuși analogi includ acei compuși în care: (a) reziduul de serină în poziția 53 este substituit cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină; (b) reziduul de serină în poziția 98 este substituit cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină și (c) reziduul de arginină în poziția numărul 92 este substituit cu asparagină, lizină, histidină, glutamină, acid glutamic, acid aspartic, serină, treonină, metionina sau cisteină. Analogul polipeptidei *ob* conform prezentei invenții are de preferință 83 de procente sau mai mult de omologie a secvenței de amino acizi față de polipeptida umană *ob* ca secvență de aminoacizi conform SECV. ID Nr. 2, 4, 5 sau 6.

În mod suplimentar, analogii polipeptidei umane *ob* conform prezentei invenții au secvența de aminoacizi SECV. ID Nr. 4 și 6 (a) unul sau mai multe reziduuri de acid aspartic substituite cu acid glutamic; (b) unul sau mai multe reziduuri de izoleucină substituite cu leucină; (c) unul sau mai multe reziduuri de glicină, sau valină substituite cu alanină; (d) unul sau mai multe reziduuri de arginină substituite cu histidină; (e) unul sau mai multe reziduuri de tirozină sau fenilalanină substituite cu triptofan (f) unul sau mai multe reziduuri 121 până la 128 (conform numerotării SECV. ID Nr.4) substituite cu glicină sau alanină și (g) unul sau mai multe reziduuri în poziția 54 până la 60 sau 118 până la 166 (conform numerotării SECV. ID Nr.4) substituite cu lizină, acid glutamic, cisteină sau prolină.

Analogii polipeptidei umane *ob* reduse, preferate în prezent, conform prezentei invenții, includ acele polipeptide în care (conform numerotării SECV. ID Nr. 4): (a) unul sau mai multe reziduuri la pozițiile 121 până la 128 sunt deletate; (b) reziduurile 1-116 sunt deletate; (c) reziduurile 1-21 și 54 până la 167 sunt deletate; (d) reziduurile 1-60 și 117 până la 167 sunt deletate; (e) reziduurile 1-60 sunt deletate; (f) reziduurile 1-53 sunt deletate și (g) un analog al subpărții (a) în care reziduurile 1-21 sunt deletate. Polipeptidele *ob* și analogii polipeptidei *ob* conform prezentei invenții ce au lipsă secvența "semnal" 21 de aminoacizi (de exemplu aminoacizii de la 1 la 21 ai SECV. ID Nr.4) pot avea o secvență de aminoacid sau aminoacid N-terminal, cum ar fi de exemplu (1) metionina, (2) o secvență glicină-serină-histidină-metionină (SECV. ID Nr. 38), (3) o secvență de metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SECV. ID Nr. 98), (4) o secvență de leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SECV. ID Nr. 26), (5) o secvență de acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SECV. ID nr. 27), (6) o secvență de leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SECV. ID Nr. 28); (7) o secvență de metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SECV. ID Nr.99) și (8) o secvență de glicina-serină-prolină. Derivații polipeptidei *ob* conform prezentei invenții au una

sau mai multe porțiuni chimice atașate la acestea, incluzând polimeri solubili în apă, cum ar fi polietilen glicolul. Derivații de polietilen glicol pot fi monopegilați, dipegilați, tripegilați sau tetrapegilați, de exemplu monopegilat N-terminal. Derivații monopegilați N-terminal preferați ai acestor polipeptide conform invenției, includ polipeptidele OB cuprinzând reziduurile de aminoacizi 22 până la 167 ale SECV. ID Nr. 4 sau reziduurile 22 până la 166 ale SECV. ID Nr. 6, având opțional o metionină (pegilată) în poziția 21. Molecula de acid nucleic izolat, prevăzută de prezenta invenție, cuprinde polipeptida *ob*, varianta alelă sau alți compuși analogi, incluzând fragmente, așa cum s-a descris mai sus. În mod specific se prevăd moleculele de acid dezoxiribonucleic ADN pentru utilizare în exprimarea de siguranță a polipeptidei *ob*, având o activitate biologică de modulare a greutateii corporale la mamifere și se selectează dintr-o grupă care constă din: (a) molecule de ADN conform SECV. ID Nr. 1 și 3 sau fragmentele acestora; (b) molecule de ADN care hibridizează moleculele de ADN definite în (a) sau fragmentele hibridizabile ale acestora și (c) molecule de ADN care codifică exprimarea pentru secvența de aminoacizi cuprinsă în oricare dintre moleculele de ADN amintite mai înainte. Dintre aceste molecule, ilustrativă este molecula ADN genomică umană conform SECV. ID Nr. 22 și 24. Moleculele ADN preferate conform invenției cuprind o polipeptida având o secvență de aminoacid conform (a) SECV. ID Nr. 2; (b) aminoacizii 22 până la 167 din SECV. ID Nr. 2; (c) SECV. ID Nr. 4; (d) aminoacizii 20 până la 167 din SECV. ID Nr. 4; (e) SECV. ID Nr. 5 (f) aminoacizii 22 până la 166 din SECV. ID Nr. 5 și (g) SECV. ID Nr. 6 și (h) aminoacizii 32 până la 166 din SECV. ID Nr. 6, ca și polipeptidele care au o secvență de aminoacid sau aminoacid N-terminal, așa cum s-a menționat mai înainte. Ilustrativ, o moleculă, preferată, de DBA are secvența menționată în proteina care codifică secvența SECV. ID Nr. 3 și în special are secvența menționată în secvența care codifică aminoacizii 22 până la 167.

Moleculele de acid nucleic marcat, detectabil, hibridizabil la molecula de ADN conform prezentei invenții sunt, de asemenea, prevăzute și acestea includ moleculele de acid nucleic hibridizabile la o zonă a acidului nucleic OB care nu este codificată, această zonă fiind selectată dintr-o grupă care constă dintr-un intron, o zonă necodificată 5' și o zonă necodificată 3'. Prezenta invenție, de asemenea, mai prevede primerii oligonucleotidelor pentru amplificarea ADN genomic uman, care cuprinde o polipeptidă cum ar fi oligonucleotidele conform SECV. ID Nr. 29 până la 32.

Vectorii prevăzuți de prezenta descriere de invenție cuprind o moleculă de ADN conform prezentei invenții, așa cum s-a descris mai sus și, de preferință, aceștia au forma unui vector de exprimare care cuprinde molecula de ADN asociată operativ cu secvența de control al exprimării vectorului. Celulele gazdă unicelulare, conform prezentei invenții, sunt transformate sau transfectate cu moleculele de ADN conform prezentei invenții sau cu vectorul descris mai sus. Celulele gazdă preferate includ bacterii, drojdii, celule de mamifere, celule de plante, celule de insecte și celule umane, în cultură de țesuturi, ilustrativ, astfel de celule gazdă sunt selectate dintr-o grupă care constă din *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, drojdie, CHO, R1, 1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSCI, BSC40, M MT10 și Sf9 ca celule. Drojdia gazdă preferată în prezent, include: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* și *Torulopsis*. Se mai prevăd, de asemenea, celule de mamifere conținând polipeptidă *ob* cuprinzând secvența de ADN și care este modificată *in vitro* pentru a permite o exprimare superioară a polipeptidei, cu ajutorul unui caz recombinational omolog, care constă din inserția unei secvențe de reglare a exprimării, în funcție de proximitatea funcțională la secvența care cuprinde polipeptidă. Secvența ce reglează exprimarea poate fi o exprimare a polipeptidei *ob* sau nu și poate înlocui un mutant al secvenței de reglare a polipeptidei în celulă.

RO 121036 B1

Prezenta invenție prevede, de asemenea, metode de preparare a polipeptidei *ob*: (a) cuprinzând celule de cultură așa cum s-a descris mai sus în condițiile în care este prevăzută exprimarea polipeptidei *ob* și (b) redobândirea polipeptidei *ob* exprimate. Acest procedeu poate fi, de asemenea, însoțit de fazele: (c) cromatografierea polipeptidei pe coloana de che-lare cu Ni și (d) purificarea polipeptidei prin gel filtrare. Într-un aspect preferat, după faza (c) și înainte de faza (d), metoda include cromatografierea polipeptidei *ob* pe coloana cu schim-bători de ioni puternici.

Prezenta invenție prevede așadar anticorpi specifici monoclonali și policlonali marcați și nemarcați, pentru polipeptidele *ob* conform prezentei invenții și linii celulare durabile care produc anticorpii monoclonali conform prezentei invenții. Prepararea anticorpului conform prezentei invenții, cuprinde: (a) conjugarea polipeptidei *ob* la o proteină suport; (b) imuni-zarea animalului gazdă cu un fragment de polipeptidă *ob* conjugat cu proteina suport în faza (a) în amestec cu un adjuvant și (c) obținerea anticorpului de la animalul gazdă imunizat.

Prezenta invenție prevede, de asemenea, metode de măsurare a prezenței polipep-tidei *ob* în probă, cuprinzând: (a) contactarea probei suspectată de conținutul în polipeptidă *ob* cu un anticorp (de preferință legat la un suport solid) care se leagă specific la polipeptidă *ob* în condițiile în care se permite formarea complexilor de reacție cuprinzând un anticorp și polipeptidă *ob* și (b) detectarea formării reacției complexilor cuprinzând un anticorp și polipeptidă *ob* în probă, iar detectarea, în această probă, a formării reacției complexilor, indică prezența polipeptidei *ob* în acea probă. În mod corespunzător se prevăd *in vitro*, meto-dele pentru evaluarea nivelului polipeptidei *ob* în proba biologică, cuprinzând: (a) detectarea formării complexilor de reacție în proba biologică, conform metodei menționate mai sus și (b) evaluarea cantității complexilor de reacție formați, a căror cantitate în complexii de reacție corespunde nivelului polipeptidei *ob* în proba biologică. Când detectarea sau diag-nosticarea prezenței maladiei asociate cu nivele ridicate sau scăzute de polipeptide *ob* con-form prezentei invenții are loc, se efectuează o evaluare ca mai sus și nivelul detectat este comparat cu nivelul polipeptidei *ob* prezente la subiecții normali sau la acel subiect, înainte de detectare. O creștere a nivelului de polipeptide *ob* se compară cu nivelele normale sau nivelele dinaintea efectuării testului, o maladie asociată cu nivele ridicate de polipeptide *ob* și nivelul scăzut de polipeptide *ob* se compară cu nivelele normale, ceea ce indică o maladie asociată cu nivelele scăzute de polipeptide *ob*. În mod corespunzător, se prevăd metodele *in vitro* pentru monitorizarea tratamentului terapeutic al maladiei asociate cu nivele scăzute sau crescute de polipeptide *ob* la subiectul mamifer, cuprinzând evaluarea, așa cum s-a des-cris mai sus, a nivelelor polipeptidei *ob* în serii de probe biologice la diferite momente în care subiectul mamifer este supus la acest tratament terapeutic .

Compozițiile farmaceutice conform prezentei invenții cuprind polipeptida *ob* descrisă mai sus, la un loc cu un purtător acceptabil farmaceutic și se utilizează în metodele terapeu-tice pentru reducerea greutateii corporale la un animal. Compoziții farmaceutice suplimentare, conform prezentei invenții, pentru utilizare în metode terapeutice pentru creșterea greutateii corporale a unui animal, cuprind un antagonist al polipeptidei *ob*, de preferință selectat dintr-o grupă care constă dintr-un anticorp care se leagă la polipeptida *ob* și care neutralizează activitatea polipeptidei *ob*, un fragment de polipeptidă care se leagă la receptorul polipeptidei *ob*, dar care nu activează receptorul polipeptidei *ob* și o moleculă mică de antagonist al poli-peptidei *ob*. Prezenta invenție mai prevede compoziții cosmetice care îmbunătățesc aspectul corpului, corespunzător, prin reducerea sau creșterea greutateii corporale a unui individ, com-poziții care sunt utilizate în procedeele cosmetice pentru îmbunătățirea aspectului corporal la un individ. Astfel de compoziții cosmetice sunt administrate la un individ într-o cantitate efi-cientă pentru modularea greutateii corporale a acelui individ la nivelul dorit.

De asemenea, prin prezenta invenție se prevede utilizarea moleculelor de acid nucleic, ca și a moleculelor de acid nucleic antisens, hibridizabile la acidul nucleic care cuprinde polipeptidă *ob* conform prezentei invenții, pentru prepararea unui medicament (de exemplu terapia genei) pentru modificarea greutateii corporale la un animal. Se prevede, de asemenea, utilizarea unei polipeptide *ob* sau a unui antagonist al acesteia conform prezentei invenții, pentru prepararea unui medicament utilizat pentru modificarea greutateii corporale la un animal. Medicamentele astfel dezvoltate pot fi utilizate pentru modificarea greutateii corporale a unui mamifer, în tratarea tulburărilor selectate dintr-o grupă care constă din diabet, presiune sânghină ridicată, colesterol ridicat și, de asemenea, ca o parte a terapiei combinate cu un medicament pentru tratarea acestor tulburări. Astfel de medicamente pot fi utilizate în metodele terapeutice, cuprinzând sisteme de eliberare intravenoase, intraarteriale, intraperitoneale, intramusculare, subcutanate, nazale, orale sau pulmonare. Datele prezente aici arată că se stabilește faptul că polipeptidele *ob*, conform prezentei invenții, în forma lor, sunt secretate în primul rând de la mamifere adipocite și că polipeptidele funcționează ca hormoni.

Exemplele descrise aici demonstrează că polipeptida *ob*, denumită alternativ aici "leptină", circulă în plasma de șoareci, șobolani și în plasma umană. Leptina este absentă în plasma de șoarece *ob/ob* și este prezentă în concentrații de zece ori mai mari în plasma de șoarece *db/db* și concentrații de douăzeci de ori mai mari se găsesc la șobolani *fa/fa*. Mult mai semnificativ, injecțiile zilnice de leptină recombinantă, reduc dramatic masa corporală la șoarece *ob/ob* afectează semnificativ greutatea corporală la șoarecele de tip sălbatic și nu are nici un efect asupra șoarecelui *db/db*. Potrivit unui alt aspect, polipeptida dintr-o specie este biologic activă într-o altă specie. În special, polipeptida umană *OB* este activă la șoareci.

Într-un prim exemplu, modulatorii prezentei invenții cuprind molecule de acid nucleic, incluzând moleculele de ADN recombinant (de exemplu, ADNc sau un vector conținând ADNc sau ADN genomic izolat) sau genele clonate (de exemplu, ADN genomic izolat) sau variante de degenerare ai acestora, care cuprind polipeptidele însăși care servesc ca modulatori de control a greutateii, așa cum s-a definit mai înainte sau variante conservate sau fragmentele acestora, în special astfel de fragmente ca au absentă peptidă de semnalizare (alternativ se face referire aici la polipeptida *ob* matură), polipeptide care posedă secvențe de aminoacizi conform fig. 1A până la E (SECV. 1D Nr. 2), fig. 3 (SECV. ID Nr. 4), fig. 5 (SECV. ID Nr. 5) și fig. 6 (SECV. ID Nr. 6). Conform unor aspecte specifice, secvențele de aminoacizi pentru două variante murinice și umane ale polipeptidei *ob* sunt, de asemenea, prevăzute. Ambele polipeptide sunt găsite într-o formă cu glutamina 49 deletată, ceea ce rezultă dintr-o legătură anormală a ARNm. Polipeptidele *ob* din diferite specii pot fi superior omoloage așa cum s-a arătat în fig. 4, polipeptidele murinice și umane *ob* sunt superior omoloage, peste 80%.

Moleculele de acid nucleic, moleculele de ADN recombinant sau genele clonate, pot avea secvențe de nucleotide sau pot fi complementare secvențelor codificate de ADN arătate în fig. 1A până la E (SECV. ID Nr. 1) și fig. 2A și B (SECV. ID Nr. 3). În special, astfel de molecule ADN, pot fi ADNc sau ADN genomic izolat din cromozom. Moleculele de acid nucleic conform prezentei invenții pot corespunde așadar secvențelor flancate 5' și 3' ale ADN-ului și la secvențele de ADN intronic. În consecință, prezenta invenție se referă așadar la identificarea acidului nucleic având o secvență de nucleotidă selectată dintre secvențele din fig. 1A până la E (SECV. ID Nr. 1) și fig. 2A și B (SECV. ID Nr. 3) și variante de degenerare, variante alele și din alte molecule asemănătoare acestora.

RO 121036 B1

Molecula de acid nucleic conform prezentei invenții, poate fi ADN sau ARN, incluzând variante sintetice ai acestor acizi având grupări fosfat sau analogi de fosfat, de exemplu, tiofosfat sub formă de legături chimice. Se examinează aici, de asemenea, secvențele simplu răsucite și dublu răsucite.

Prezenta invenție prevede mai departe molecule de acid nucleic pentru utilizare ca probe moleculare sau ca primeri pentru amplificare prin reacția în lanț a polimerazei (PCR), de exemplu, oligonucleotidele sintetice sau naturale având o secvență corespunzătoare unei porțiuni a secvențelor din fig. 1A până la E (SECV. ID Nr.1), fig. 2A și B (SECV. ID Nr. 3) și fig. 20A până la G (SECV. ID Nr.22 și 24) sau secvențele flancate 5' și 3' ale secvențelor codificate sau secvențele intronice ale ADN genomic. În special, invenția examinează molecula de acid nucleic având cel puțin aproximativ 10 nucleotide în care o secvență a moleculei de acid nucleic corespunde unei secvențe de nucleotide având același număr de nucleotide ca în fig. 1A până la E (SECV. ID Nr. 1), fig. 2A și B (SECV. ID Nr. 3) și fig. 20A până la C (SECV. ID Nr. 22) sau o secvență complementară a acestora. Mult mai preferabil, secvența de acid nucleic a moleculei are cel puțin 15 nucleotide. Mult mai preferabil, secvența de acid nucleic are cel puțin 20 de nucleotide. Potrivit unui aspect al prezentei invenții în care oligonucleotida este o probă, oligonucleotida este marcată detectabil, de exemplu cu o radionucleotida (cum ar fi ^{32}P) sau o enzimă.

Potrivit unui alt aspect, prezenta invenție prevede un vector de clonare, care cuprinde acizii nucleici ai prezentei invenții care conțin polipeptida *ob* și un vector de exprimare, de la bacterii, insecte sau mamifere, care cuprind molecule de acid nucleic conform prezentei invenții, cuprinzând polipeptide *ob* asociate operativ cu secvența de control al exprimării. Așadar, invenția relatează mai departe despre celulele gazdă cum ar fi celule de bacterii, celule din drojdie, celule de la insecte sau celule de la mamifere, transfectate sau transformate cu un vector de exprimare corespunzător și, în consecință, pentru utilizarea elementelor menționate mai sus la prepararea modulatorilor prezentei invenții.

Conform unui alt aspect al prezentei invenții, se face referire la anticorpii care se leagă la polipeptida *ob*. Astfel de anticorpi pot fi generați în raport cu polipeptida cu lungime completă sau cu fragmentele antigenice ale acesteia. De asemenea, potrivit unui alt aspect, astfel de anticorpi inhibă activitatea funcțională (de exemplu, greutatea corporală modulată, ca și compoziția grăsimilor) a polipeptidei *ob*. Potrivit unui alt aspect, anticorpii pot fi utilizați pentru determinarea nivelului de circulație a polipeptidei *ob* în plasmă sau ser. Conform unui alt aspect anticorpii cu zone specifice, în special anticorpii monoclonali, pot fi utilizați ca probe ale structurii polipeptidei *ob*.

Toate materialele menționate mai sus trebuie considerate aici ca modulatori ai greutății corporale ai compoziției grăsimilor și astfel pot fi utilizate în diverse de situații. În mod specific, invenția examinează atât aplicațiile de diagnostic, cât și cele terapeutice, ca și anumite aplicații în agricultură, întregul contingent de utilizare ca modulatori definit aici, incluzând atât moleculele de acid nucleic, cât și peptidele. Mai mult decât atât, modularea greutății corporale se realizează prin implicații terapeutice specifice și beneficii, în condițiile în care fie obezitatea sau, în mod opus, cașexia, reprezintă condiții nedorite ale organismului, acestea putând fi remediate prin administrarea unuia sau a mai multor modulatori conform prezentei invenții.

Astfel, o metodă pentru modularea greutății corporale la mamifere, este propusă cuprinzând exprimarea unei proteine conținută de acidul nucleic, având o secvență de nucleotide de la secvența din fig. 1A până la E (SECV. ID Nr.1), secvența din fig. 2A și B (SECV. ID Nr.3) și variantele alele și de degenerare ai acestora. Un astfel de control poate fi efectuat prin introducerea nucleotidelor menționate, prin genoterapie în celulele grase sau

la pacient sau gazdă pentru a controla sau reduce obezitatea. Dimpotrivă, prepararea și administrarea antagoniștilor la nucleotide, cum ar fi moleculele antisens, vor fi indicate și urmărite, de exemplu atunci când condițiile cuprinzând o pierdere excesivă în greutate, cum ar fi anorexia nervoasă, cancerul sau SIDA, sunt prezente și sub tratament. Astfel de elemente vor fi introduse, de o manieră similară prin nucleotide, direct în celulele grase, pentru a se efectua astfel de modificări. În mod corespunzător, proteinele definite prin fig. 1A până la E, 3, 5 și 6 (SECV. ID Nr.1, SECV. ID Nr.4, SECV. ID Nr.5 și SECV. ID Nr.6), variantele conservate, fragmentele active ale acestora și moleculele mici asemănătoare, ar putea fi formulate pentru administrare directă în scopuri terapeutice, pentru efectuarea reducerii sau controlului unei grăsimi corporale excesive sau al unui câștig în greutate excesiv. În mod corespunzător, anticorpii și alți antagoniști ai acestora din materialele proteice menționate, ca și fragmentele acestora, ar putea fi preparate și administrate în mod asemănător, pentru a se obține un efect invers. Astfel, prezenta invenție este dirijată în mod avantajos spre compoziția farmaceutică care cuprinde polipeptida *ob* conform prezentei invenții sau alternativ un antagonist al acesteia, într-un amestec cu un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic. În plus, polipeptida *ob*, conform prezentei invenții, poate fi administrată pentru efectele ei cosmetice, de exemplu, pentru a îmbunătăți aspectul corpului, prin reducerea depozitului de grăsime. Polipeptida *ob* poate fi utilizată independent sau în combinație cu alte strategii cosmetice, de exemplu chirurgia, pentru efectele ei cosmetice. Utilizările de diagnostic ale nucleotidelor prezente și peptidele corespunzătoare, se extind la utilizarea acizilor nucleici pentru identificarea altor mutații ale variantelor alelice ai acestuia, astfel ca să se dezvolte o listă a materialelor de nucleotide active utilizate atât în scop de diagnostic, cât și pentru aplicații terapeutice. În special, atât mutațiile homozigote, cât și cele heterozigote ale nucleotidelor menționate, ar putea fi identificate ca fiind postulate într-o măsură mult mai precisă, condiției pacienților, pentru a determina potențialul de risc al individului, cu privire la obezitate. În mod specific, mutațiile heterozigote sunt în prezent privite ca fiind asociate cu o obezitate moderată, în timp ce mutațiile homozigote vor fi asociate cu o condiție de obezitate severă și mult mai pronunțată. Testarea ADN-ului corespunzător, ar putea fi apoi condusă utilizând materialele menționate mai sus și stabilite ca cote de nivel, astfel ca ele să fie capabile de a fi implicate în modificările prevăzute, fie ca dietă sau alte deprinderi personale sau direct în intervenția terapeutică pentru a evita astfel de condiții. Utilizarea în diagnostic a prezentei invenții se extinde la metodele pentru măsurarea prezenței modulatorilor și a extinderii acestora în probele celulare sau extractele biologice (sau probe) prelevate de la subiecții testați, astfel ca atât acizii nucleici (ADN genomic sau ARNm) și/sau nivelele de proteine în aceste probe de testare ar putea fi stabilite. Dat fiind că activitatea crescută a nucleotidei și prezența proteinei rezultate reflectă capabilitatea subiectului de a inhiba obezitatea; medicul care observă aceste rezultate la subiectul obez ar putea determina că un alt factor decât disfuncția, cu referire la prezența și activitatea nucleotidelor prezentei invenții, este cauza acestei condiții de obezitate. Spre deosebire de aceasta, nivelele scăzute ale nucleotidei și/sau proteinei exprimate ar putea sugera că astfel de nivele pot fi crescute pentru tratarea acestei condiții de obezitate și un regim terapeutic corespunzător ar putea fi implementat. În continuare, nucleotidele descoperite și prezentate în fig. 1A până la E și 2A și B reprezintă ADNc, așa cum s-a menționat pe scurt mai înainte, se utilizează în măsurarea ARN corespunzător. De asemenea, proteina recombinantă ca materie corespunzătoare polipeptidelor din fig. 1A până la E și 3 poate fi preparată și marcată convenabil pentru utilizare, de exemplu, în radioimunoanalize, în scopul măsurării grăsimii și/sau nivelului de plasmă al proteinei OB sau pentru detectarea prezenței și nivelului receptorului *ob* în țesuturi, cum ar fi hipotalamusul. Mai mult, prezenta invenție examinează nu numai identificarea nucleotidelor și proteinelor

RO 121036 B1

corespunzătoare, prezentate aici, dar și elucidarea receptorului la aceste materiale. Într-un astfel de context, polipeptidele din fig. 1A până la E, 3, 5 și/sau 6 ar putea fi preparate și utilizate pentru screeningul de exprimare a unei colecții corespunzătoare, pentru izolarea receptorilor activi. Receptorul ar putea fi apoi clonat, singur sau în combinație cu ligandul și ar putea fi apoi utilizat pentru screeningul moleculelor mici, care posedă o activitate asemănătoare modulatorilor prezentei invenții.

În plus, prezenta invenție se referă la compoziții farmaceutice care includ anumiți modulatori, de preferință polipeptidele ale căror secvențe sunt prezentate în SECV. ID Nr.2, SECV. ID Nr.4, SECV. ID Nr. 5 și SECV. ID Nr.6, anticorpii acestora corespunzători antagoniștilor sau agoniștilor cu molecule mici sau fragmentele preparate în formule pentru o diversitate de moduri de administrare, acolo unde o astfel de terapie este adecvată. Astfel de formule pot include vehicule acceptabile farmaceutic sau alți adjuvanți, atât cât este necesar, și ar putea fi preparați în intervale de dozare eficiente pentru a fi determinate de clinician sau de medic în fiecare caz. Ca urmare, un obiect principal al prezentei invenții este de a prevedea modulatori ai greutateii corporale așa cum s-a definit aici, în formă purificată, care prezintă anumite caracteristici și activități asociate cu controlul și variația adipozității și conținutului de grăsime al mamiferului.

Un alt obiect al prezentei invenții este de a prevedea metodele pentru detectarea și măsurarea modulatorilor pentru controlul greutateii, așa cum s-a menționat aici, ca mijloc de diagnostic eficient și monitorizare a condițiilor patologice în care apare variația nivelului acestor modulatori sau poate fi o trăsătură caracteristică.

Un alt obiect al prezentei invenții este acela de a prevedea o metodă și un sistem de analiză asociat pentru screeningul substanțelor, cum ar fi medicamentele, agenții și altele, care sunt puternic eficienți pentru mimarea sau inhibarea activității modulatorilor prezentei invenții, la mamifere.

Un alt obiect al prezentei invenții se referă la o metodă pentru tratamentul mamiferelor, pentru controlul greutateii corporale și a conținutului de grăsime la mamifere și/sau pentru tratarea anumitor condiții patologice de scădere sau creștere anormală a greutateii corporale, ca o trăsătură caracteristică.

Un alt obiect al prezentei invenții este de a prepara elemente genetice pentru utilizare în protocoale terapeutice genetice și/sau compoziții farmaceutice pentru metode terapeutice comparabile, care cuprind sau au la bază unul sau mai mulți modulatori, parteneri de legătură sau agenți de legătură care pot controla producția acestora sau pot mima sau antagoniza activitățile lor.

Prezenta invenție se referă la elucidarea și găsirea unei proteine denumită aici polipeptidă *ob* sau leptină, acizii nucleici cuprinzând proteina, inclusiv derivații degenerați ale acestora, de exemplu cele care încorporează codoni optimi pentru exprimarea în special a sistemului de exprimare, proteină care demonstrează abilitatea de a participa la controlul greutateii corporale a mamiferelor. Acizii nucleici ca obiect al invenției reprezintă secvențele de codificare care corespund polipeptidului *ob* uman și murinice, care este postulat să joace un rol critic în reglarea greutateii corporale și a adipozității. Datele prezentate aici indică faptul că produsul polipeptidă a acidului nucleic, conform prezentei invenții, este secretat de către celulele care îl exprimă și că funcțiile polipeptidului sunt cele de hormon. Date experimentale adiționale demonstrează că polipeptidă *ob* este foarte eficientă în tratarea obezității la șoarecii care poartă o mutație a genei *ob*. În plus, utilizarea unui bolus cu doze ridicate sau doze moderate continue de polipeptidă *ob* are efect de reducere a greutateii corporale la șoareci normali sau de tip sălbatic.

RO 121036 B1

1 Mai mult, exemplele prezentei invenții arată că polipeptidă denumită alternativ ca
"leptină" circulă în plasma umană, în plasma de șobolani și de șoareci. Leptină este absentă
3 în plasma șoarecilor *ob/ob* și este prezentă în concentrații mai ridicate de zece ori, în plasma
de șoareci *db/db* și în concentrații de douăzeci de ori mai mari în plasma de șobolani *fa/fa*.
5 Mult mai semnificativ, injecțiile zilnice cu leptină recombinantă reduc dramatic masa corpo-
rală la șoareci *ob/ob*, influențează semnificativ greutatea corporală la șoarecii de tip sălbatic
7 și nu are nici un efect asupra șoarecilor *db/db*.

Conform unui alt aspect, polipeptida *ob* de la o specie este biologic activă la altă spe-
9 cie. În special polipeptida *ob* umană este activă la șoareci.

În aspectul primar, prezenta invenție este dirijată către identificarea materialelor care
11 funcționează ca modulatori ai greutății corporale la mamifere. În special, invenția se referă
la izolarea, purificarea și secvențarea anumitor acizi nucleici care corespund genei *ob* sau
13 zonei de codificare a acesteia atât la oameni cât și la șoareci, de asemenea, la polipeptidele
corespunzătoare exprimate prin acizi nucleici. Invenția cuprinde găsirea acizilor nucleici
15 având secvențele de nucleotide menționate în fig. 1A până la E (SECV. ID Nr. 1) și fig. 2A
și B (SECV. ID Nr. 3) și variantele de degenerare, alelele și fragmentele acestora, toate
17 posedând o activitate de modulare a greutății corporale și a adipozității. Corespondența
acizilor nucleici cu gena *ob* prevede impactul lor semnificativ asupra unor condiții cum ar fi
19 obezitatea ca și altor maladii și disfuncții în care anormalitățile greutății corporale sunt facto-
rul contributiv. Prezenta invenție se extinde la proteinele exprimate prin acizii nucleici con-
21 form prezentei invenții și în special la acele proteine prezentate în fig. 1A până la E (SECV.
ID Nr. 2), fig. 3 (SECV. ID Nr. 4), fig. 5 (SECV. ID Nr. 5) și fig. 6 (SECV. ID Nr. 6) ca și
23 variante conservate, fragmentele active și moleculele mici, cognitive așa cum s-a discutat
mai înainte, peptidele modulatorie ale controlului greutății corporale sau partenerii lor de
25 legătură sau alți liganzi sau agenți care prezintă o activitate de mimetism sau antagonism
cu acestea sau cu martorii după producerea acestora, se pot prepara în compoziții farmaceu-
27 tice, cu un purtător adecvat și la un efect puternic, în administrarea prin diferite mijloace, la
pacientul care are o experiență anormală în fluctuațiile greutății corporale sau adipozității,
29 fie ca atare sau ca o parte a stării medicale înrăutățite, cum ar fi cancerul sau SIDA, pentru
tratamentul lor. Pot fi utilizate o diversitate de tehnici de administrare printre care adminis-
31 trarea orală, nazală și alte forme de administrare transmucozală, tehnici parenterale cum ar
fi injecțiile subcutanate, intravenoase și intraperitorieale, cateterizări și altele. Cantitățile
33 medii ale factorilor de recunoaștere sau a subunităților acestora pot varia și în special
acestea se vor baza pe recomandările și prescripția medicului specialist sau a specialistului
35 veterinar. În conformitate cu cele de mai sus, poate fi preparat un sistem de analiză pentru
screeningul medicamentelor posibil eficiente care mimează sau antagonizează această acti-
37 vitate de modulare a greutății corporale. Modulatorul greutății corporale poate fi introdus în
sistemul de testare și medicamentul prospectiv poate fi, de asemenea, introdus în cultura
39 celulară rezultată și cultura este apoi examinată pentru observarea vreunei modificări în
activitatea celulară datorate fie unei adiții numai de medicament prospectiv, fie efectului
41 cantităților de modulator al greutății corporale, adăugate.

Așa cum s-a menționat mai sus, clonarea moleculară a genei *ob* descrisă aici, a con-
43 dus la identificarea unei clase de materiale care funcționează la nivel molecular pentru mo-
dularea greutății corporale la mamifere. Găsirea modulatorilor prezentei invenții are implicații
45 importante pentru diagnoza și tratamentul tulburărilor nutriționale, incluzând, dar fără a se
limita la acestea, obezitatea, pierderea în greutate asociată cu cancerul și tratamentul mala-
47 diilor asociate cu obezitatea, cum ar fi hipertensiunea, bolile de inimă și diabetul de Tipul II.
În plus, există utilizări potențiale în agricultură, pentru produsele genetice, în cazul în care

RO 121036 B1

se dorește modularea greutateii corporale a animalelor domestice. În final, pentru faptul că unul sau mai mulți modulatori ai invenției sunt molecule secretate, aceștia pot fi utilizați biochimic pentru izolarea receptorilor lor utilizând tehnologia de clonare-exprimare.

Așa cum s-a notat mai sus, activitatea funcțională a polipeptidei *ob* poate fi evaluată transgenic. În acest scop poate fi utilizat modelul de șoarece transgenic. Gena *ob* poate fi utilizată în studii complementare, utilizând șoarecele transgenic. Vectorii transgenici, incluzând vectorii virali sau clonele cosmide (sau clonele) corespunzătoare poziției genei candidat la tipul sălbatic, poate fi construit utilizând gena *ob*. Cosmidele pot fi introduse la șoarece, utilizând procedeele publicate (Jaenisch, *Science* 240:1468-1474 (1988)). Elementele de construcție sunt introduse în ouă fertilizate derivate de la descendenți rezultați din încrucișarea între descendentul F1 al *C57BL/6J ob/ob* și X DBA. Aceste încrucișări sunt necesare pentru utilizarea transplantului ovarian *C57BL/6J ob/ob*, pentru generarea animalelor F1. Șoarecele *DBA/2J* se utilizează ca tulpină de măsurare, deoarece acesta are o blană colorată, nonagouti, fapt important când se utilizează transplantul ovarian. Genotipul la poziția *ob* a cosmidului animalelor transgenice, poate fi determinate soiurile de animale cu legături slabe de RFLP-uri sau microsateliți care flanchează mutația și care sunt polimorfici între tulpinile descendenților. Complementarea este demonstrată atunci când elementul de construcție special atribuie o obezitate genetică F2 animalului slab 4: așa cum s-a dovedit prin analiza RFLP) și nediabetic. În aceste circumstanțe, analiza finală pentru complementare va cere ca, animalul *ob/ob* sau *db/db* care poartă transgena, să fie conjugat la transplantul ovarian *ob/ob* sau *db/db*. În această încrucișare, toate animalele N2 care nu poartă transgena vor fi slabe și au concentrații normale de glucoza și insulina în plasmă. Într-un sens genetic, transgena acționează ca un supresor de mutație.

În mod alternativ, genele *ob* pot fi testate prin examinarea efectelor lor fenotipice, când sunt exprimate ca orientare antisens la animalele de tip sălbatic. În această privință, exprimarea alelelor de tip sălbatic este suprimată și astfel se ajunge la un fenotip mutant. Forma duplex de ARN-ARN (sens-antisens) previne manipularea normală a ARNm care are ca rezultat eliminarea parțială sau completă a efectului genei de tip sălbatic. Această tehnică a fost utilizată pentru a inhiba sinteza TK în cultura de țesuturi și de a produce fenotipurile de mutație Kruppel în *Drosophila* și mutație Shiverer la șoarecele de experiență (Izant și colab. *Jeli*, 36:1007-1015 (1984); Green și colab., *Annu. Rev.Biochem.* 55:569-597 (1986); Katusuki și colab. *Science*, 241: 595-595 (1988). Un important avantaj al acestei tehnici este că, numai o porțiune redusă de genă este necesară a fi exprimată pentru inhibarea efectivă a exprimării întregului ARNm cognitiv. Transgena antisens va fi plasată sub controlul propriului promotor sau a altui promotor exprimat în tipul de celule, corect și această plasare este la porțiunea superioară a *SV40 poli A*. Această genă va fi utilizată pentru transformarea transgenică la șoarece. Șoarece transgenic va fi așadar conjugat cu transplantul ovarian pentru testarea modului în care heterozigoții *ob* sunt mai sensibili pentru efectele elementelor de construcție antisens. Pe termen lung, elucidarea funcției biochimice a produsului genei *ob* (polipeptida *ob* sau proteina) este utilă pentru identificarea agoniștilor cu molecule mici și a antagoniștilor cu molecule mici care le influențează activitatea.

În continuare, sunt utilizați diferiți termeni în întreaga descriere având semnificațiile menționate. Termenul de "modulator al greutateii corporale", "modulator", "modulatori" și orice variantă care nu este specificată în tabel, poate fi utilizată aici fără a schimba sensul, așa cum se utilizează în întreaga descriere și în revendicări. Se face referire, de exemplu, la ambele nucleotide și la materialul proteic acesta din urmă incluzând atât proteinele simple, cât și cele multiple. Mai specific, termenii menționați mai sus se extind la nucleotide și la acidul dezoxiribonucleic ADN având secvențele descrise aici și prezentate în fig. 1A până la E

(SECV. ID Nr. 1) și fig. 2A și B (SECV. ID Nr. 3). De asemenea, proteinele având secvența de aminoacizi conform datelor descrise și prezentate în fig. 1A până la E (SECV. ID Nr. 2) și fig. 3 (SECV. ID Nr. 4) sunt în mod asemănător studiate, ca și profilul activității menționate cu referire la toate materiale incluse în descriere și în revendicări. În acest sens, nucleotidele care prezintă o activitate substanțial echivalentă sau modificată, sunt în mod asemănător studiate, incluzând analogi, omologi substanțiali și variatele alele. În mod asemănător, proteinele prezintă o activitate echivalentă sau substanțial modificată, incluzând proteinele modificate deliberat, ca de exemplu, prin mutageneza direcționată pe porțiuni sau accidental, prin mutații în organismul gazdă care produce modulatori, sunt la fel studiate.

O compoziție cuprinzând "A" (în care "A" este o proteină simplă, o moleculă ADN, un vector, o celulă gazdă recombinantă etc), este substanțial liberă de "B" (unde "B" cuprinde una sau mai multe proteine de contaminare, molecule ADN, vectori etc, dar se exclud formele racemice pentru A), când sunt cel puțin aproximativ 75 % în greutate din proteine, ADN, vectori (dependent de categoria speciei la care aparțin A și B) în compoziția "A". De preferință, "A" cuprinde aproximativ cel puțin 90%, în greutate, din speciile A+B din compoziție, mult mai preferabil cel puțin aproximativ 99% în greutate. Se preferă de asemenea, ca compoziția care este substanțial liberă de contaminare, conținând numai o singură specie de greutate moleculară, având activitatea sau caracteristica speciei de interes.

Polipeptidele ob. Termenii de "proteină", care se referă la polipeptide produse natural și de "polipeptidă" utilizați aici interschimbabil referitori la produsul genetic ob și la varianții lor, termenul de "proteină matură" sau "polipeptidă matură", se referă în special la produsul genetic ob cu secvența semnal recuperată (sau un partener proteic de fuziune).

Așa cum este notat mai sus, în aspectele specifice ale polipeptidelor conform prezentei invenții, se includ cele care au secvențele de aminoacizi menționate aici, de exemplu SECV. ID Nr. 2, 4, 5 și 6 etc., incluzând polipeptida ob modificată cu substituțiile de aminoacid conservate, ca și fragmentele biologic active, analogi și derivații acestora. Termenul de "biologic activ" este utilizat aici cu referire la efectul specific al polipeptidei, incluzând, fără a se limita la aceasta, legătura specifică, de exemplu la un receptor, anticorp sau alte molecule recunoscute; activarea modului transductor de semnal la nivel molecular și/sau inducerea (sau inhibarea de către antagoniști) a efectelor fiziologice mediate de polipeptida ob nativă, *in vivo*. Polipeptidele ob, incluzând fragmente, analogi și derivații acestora, pot fi preparate sintetic, de exemplu utilizând tehnici bine cunoscute ale fazei solide sau fazei de soluție în care se efectuează sinteza peptidei. De preferință, faza sintetică solidă este utilizată în aceste tehnici. Alternativ, polipeptidele ob ale prezentei invenții, pot fi preparate utilizând tehnici de inginerie genetică bine cunoscute, descrise aici. Într-un alt aspect, polipeptida ob poate fi purificată, de exemplu, prin purificare de imunoafinitate din fluidul biologic, cum ar fi, dar nelimitându-se la, plasmă, ser sau urină, de preferință plasma umană, serul sau urina și mult mai preferabil de la un subiect cu o supraexprimare a polipeptidei, ca de exemplu o persoană obeză suferind de o mutație a receptorului ob sau de obezitate legată de o mutație corespunzătoare persoanelor "grase".

Fragmente de polipeptidă ob. Într-o întruchipare specială, prezenta invenție studiază fragmentele produse natural, ale polipeptidei ob care pot fi importante. Secvența de peptidă include un număr de porțiuni care sunt frecvent ținta pentru clivajul proteolitic, de exemplu, reziduurile de arginină. Este posibil ca polipeptida cu lungime completă poată fi clivată la una sau mai multe porțiuni, pentru a se forma fragmente active biologic. Astfel de fragmente biologic active pot fi agoniști sau antagoniști ai activității funcționale a polipeptidei ob pentru reducerea greutății corporale.

RO 121036 B1

Analogii polipeptidei ob. Prezenta invenție studiază în mod specific prepararea analogilor peptidei *ob*, care se caracterizează ca fiind capabili de o activitate biologică a polipeptidei *ob*, de exemplu de legare la un partener de legătură specifică a peptidei, cum ar fi, de exemplu, receptorul *ob*. Într-un aspect al invenției, analogul agonizează activitatea *ob*, de exemplu, funcțiile similare ale acestuia cu cele ale peptidei *ob*. De preferință, agonistul *ob* este mult mai eficient decât proteina nativă. De exemplu, analogul agonist *ob* se poate lega la receptorul *ob* cu afinitate superioară sau să demonstreze un timp de înjumătățire mai mare *in vivo* sau ambele. Cu toate acestea, analogii agoniştilor peptidei *ob* care sunt mai puțin eficienți decât proteina nativă sunt, de asemenea, studiați. Într-un alt aspect, analogul antagonizează activitatea *ob*. De exemplu, un analog *ob* care se leagă la receptorul *ob*, dar care nu induce transducția semnalului, poate inhiba competitiv legătura *ob* nativ la receptor, descrescând astfel activitatea *ob in vivo*. Astfel de analogi antagonişti *ob* pot să demonstreze, de asemenea, proprietăți diferite de peptida *ob*, de exemplu un timp de înjumătățire mai lung (sau mai scurt) *in vivo*, o afinitate de legare mai mare (sau mai mică) pentru receptorul *ob* sau ambele.

Într-un aspect al prezentei invenții, un analog al peptidei *ob* este peptida *ob* modificată prin substituirea aminoacizilor la poziția de pe polipeptidă care nu este esențială ca structură sau ca funcție. De exemplu, deoarece este cunoscut că peptida *ob* umană este biologic activă la șoareci, substituirea reziduurilor divergente de aminoacizi în secvența umană, așa cum se compară cu secvența de aminoacid murinic, va produce asemănător, analogi folositori ai peptidei *ob*. De exemplu, reziduul de serină la poziția 53 sau la poziția 98 sau ambele (în secvența peptidei neprelucrate prezentă în fig. 4) de la oameni, poate fi substituit, de exemplu, cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină. În mod similar, reziduul de arginină la poziția numărul 92 (fig. 4), poate fi substituit, de exemplu cu asparagină, lizină, histidină, glutamină, acid glutamic, acid aspartic, serină, treonină, metionină sau cisteină

Cu referire încă la fig. 4, alți aminoacizi în peptida *ob* umană care par a fi capabili de substituie sunt histidina la poziția 118, triptofanul la poziția 121, alanina la poziția 122, acidul glutamic la poziția 126, treonina la poziția 127, leucina la poziția 128, glicina la poziția 132, glicina la poziția 139, triptofanul la poziția 159 și glicina la poziția 166. Într-un alt aspect, este posibil să se substituie unul sau mai multe reziduuri 121 sau 128 (așa cum s-a prezentat în fig. 4), de exemplu cu glicine sau alanine sau substituind unele reziduuri cu excepția serinei la poziția 123 sau a leucinei la poziția 125. Într-un alt aspect, un analog al polipeptidei *ob*, de preferință polipeptida umană *ob* este o formă redusă a polipeptidei. De exemplu, s-a demonstrat deja că glutamina la reziduul 49 nu este esențială și poate fi anulată de la peptidă. În mod similar, este posibil de a deleta câțiva sau toate reziduurile de aminoacizi de la pozițiile 121-128. În plus, invenția studiază obținerea unui analog *ob* având secvența minimă de aminoacizi necesară pentru activitatea biologică. Aceasta poate fi cu adevărat determinată, de exemplu prin testarea activității fragmentelor de *ob* pentru abilitatea de a se lega la anticorpii specifici *ob*, cu inhibarea activității polipeptidei *ob* native sau agonizarea activității peptidei *ob* native. Într-un aspect, prezenta invenție se referă la polipeptida *ob* redusă, constând dintr-o structură în lanț formată de legăturile disulfurice care se formează între reziduurile de cisteină 117 și 167 (așa cum este prezentat în fig. 4). Într-un alt aspect, analogul redus corespunde la aminoacizii din reziduul 22 (care urmează porțiunii de clivaj a peptidei semnal putative) la 53 (reziduul de aminoacid care precede imediat regiunea flexibilă în formă de lanț, detectată cu proteoliza limitată, urmată de analiza spectrometrică de masă a polipeptidei *ob*; vezi Cohen și colab., *Protein Science* 4: 1088 (1995)). Într-un alt mod, analogul redus corespunde la aminoacizii din reziduul 61 (reziduul care urmează imediat zonei

flexibile în formă de lanț, așa cum s-a detectat prin analiza spectroscopică de masă și prin proteoliza limitată a polipeptidei *ob*) la reziduul de aminoacizi 116 (reziduul care precede imediat, primul reziduu de cisteină). Într-un alt aspect, analogul redus corespunzător aminoacizilor din reziduul 61 la reziduul 167 de aminoacizi. Mai mult decât atât, unul sau mai multe reziduuri ale zonei în lanțuri flexibile, putative, numărul 54 până la numărul 60, sunt substituite. De exemplu, unul sau mai multe reziduuri pot fi substituite cu lizină, acid glutamic sau cisteină (de preferință lizină) prin legătură încrucișată, de exemplu cu un polimer, deoarece sunt preferate structurile flexibile în lanț pentru derivarea proteinei. În mod alternativ, reziduurile la pozițiile flexibile în formă de lanț pot fi substituite cu reziduuri de aminoacizi care sunt mult mai rezistenți la proteoliză, dar care rețin în structura flexibilă una sau mai multe proline.

Într-un alt aspect, sunt prezentate substituțiile cu reziduuri de aminoacizi care pot fi în derivate astfel încât să le facă mai rezistente la degradare, de exemplu la. Se apreciază specialitate că fragmentele precedente au dimensiuni aproximative și că pot fi adăugați sau deleteți unul până la aproximativ cinci aminoacizi la fiecare capăt sau în interiorul polipeptidei sau în fragmente ale acesteia, la analogii reduși ai acesteia, cu excepția faptului că în analogii cu legături în lanț bisulfurice trebuie menținute reziduurile de cisteină.

S-a găsit că peptida murină *ob* conține 50% α -helix și că polipeptida *ob* umană conține aproximativ 60% α -helix, așa cum s-a detectat prin dicroism circular al peptidei recombinante în condiții aproape fiziologice. În acest sens, într-un alt aspect, reziduurile de aminoacizi pot fi substituiți cu reziduuri pentru a se forma analogi de polipeptide *ob*, care demonstrează înclinația pentru această formare sau se formează structuri mult mai stabile cum ar fi α -helix. De exemplu, o structură α -helix poate fi preferată dacă Glu, Ala, Leu, His, Trp sunt introduși ca substituenți pentru reziduurile de aminoacizi găsiți în polipeptida nativă *ob*. De preferință, sunt utilizate substituirile conservate de aminoacizi, de exemplu, substituirea acidului aspartic din poziția 29, 30, 44, 61, 76, 100 și/sau 106 (așa cum s-a prezentat în fig. 4), cu acid glutamic (acizi glutamici) Glu; substituirea izoleucinei cu leucină; substituirea glicinei sau valinei, sau orice aminoacid divergent, cu alanina (de exemplu, serina la poziția 53 a polipeptidei umane *ob*, cu alanina), substituirea argininei sau lizinei cu histidina și substituirea tirozinei și/sau fenilalaninei cu triptofan. Gradul crescut sau mai important, stabilitatea structurii α -helix poate produce un analog *ob* cu activitate mai mare, o afinitate de legare crescută sau timp de înjumătățire mai mare. Într-un aspect specific, potențialul de formare a structurii α -helix pentru porțiunea peptidei *ob* corespunzător reziduurilor de aminoacizi 22 până la 53, este crescut. Într-un alt fel, potențialul de formare a structurii α -helix sau stabilității reziduurilor 61-116 este, de asemenea, crescut. Conform unui alt aspect potențialul de formare a structurii helix, structură în lanț de disulfură, corespunzător aminoacizilor 117 până la 167, este crescut. Așadar, analogii *ob* studiați, conțin potențialul de formare a structurii α -helix, ca stabilitatea, mărit mai mult decât unul din domeniile precedente. Într-un alt aspect, analogii de polipeptide *ob* reduse sunt generați ca încorporând o structură de formare, de exemplu, reziduurile de aminoacizi pentru formarea structurii helix, în vederea compensării unei mai mari predispoziții a fragmentelor polipeptidei de a pierde structura stabilă.

Compușii analogi, cum ar fi aceste fragmente pot fi produși, de exemplu, prin digestia pepsinei a materialului peptidic modulator de greutate. Alți analogi, cum ar fi de exemplu muteinele, pot fi produși prin mutageneza direcționată pe porțiunile standard ale secvențelor de codificare a peptidei modulator de greutate. Analogii care prezintă "activitate de modulare a greutății" cum sunt moleculele mici dacă acestea funcționează ca promotori sau inhibitori, pot fi identificați prin analize cunoscute, *in vivo* și/sau *in vitro*.

RO 121036 B1

<i>Analogi cu molecule mici și peptidomimetici ai polipeptidei ob</i>	1
Structura polipeptidei, de preferință polipeptida ob umană, poate fi analizată prin diferite metode cunoscute în domeniu. Secvența de proteină, poate fi caracterizată printr-o analiză de hidrofilicitate (de exemplu, Hopp și colab. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 78: 5824 (1981)). Profilul de hidrofilicitate poate fi utilizat pentru identificarea regiunilor hidrofobe și hidrofile ale polipeptidei ob, care pot indica regiunile îngropate în interiorul polipeptidei îndoite și regiunile accesibile de la exteriorul polipeptidei. În plus, analiza structurală secundară (de exemplu, Chou și colab., <i>Biochem. 13</i> : 222 (1974) poate fi, de asemenea, efectuată, pentru identificarea regiunilor polipeptidei ob care asumă structuri secundare specifice. Manipularea sau determinarea structurii prevăzute, incluzând structura secundară, poate fi realizată folosind programe computerizate în domeniu.	3 5 7 9 11
Prin prevederea unei surse abundente de polipeptide recombinante ob, prezenta invenție permite determinarea structurală cantitativă a polipeptidei. În special, se prevede un material suficient pentru analizele de rezonanță magnetică nucleară (RMN), spectroscopie în infraroșu (IR), ultraviolet (UV), în special dicroismul circular (CD), analiza spectroscopică. RMN în special prevede o analiză structurală foarte puternică a moleculelor în soluție, care aproximează mai aproape zona nativă a acestora. (Marion și colab. <i>Biochem. Biophys. Res. C</i> mm 113:967-974 (1983); Barr și colab. <i>J. Magn. Reson.</i> 65: 355-360 (1985); Kimura și colab. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 77: 1681-1685 (1980)). Pot fi utilizate, de asemenea, alte metode de analiză structurală. Acestea includ, dar nu se limitează la, analizele de cristalografie în raze X (Engstrom, <i>Biochem. Exp. Biol.</i> 11:7-13 (1974)).	13 15 17 19 21
Potrivit unui alt aspect, un analog al polipeptidei ob poate fi testat pentru a determina dacă acesta reacționează încrucișat cu anticorpus specific pentru polipeptida nativă ob sau fragmentele specifice ale acesteia. Gradul de reactivitate încrucișată, duce la obținerea informației despre omologia structurală sau similaritatea proteinei sau accesibilitatea regiunii corespunzătoare porțiunilor de polipeptide care sunt utilizate pentru generarea fragmentelor specifice de anticorpi.	23 25 27
<i>Screeningul analogilor ob.</i>	
În domeniu sunt cunoscute diferite tehnici de screening pentru screeningul analogilor polipeptidelor. Sunt adecvate diferite colecții de produse chimice. În acest sens, prezenta invenție studiază screeningul acestor colecții, de exemplu, colecțiile de compuși sintetici generați de-a lungul anilor pentru cercetare, colecții de compuși naturali și colecții combinatorii așa cum s-a descris într-un mai mare detaliu, <i>infra</i> , pentru analogii polipeptidei ob. Într-un alt aspect, invenția studiază screeningul acestor colecții pentru compușii care se leagă la anticorpii polipeptidei anti-ob, de preferință, anticorpii de polipeptide ob anti-umane. Într-un alt aspect, odată ce receptorul ob este identificat (vezi <i>infra</i>), orice tehnică de screening cunoscută în domeniu, poate fi identificată prin utilizarea screeningului receptorului ob agonist sau antagonist. Prezenta invenție mai studiază screeningul liganzilor cu molecule mici sau a analogilor liganzilor și cu proprietăți mimetice, ca și screeningul pentru liganzii naturali care se leagă la aceștia și agonizează sau antagonizează receptorul ob activat, <i>in vivo</i> .	29 31 33 35 37 39
Cunoașterea secvenței primare a receptorului și similaritatea acelei secvențe cu proteinele cu funcție cunoscută, poate fi considerată ca un reper pentru agoniștii sau antagoniștii proteinei. Identificarea și screeningul antagoniștilor este mai departe facilitat prin determinarea caracteristicilor structurale ale proteinei, de exemplu, prin utilizarea cristalografiei cu raze X, difracția neutronilor, spectrometria de rezonanță magnetică nucleară și alte tehnici pentru determinarea structurii. Aceste tehnici prevăd designul rațional sau identificarea agoniștilor și antagoniștilor.	41 43 45 47

O altă cale utilizează bacteriofagul recombinant pentru a produce colecții mari. Utilizând "metoda fage" (Scott și colab. *Science*, 249: 386-390(1990); Cwirla și colab. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87: 6378-6382 (1990). Devlin și colab., *Science* 249: 404-406 (1990)), Devlin și colab. *Science*, 249: 404-406 (1990)), colecții foarte mari pot fi construite (10^6 - 10^8 entități chimice). O a doua cale utilizează metode chimice primare, dintre care metoda Geysen (Geysen și colab. *Molecular Immunology* 23: 709-715 (1986); Geysen și colab. *J. Immunologic Method*, 102: 259-274 (1987) și metoda recentă dată de Fodor și colab., *Science*, 251: 767-773 (1991) ca exemple. Furka și colab., 14th International Congress of Biochemistry, Volume 5, Abstract FR: 013 (1988); Furka Int. *J. Peptide Protein Res.* 37: 487-493 (1991)); Houghton (**US 4631211**, editat aprilie 23, 1991) descriu metode de producere a amestecului de peptide care pot fi testate ca agonisti sau antagonisti.

Într-un alt aspect, colecțiile sintetice (Needels și colab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10700-10704 (1993); Lam și colab. **WO 92/00252**, fiecare dintre acestea fiind, încorporate aici ca referințe și se pot utiliza la screeningul pentru liganzii receptori ob conform prezentei invenții. Cu astfel de colecții, antagonistii receptori pot fi detectați utilizând celulele care exprimă receptorul fără clonarea actuală a receptorului ob.

Alternativ, analizele pentru legarea ligandului solubil la celule la care exprimă forme recombinante ale receptorilor liganzi ob în domeniul de legare, pot fi efectuate. Liganzii solubili pot fi prevăzuți în mod real, ca polipeptide recombinante ob sau sintetice. Screeningul poate fi realizat cu celule recombinante care exprimă receptorul ob sau alternativ, utilizând proteina receptor purificat, de exemplu, se produce recombinarea așa cum s-a descris mai sus de exemplu, abilitatea receptorului ob solubilizat sau solubil, marcat, care include porțiunea de legătură cu ligandul pentru acea moleculă de legare a ligandului, poate fi utilizată pentru screeningul colecțiilor, așa cum s-a descris în referințele precedente

Derivați de polipeptide

În general, prezenta proteină (denumită aici ca "proteină" este utilizată pentru includerea "polipeptidei" dacă nu este altfel indicat) poate fi derivată prin legarea uneia sau mai multor porțiuni chimice la porțiunea de proteină. Derivații modificați chimic pot fi mai departe formulați pentru administrare intraarterială, intraperitoneală, intramusculară, subcutanată, intravenoasă, orală, nazală, rectală, bucală, sublinguală, pulmonară, topică, transdermală sau alte căi de administrare. Modificarea chimică a proteinelor biologice active a fost găsită că prevede avantaje adiționale în anumite circumstanțe, cum ar fi creșterea stabilității și a timpului de circulație a proteinei terapeutice și de scădere a imunogenității. Vezi **US 4179357**, Davis și colab. apărut pe 18 decembrie, 1979. Pentru revedere, a se vedea Abuchowski și colab. "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" in *Enzymes as drugs*, pag. 367-383. Holcenberg and Roberts, eds. Wiley-Interscience, New York, NY (1981). Un articol de revistă descrie modificarea proteinei și proteinele de fuziune ca Francis, *Focus on Growth Factors*, 3: 4 -10 (1992).

Porțiuni chimice pentru derivatizare

Porțiunile chimice adecvate pentru derivatizare pot fi selectate din polimerii solubili în apă. Polimerul selectat va fi solubil în apă astfel ca proteina la care acesta este legat nu va precipita în mediu apos cum ar fi mediul fiziologic. De preferință, pentru uz terapeutic la prepararea produsului finit polimerul va fi acceptabil farmaceutic. Un specialist în domeniu, va fi capabil să selecteze polimerul dorit pe baza unor astfel de considerații, atunci când polimerul/proteina conjugată va fi utilizată terapeutic și astfel, dozajul dorit, timpul de circulație, rezistența la proteoliza și alte considerații au rol important. Pentru proteinele prezente, acestea pot fi stabilite utilizând analizele prevăzute aici.

RO 121036 B1

Molecule polimeri. Polimerii solubili în apă pot fi selectați dintr-o grupă care constă din, de exemplu, polietilenglicol, copolimeri ai etilenglicolului/propilenglicol, carboximetilceluloză, dextran, alcool polivinilic, polivinilpirolidona, poli-1,3-dioxolan, poli-1,3,6-trioxan, copolimerul anhidridei maleice cu etilenul, poliaminoacizi (fie homopolimeri sau copolimeri selectați) și dextran sau glicol poli(*n*-vinil pirolidona)polietilenică, homo polimeri de propilenglicol, copolimeri de polipropilenoxid și oxid de etilen, polioli polioxietilați și alcool polivinilic. Polistilen glicol propionaldehida duce la avantaje la preparare, datorită stabilității acesteia în apă.

Polimerul poate fi de orice greutate moleculară și poate fi ramificat sau neramificat. Pentru propilenglicol, greutatea moleculară este cuprinsă între aproximativ 2kDa și aproximativ, 100 kDa (termenul de "aproximativ" arată că în preparatele de polietilenglicol unele molecule vor cântări mai mult, iar altele mai puțin decât greutatea moleculară stabilită) pentru a facilita manipularea și prepararea. Se pot utiliza alte dimensiuni, dependent de profilul terapeutic dorit (de exemplu, durata de eliberare susținută dorită, efectele asupra activității biologice, facilitarea manipulării, gradul de antigenicitate sau absența antigenicității și alte efecte cunoscute ale polietilenglicolului pentru o proteină terapeutică sau un analog).

Raportul polimer/proteină

Numărul de molecule de polimer astfel atașate poate varia și specialistul în domeniu va fi capabil de a stabili efectul asupra funcției. Se pot utiliza monoderivați sau se prevăd *di*-, *tri*-, *tetra*- sau unele combinații din acești derivați, cu aceleași porțiuni chimice sau cu porțiuni chimice diferite (exemplu polimeri, cu greutatea diferite de polietilenglicoli). Proporția de molecule de polimeri față de proteine (sau peptide) variază dependent de concentrațiile acestora în amestecul de reacție. În general, raportul optim (în termeni de eficiență a reacției, nu există exces de proteină sau de polimer nereacționat) va fi determinat prin factori cum ar fi gradul dorit de derivatizare (de exemplu, *mono*, *di*-, *tri*- etc), greutatea moleculară a polimerului selectat, dacă polimerul este ramificat sau neramificat și condițiile de reacție.

Legarea porțiunilor chimice la proteină. Moleculele de polietilenglicol (sau alte jumătăți chimice) vor fi atașate la proteină cu considerarea efectelor asupra domeniilor funcționale și antigenice ale proteinei. Există un număr de metode de legare, convenabile pentru specialiștii în domeniu, de exemplu **EP 0401384**, încorporate aici prin referințe (cuplarea PEG la G-CSF). Vezi așadar Malik și colab. *Exp. Hematol.* 20: 1028-1035 (1992) (expunerea pegilării GM-CSF utilizează clorura de tresil). De exemplu, polietilenglicolul poate fi covalent legat la reziduurile de aminoacizi prin grupa reactivă, cum ar fi grupările amino libere și cele de carboxil. Grupările reactive sunt cele la care molecula de polietilenglicol activat poate fi legată. Reziduurile de aminoacizi având o grupare amino liberă, pot include reziduuri de lizină și reziduuri de aminoacid N-terminal, acestea având o grupare carboxil liberă, care poate include reziduurile de acid aspartic, reziduurile de acid glutamic și reziduurile de aminoacid C-terminal. Grupările sulfhidrilice pot fi așadar utilizate ca grupări reactive pentru legarea moleculei (moleculelor) de polietilenglicol. De preferință, pentru scopuri terapeutice este legarea la grupa amino, cum ar fi legarea la N-terminal sau la gruparea de lizină. Legarea reziduurilor importante pentru receptorul de legătură se va evita, când se dorește receptorul de legătură.

Proteine modificate chimic N-terminal

Obținerea proteinei modificată chimic la capătul N-terminal este de dorit în mod special. Utilizând polietilenglicolul ca o ilustrare a compozițiilor prezente, se pot selecta o diversitate de molecule de polietilenglicol (prin greutatea moleculară, ramificare etc). Proporția de molecule de polietilenglicol la proteină (sau peptide) din amestecul de reacție depinde de tipul reacției de PEG-ilare care trebuie realizat și metoda de obținere a proteinei PEG-ilate

N-terminal selectate. Metoda de obținere a preparatului PEG-gilat N-terminal (de exemplu, separarea acestei porțiuni din porțiuni mono-PEG-gilate dacă este necesar), poate fi de purificare a materialului PEG-gilat la capătul N-terminal din populația moleculelor de proteine PEG-gilate. Modificarea chimică selectivă la capătul N-terminal poate fi însoțită de alchilarea reductivă cu cercetarea reactivității diferențiale a diferitelor tipuri de grupări amino primare (lizină față de capătul N-terminal) convenabile pentru derivatizarea într-o proteină specială. În condiții de reacție potrivite, se obține derivarea proteinei la capătul N-terminal cu gruparea carbonil care conține polimerul. De exemplu, o grupare poate fi selectivă ca proteină PEG-gilată la capătul N-terminal prin efectuarea reacției la un pH care permite să se obțină un avantaj al pK, diferențele fiind între grupările e-amino ale reziduurilor de lizină și gruparea α -amino a reziduurilor de la capătul N-terminal al proteinei. Prin astfel de derivări selective se controlează legarea la polimerul solubil în apă a proteinei; conjugarea se produce cu polimerul care este plasat predominant la capătul N-terminal al proteinei, neavând loc nici o modificare semnificativă a altor grupe reactive, cum ar fi grupările amino din catena secundară a lizinei. Utilizând alchilarea reductivă, polimerul solubil în apă poate fi de tipul descris mai sus și va avea o singură aldehydă reactivă pentru cuplarea proteinei. Poate fi, de asemenea, utilizată polietilenglicol propionaldehidă.

Acizii nucleici asociați cu polipeptida ob

Așa cum s-a notat mai sus, prezenta invenție este îndreptată spre acizii nucleici care conțin polipeptidele *ob* ca și secvențele 5', 3' necodificate, asociate genomic și secvențele intronice la gena *ob*. Astfel, conform prezentei invenții, se vor utiliza tehnici convenționale de biologie moleculară, microbiologie și tehnici de ADN recombinant. Astfel de tehnici sunt elucidate complet în literatură. Vezi ca exemplu, Sambrooc și colab., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); Glover ed. *ADN Cloning: A Practical Approach*, Vol. I și II, IRL Press, Ltd. Oxford, U.K. (1985); Gait ed. *Oligonucleotide Synthesis*, Oxford University Press (1984); Hames și colab. eds, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag (1985); Hames și colab. eds, *Transcription and Translation*, Oxford University Press (1984); Freshney ed. *Animal Cell Culture*, Oxford University Press (1986); *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press (1986); Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning*, Wiley, New York (1984). O relevanță specială a prezentei invenții sunt strategiile pentru izolarea, clonizarea, secvențierea, analizarea și caracterizarea genei sau acidului nucleic, pe baza unor tehnici de reacție în lanț (PCR) a polimerazei, bine cunoscute.

O "replicare" este orice element genetic (de exemplu, plasmidă, cromozom, virus) care funcționează ca o unitate autonomă a replicare a ADN *in vivo*, care este de exemplu capabilă de replicare sub propriul ei control.

Un "vector" este un replicon, cum ar fi o plasmidă *fag* sau cosmid la care un alt segment de ADN se poate lega astfel ca să poartă replica segmentului legat.

O "casetă" se referă la un segment ADN care poate fi inserat în vectorul respectiv la porțiunile specifice de restricție. Segmentul ADN cuprinde o polipeptidă de interes și caseta și porțiunile de restricție sunt desemnate pentru a asigura inserția casetei în zona proprie de citire pentru transcripție și translație.

ADN "heterolog" se referă la ADN care nu este localizat natural în celulă sau în porțiunea cromozomală a celulei. De preferință, ADN heterolog include o genă străină la celulă.

O celulă a fost "transfectată" cu ADN exogen sau ADN heterolog, când un astfel de ADN a fost introdus în interiorul celulei. O celulă a fost "transformată" prin ADN exogen sau ADN heterolog când ADN transfectat efectuează o schimbare fenotipică. De preferință, ADN de transformare va fi integrat (legat covalent) în ADN cromozomal, formând genomul celulei.

RO 121036 B1

O "clonă" este o populație celulară derivată de la o singură celulă sau ancestor comun prin mitoză. 1

O "moleculă de acid nucleic" se referă la forma polimerică de ester fosfat a ribonucleozidelor (adenozină, guanozină, uridină sau citidină; "molecule ARN") sau dezoxiribonucleozide (dezoxiadenozina, dezoxiguanozina sau dezoxicitidina; "Molecule ADN", fie ca forme simplu răsucite sau dublu helix răsucit. Sunt posibile structuri dublu helix răsucite ADN-ADN, ADN-ARN și ARN-ARN. Termenul de moleculă de acid nucleic și în special moleculă de ADN sau ARN se referă numai la structura primară și secundară a moleculei și aceasta nu se limitează la nici o formă specială, terțiară sau cuaternară. Astfel, acest termen include ADN-ul dublu răsucit găsit, *inter alia*, în moleculele de ADN lineare sau circulare (de exemplu, fragmente de restricție) plasmide și cromozomi. În discutarea structurii de molecule ADN dublu răsucite în special, secvențele pot fi descrise aici conform convenției normale a sevenței date numai în 5' pînă la 3' pe direcție de-alungul lanțului netranscris (de exemplu, lanțul având o secvență omoloagă cei de ARNm). 3 5 7 9 11 13

O "moleculă de ADN recombinant" este o moleculă ADN care prezintă o transformare prin tehnici de biologie moleculară. O moleculă de acid nucleic este "hibridizabilă" la o altă moleculă de acid nucleic cum ar fi ADNc, ADN genornic sau ARN, când forma simplu răsucită a moleculei de acid nucleic poate susține moleculă de acid nucleic în condiții convenabile de temperatură și forță ionică în soluție (vezi Sambrook și colab. 1989, de mai sus). Temperatura și tăria legăturii ionice duc la o accentuare a hibridizării. Pentru un screening preliminar al acizilor nucleici omologi, se pot utiliza condiții de hibridizare de o stringență scăzută corespunzătoare la T_m de 55°C, de exemplu 5 x SSC, 0,1% SDS, 0,25% lapte și fără formamidă, sau 30% formamidă, 5 x SSC, 0,5% SDS). Condițiile de hibridizare moderat stringente corespund la o valoare superioară a T_m , de exemplu, 50 % formamidă cu 5 x 6 x SCC. Condițiile de hibridizare puternic stringente corespund la o valoare maximă a T_m , de exemplu 50% formamidă, 5 x sau 6 x SCC. Hibridizarea necesită ca doi acizi nucleici să conțină secvențe suplimentare, dependente de stringența hibridizării și sunt posibile nepotriviri între baze. O stringență adecvată pentru hibridizarea acizilor nucleici depinde de lungimea acizilor nucleici și de gradul de complementaritate, variabile cunoscute bine în domeniu. Cu cât este mai ridicat gradul de similaritate sau omologie între secvențele (2) de nucleotide, cu atât este mai mare valoarea T_m pentru hibridii acidului nucleic având acele secvențe. Stabilitatea relativă (corespunzător la o valoare superioară de T_m) a hibridizărilor acidului nucleic scade în felul armator: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Pentru hibridii având mai mult de 100 nucleotide în lungime, ecuațiile pentru calcularea T_m au fost derivate (vezi Sambrook și colab., 1989, de mai sus, 9,50-0,51). Pentru hibridizarea cu acizi nucleici mai scurți, de exemplu oligonucleotide, poziția nepotrivirilor devine mai importantă și lungimea oligonucleotidei se determină în specificitatea acesteia (vezi Sambrook și colab. 1989, de mai sus, 11,7-11,8). De preferință, o lungime minimă pentru acidul nucleic hibridizabil, este de cel puțin aproximativ 10 nucleotide; mult mai preferabil de cel puțin aproximativ 15 nucleotide și cel mai preferabil, o lungime de cel puțin aproximativ 20 de nucleotide. 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39

"Recombinarea omoloagă" se referă la inserția unei secvențe străine ADN a vectorului în cromozom. De preferință, vectorul țintește o porțiune cromozomală specifică pentru recombinația omoloagă. Pentru recombinația omoloagă specifică, vectorul va conține regiuni suficient de lungi pentru omologia secvențelor de cromozomi, pentru a permite legarea complementară și încorporarea vectorului în cromozom. Regiunile mai lungi de omologie și gradele mai mari de similaritate secvențială pot duce la creșterea eficienței recombinăției omoloage. 41 43 45 47

RO 121036 B1

O "secvență de codificare ADN" este o secvență ADN dublu răsucită, care este transcrisă și transferată în polipeptidă într-o celulă *in vitro* sau *in vivo*, când se plasează sub controlul secvențelor de reglare corespunzătoare. Limitele secvenței de codificare sunt determinate prin codonul inițial la gruparea terminală 5' (amino) și prin codonul de oprire a translației la gruparea terminală 3' (carboxil). O secvență de codificare poate include, fără a se limita la aceasta, secvențe procariote, secvențe de ADNc din ARNm din eucariote, secvențe de ADN genomic din ADN eucariot (de exemplu, în cazul mamiferelor) și chiar secvențe de ADN sintetic. Dacă secvența de codificare intenționează să se exprime în celule eucariote, secvența terminației de transcripție și de semnal a poliadenilării va fi de obicei localizată la secvența 3' de codificare.

Izolarea secvențelor ob de codificare și flancare

Acizii nucleici studiați în prezenta invenție se extind așa cum este menționat, la alți acizi nucleici care codifică exprimarea peptidelor, cum ar fi cele prezentate în fig. 1A până la D (SECV. ID Nr.2), fig. 3 (SECV. ID Nr.4), fig. 5 (SECV. ID Nr.5) și fig. 6 (SECV. ID Nr.6) în acest sens, în timp ce ADN specific a fost izolat și secvențat cu gena *ob*, orice celule de animale potențiale, pot să servească ca sursă de acid nucleic pentru clonarea moleculară a genei cuprinsă în peptida prezentei invenții. ADN poate fi obținut prin procedee standard cunoscute în domeniu, din ADN clonat (de exemplu "colecția" ADN) prin sinteză chimică, prin clonarea ADNc sau prin clonarea ADN genomic sau a fragmentelor acestora, purificate din celulele dorite (vezi, de exemplu, Stambrook și colab. 1989, de mai sus, Glover, 1985, de mai sus). Clonele derivate din ADN genomic, pot conține regiuni ADN de reglare și intronice, suplimentar la regiunile de codificare; clonele derivate din ADNc nu vor conține secvențe de intron. Oricare ar fi sursa, gena va fi clonată molecular într-un vector convenabil pentru propagarea genei.

În ceea ce privește clonarea moleculară a genei de la ADN genomic, acesta poate fi amplificat utilizând primerii selectați din secvențele ADNc. În mod alternativ, fragmentele de ADN sunt generate, din care, câteva vor conține gena dorită. ADN poate fi elevat pe porțiunile specifice, utilizând diferite enzime de restricție. Se poate utiliza, de asemenea, DN-aza în prezență de mangan, pentru fragmentarea ADN sau ADN poate fi fragmentat fizic, de exemplu, printr-o metodă acustică. Fragmentele de ADN linear, pot fi apoi separate conform unor tehnici standard de dimensionare, incluzând, fără a se limita la aceasta, gel agaroză și electroforeză pe gel de poliacrilamida și cu ajutorul unei cromatografieri pe coloană.

Odată ce aceste fragmente de ADN sunt generate, identificarea fragmentului de ADN specific conținând gena *ob* sau gena asemănătoare *ob* poate fi însoțită de diferite metode, de exemplu, dacă o cantitate dintr-o porțiune de *ob*, gena asemănătoare *ob* sau ARNm specific acesteia sau fragmentul acesteia, este valoroasă și poate fi purificată și marcată, fragmentele de ADN generate, pot fi supuse unui screening prin hibridizarea acidului nucleic la proba de marcă (Benton și colab., *Science*, 196: 180 (1977); Grunstein și colab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3961 (1975)). Prezenta invenție prevede astfel de probe de acid nucleic, care pot fi preparate convențional și secvențe specifice descrise aici, de exemplu, o probă de hibridizare având o secvență de nucleotidă corespunzătoare la cel puțin 10, preferabil 15 fragmente de nucleotide ale secvenței prezentate în fig. 1A până la E (SECV. ID Nr.1) sau fig. 2A și B (SECV. ID Nr.3) de preferință, un fragment este selectat ca fiind superior unic pentru peptidele modulatorie ale invenției. Aceste fragmente de ADN vor fi hibridizate cu omologie substanțială la această probă. Așa cum s-a notat mai sus, cu cât gradul de omologie este mai mare, cu atât condițiile de hibridizare sunt mai stringente pentru utilizarea acestora. Într-un aspect al prezentei invenții, condițiile de hibridizare cu stringență inferioară sunt utilizate pentru identificarea peptidei modulatorie, omoloage, mai mult decât

atât, într-un aspect preferat și așa cum a fost demonstrat experimental, acidul nucleic cuprinzând peptida modulatorie conform prezentei invenții, va hibridiza în acidul nucleic având o secvență de nucleotidă prezentată în fig. 1A până la E (SECV. ID Nr. 1) sau fig. 2A și B (SECV. ID Nr. 3) sau un fragment de hibridizare a acestora, în condiții moderat stringente, mult mai preferate fiind condițiile de hibridizare, de stringență puternică. În mod alternativ, prezența genei poate fi detectată prin analize bazate pe proprietățile fizice, chimice sau imunologice ale produsului de exprimare a acesteia. De exemplu, clonele ADNc sau clonele ADN care hibridizează selectiv propriile ARNm-uri, pot fi selectate în ceea ce privește producerea de proteine care au o activitate similară sau identică de migrare electroforetică, comportament identificat izoelectric, aplicații în digestia proteolitică, activitate de tirozinfosfatază sau proprietăți antigenice așa cum este cunoscut pentru peptidele modulatorie, prezente. De exemplu, anticorpii prezentei invenții pot fi utilizați convențional pentru screeningul peptidelor modulatorie omoloage din alte surse.

O genă care cuprinde peptida modulatorie conform prezentei invenții, poate fi așadar identificată prin selecția ARNm, de exemplu prin hibridizarea acidului nucleic urmată de translația *in vitro*. În acest procedeu, fragmentele sunt utilizate pentru izolarea complementară de ARNm-uri prin hibridizare. Astfel de fragmente de ADN, pot reprezenta ADN modulator purificat, convenabil. Analiza de imunoprecipitare sau analizele funcționale (de exemplu, tirozin fosfataza activă) ale produselor de translație *in vitro*, din produsele în ARN-urilor identifică ARN-urile și astfel fragmentele complementare de ADN care conțin secvențele dorite. În plus, ARNm-urile specifice pot fi selectate prin absorbție polizomilor izolați din celule pentru anticorpii imobilizați specific direcționali către peptida modulatorie. O peptida ADNc modulatorie radiomarcată, poate fi sintetizată utilizând ARN-ul selectat (din polizomii absorbiți) ca model, ARN-urile sau ADN-urile radiomarcate pot fi apoi utilizate ca probe pentru identificarea fragmentelor de peptide ADN modulatorie omoloage, dintre fragmente de ADN genomice.

Așa cum s-a menționat mai sus, secvența de ADN cuprinzând peptidele modulatorie de greutate, așa cum s-a descris mai sus, se poate prepara mai degrabă sintetic, decât prin clonare, secvența de ADN poate fi desemnată de codoni corespunzători pentru secvențele de aminoacizi ai peptidelor modulatorie de greutate. În general, vor fi selectați codoni preferați pentru gazda prevăzută, dacă secvența se va utiliza pentru exprimare. O secvență completă este asamblată prin suprapunerea oligonucleotidelor preparate prin metode standard și asamblate într-o secvență de codificare, completă. Vezi de exemplu, Edge, *Nature*, 292:756 (1981); Nambair și colab. *Science*, 223:1299 (1984); Jay și colab., *J. Biol. Chem.* 259:6511 (1984).

Secvențele de ADN sintetic permit o construcție convenabilă a genelor care vor exprima analogii modulatori ai greutății, așa cum s-a descris mai sus. Alternativ, analogii de codificare ADN pot fi obținuți prin mutageneza directă pe porțiuni ale genelor *ob* native sau ADNc-urilor și analogii pot fi obținuți direct, utilizând sinteza polipeptidei convenționale.

O metodă generală pentru încorporarea specifică pe porțiuni a aminoacizilor nenaturali în proteine, așa cum s-a descris de Norten și colab., *Science*, 244:182-188 (1989). Această metoda poate fi utilizată pentru a se crea analogi ai polipeptidei *ob*, cu amino acizi nenaturali.

Acizii nucleici necodificați

Prezenta invenție se extinde la prepararea nucleotidelor antisens și ribozimelor, care pot fi utilizați pentru a interfera cu exprimarea proteinelor modulatorie de greutate, la un nivel de translație. Această cale utilizează acidul nucleic antisens și ribozima, pentru blocarea translației ARNm-urilor specifici, mai degrabă printr-un efect de mască al ARNm cu acid

nucleic antisens sau prin clivajul acestuia cu ribozime. Acizii nucleici antisens ca molecule de ADN sau ARN sunt complementari la cel puțin o porțiune din molecula de ARNm specific (vezi Weintraub. *Sci. Am.* 262: 40-46 (1990); Marcus -Sekura, *Anal. Biochem.* 172: 289-295 (1988). În celule are loc hibridizarea la ARNm formând o moleculă dublu răsucită. Celulele nu participă la translația unui ARNm complexat în această formă dublu răsucită. De aceea, acizii nucleici antisens interferează cu exprimarea ARNm în proteină. Oligomerii de aproximativ cincisprezece nucleotide și moleculele care hibridizează la codonul de inițiere AUG, vor fi în special eficiente; acestea sunt mai ușor de sintetizat și se pun mai puține decât pentru moleculele mai mari, când are loc introducerea în celulele producătoare de peptide modulatorie a greutatei. Metodele antisens au fost utilizate pentru inhibarea exprimării multor *in vitro* (Marcus-Sekura, 1988, de mai sus; Mambor și colab., *J.Exp. Med.* 168: 1237-1245 (1988)).

Ribozimele sunt molecule de ARN care posedă capacitatea de clivaj specific al moleculelor de ARN cu simplă răsucire într-un mod oarecum analog celui de restricție a ADN-ului la endonucleaze. Ribozimele sunt descoperite din observarea faptului că anumiți ARNm au capacitatea de a exciza proprii introni. Prin modificarea secvenței de nucleotide la aceste secvențe ARN, cercetătorii au fost capabili de inginerie moleculară care duce la recunoașterea secvențelor de nucleotide specifice în molecula de ARN și pe care o clivează. (Cech, *J. Am. Med. Assoc.* 260:3030-3034 (1988). Deoarece acestea sunt secvențe specifice numai ARNm cu secvențe speciale, sunt inactivate. Investigatorii au identificat două tipuri de ribozime, tipul "Tetra-hymera" și tipul "Hammerhead". Ribozimele de tip Tetrahymena determină recunoașterea a patru secvențe de bază, în timp ce tipul "hammer-head" duce la recunoașterea a unsprezece până la optsprezece secvențe de bază. Cu cât este mai lungă secvența de recunoaștere, cu atât este mai ușoară producerea exclusivă a speciilor țintă de ARNm. De aceea, ribozimele de tipul "hammer-head" sunt preferabile ribozimelor de tip *Tetrahymena*, pentru inactivarea speciilor de ARNm specific și optsprezece secvențe de recunoaștere, de bază, sunt preferate secvențelor de recunoaștere, mai scurte.

Secvențele de ADN descrise aici, pot fi astfel utilizate, pentru prepararea moleculelor antisens și a ribozimelor care determină clivajul ARNm-urilor pentru obținerea proteinelor modulatorie de greutate și a liganzilor lor, inhibându-se astfel exprimarea genei *ob* și conducând la un câștig în greutate și la creșterea adipozității. Conform unei alte întrupări, oligonucleotidele complementare scurte pentru codificare și filamentele complementare ale acidului nucleic *ob* sau pentru regiunile necodificate ale genei 5', 3' *ob* sau pentru cele interne (intronic) din regiunile de codificare sunt, de asemenea, prevăzute în prezenta invenție. Astfel de acizi nucleici sunt utilizați ca probe, fie ca probe de oligonucleotide cu marcă directă sau ca primeri pentru reacția în lanț a polimerazei în vederea evaluării prezenței mutațiilor în gena *ob* sau a nivelului de exprimare a ARNm a *ob*. De preferință, acizii nucleici necodificați, conform prezentei invenții, sunt din gena umană *ob* într-un aspect specific, acizii nucleici necodificați duc la recombinație omoloagă pentru integrarea genei amplificabile și/sau secvențe de reglare în apropierea genei *ob*, de exemplu pentru a se prevedea nivele mai ridicate de exprimare a polipeptidei *ob* sau pentru a câștiga o mutație în secvențele de reglare a genei *ob*, care duc la obținerea unor nivele potrivite de exprimare a polipeptidei *ob* (vezi **WO 91/06666**, publicat în 16 mai 1991, de Skoultchi; **WO 91/09955**, publicat în 11 iulie, 1991, de Chappel; vezi așadar **WO 90/14092**, publicat în 29 noiembrie, 1990 de Kucherlapati și Campbell).

Producția de polipeptide ob. Exprimare și sinteză.

Secvențele de control transcripțional și translațional, sunt secvențe de reglare a ADN, cum ar fi promotorii, intensificatorii, terminatorii și alții care se prevăd pentru exprimarea secvenței de codificare în celulele gazdă. În celulele eucariote semnalele pentru poliadenilare sunt secvențe de control.

RO 121036 B1

O secvență de codificare este "sub control" pentru secvențe de control transcripțional și translațional în celula în care ARN polimeraza transcrie secvența de codificare în ARNm și care este apoi trans-ARN aplicată și transferată în proteina care este conținută de secvența de codificare.

O "secvență semnal" este inclusă la începutul secvenței de codificare a proteinei care trebuie să fie exprimată la suprafața celulară. Această secvență cuprinde o peptidă semnal N-terminal pentru polipeptida matură, care dirijează celulele gazdă pentru translocarea polipeptidei.

Termenul "secvență semnal de translocare" este așadar utilizată aici și se referă la această secvență semnal. Secvențele semnal de translocare, pot fi găsite asociate cu o varietate de proteine native pentru eucariote și procariote și sunt adesea funcționale în ambele tipuri de organisme.

O secvență ADN este "legată operativ" la o secvență de control al exprimării, când secvența de control al exprimării controlează și reglează transcripția și translația acelei secvențe ADN.

Termenul de "operativ legată" include un semnal de start potrivit (de exemplu ATG) în fața secvenței ADN care trebuie să fie exprimată și prin menținerea cadrului de citire corect, pentru a permite exprimarea secvenței de ADN sub controlul secvenței de control al exprimării și pentru producerea produsului dorit, care cuprinde secvența ADN. Dacă o genă care se dorește a fi inserată în molecula recombinantă ADN conține un semnal de start corespunzător, acest semnal de start poate fi inserat la partea superioară a 5' și în cadrul de citire cu gena.

O "secvență promotor" este o regiune capabilă de reglare a legării ARN polimerazei în celulă și de inițiere a transcripției la partea inferioară (direcția 3') a secvenței de codificare. În scopul definirii prezentei invenții, secvența promotor este legată la porțiunea terminală 3', prin porțiunea de inițiere a transcripției și este extinsă la partea superioară (direcția 5'), pentru a include numărul minim de baze sau elemente necesare inițierii transcripției la nivele detectabile, superioare celor de bază. În secvența promotoare se va găsi porțiunea de inițiere a transcripției (definită convenabil de exemplu, prin cartarea cu nucleaza S1), ca și domeniile de legare a proteinei (secvențele de consens) responsabile pentru legarea ARN polimerazei.

O altă caracteristică a prezentei invenții este exprimarea secvențelor de ADN descrise mai sus. Așa cum se cunoaște în acest domeniu, secvențele de ADN pot fi exprimate prin legarea operativă a acestora la o secvență de control al exprimării, în vectorul de exprimare corespunzător și utilizând acest vector de exprimare, pentru transformarea unicelulară convenabilă.

Conform prezentei invenții, astfel de legături operative ale secvenței de ADN cu secvența de control al exprimării, dacă nu aparține deja secvenței de ADN, prevederea codonului de inițiere ATG în cadrul de citire corectă superior secvenței ADN. O mare diversitate de combinații de celule gazdă și vectori de exprimare poate fi utilizată în secvențele de exprimare ale ADN, conform prezentei invenții. Vectorii de exprimare folositori pot consta din segmente ale secvențelor ADN cromozomale, necromozomale și sintetice. Vectorii convenabili includ derivați de SV 40 și plasmidele bacteriene cunoscute, de exemplu *Escherichia coli*, *col E1*, *pCR1*, *pBR322*, *pMB9*, *pUC* sau *pUC* ca derivați de plasmide, de exemplu vectorii *pGEX*, vectorii *pET*, *pmal-c*, *pFLAG*, etc și derivații acestora, plasmidele *RP4*, *fag* ADN, etc, numeroși derivați de *fag* ADN, de exemplu *NM989* și *fag* ADN, de exemplu *M13* și *fag* ADN cu filamente simplu răsucite; plasmide din drojdie cum sunt 2μ sau derivații acestora; vectorii folositori în celule eucariote, cum ar fi, de exemplu, vectorii folositori în celulele de insecte

RO 121036 B1

și în celulele de mamifere; vectori derivați din combinații de plasmide fagi ADN, cum ar fi plasmidele care au fost modificate pentru a întrebuința fagul ADN sau alte secvențe de control al exprimării.

Într-un aspect preferat, exprimarea *ob* este obținută în drojdiei metilotrofică, de exemplu, drojdie *Pichia pastoris* (vezi, de exemplu, **WO 90/03431**, publicat 5 aprilie 1990, de Brierley și colab.; **WO 90/10697**, publicat la 20 septembrie 1990, de Siegel și colab.). Într-o întruchipare specifică, *infra*, vectorul de exprimare este prelucrat pentru exprimarea *ob* sub controlul secvenței de semnalizare ca factor de conjugare alfa.

Oricare din marea diversitate a secvenței de control al exprimării secvențelor care controlează exprimarea secvenței ADN se leagă operativ la aceasta potate fi utilizată în acești vectori pentru a exprima secvențele de ADN, conform prezentei invenții. Astfel de secvențe folositoare pentru controlul exprimării includ, de exemplu, promotori timpurii sau întârziați ai SV40, CMV, vaccinia, polyoma sau adenovirusul, sistemul *lac*, sistemul *trp*, sistemul TAC, sistemul TRC, sistemul LTR, regiunile fage, promotoare și operatoare majore, regiunile de control pentru proteina cu înveliș *fd*, promotorul pentru 3-fosfoglicerat kinază sau alte enzime glicolitice, promotori de acid fosfatază (de exemplu *Pho5*), promotorul 1 AOX sau drojdia metilotrofică, promotorii factorilor de conjugare alfa din drojdie și alte secvențe cunoscute pentru controlul exprimării genelor de celule procariote sau eucariote sau virusurile acestora și diferitele lor combinații. Sunt folosite o diversitate de celule gazdă, unicelulare în exprimarea secvențelor de ADN. Aceste celule gazdă pot include celule gazdă eucariote și procariote cunoscute, cum ar fi tulpini de *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, fungi cum ar fi drojdiile (*Saccharomyces* și drojdia metilotrofica cum ar fi *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* și *Torula*) și celule animale, cum ar fi CHO, R1, 1, B-W și celule LM, celule din rinichi de maimuță, African Green Monkey (de exemplu, COS 1, COS 7, BSC1, 3SC 40 și BMT 10), celule de insecte (de exemplu, Sf9) și celule umane și celule de plante, în culturi de țesuturi.

Se înțelege că nu toți vectorii, secvențele de control al exprimării și celulele gazdă vor funcționa în același fel pentru a exprima secvențele ADN conform prezentei invenții. Niciuna din toate aceste celule gazdă nu va funcționa la fel de bine cu același sistem de exprimare. Cu toate acestea, în domeniul de specialitate, se vor selecționa proprii vectori, secvențele de control al exprimării și celulele gazdă fără o experimentare adecvată pentru a însoți exprimarea dorită și fără a se îndepărta de scopul acestei invenții. De exemplu, în selectarea vectorului se va considera celula gazdă care va trebui să acționeze ca vector. Numărul copiilor de vectori, capacitatea de control al numărului de copii și exprimarea oricăror alte proteine care conțin vectorul, cum ar fi markerii antibiotici, vor fi luați în considerare. În selectarea secvenței de control al exprimării se vor lua în considerare o diversitate de factori. Aceștia includ, de exemplu, puterea relativă a sistemului, controlabilitatea acestuia și compatibilitatea cu secvența specială ADN sau gena care trebuie exprimată, în special cu privire la structurile secundare potențiale. Celulele gazdă unicelulare convenabile, vor fi selectate, de exemplu, prin luarea în considerare a compatibilității lor cu vectorul ales, caracteristicile de secreție, abilitatea de multiplicare corectă a proteinelor și necesarul de fermentare al acestora, ca și toxicitatea celulelor gazda datorită produsului cuprinzând secvențele ADN care se vor exprima astfel și ușurința de purificare a produselor de exprimare. Luând în considerare aceștia, precum și alți factori, specialistul în domeniu va construi o diversitate de vectori, de secvențe de control al exprimării/comбинаții de celule gazdă care vor exprima secvențele ADN conform prezentei invenții, prin fermentare sau printr-o cultură de țesut animal pe scară largă.

RO 121036 B1

Într-un aspect specific, se poate exprimată proteina de fuziune *ob*. Proteina de fuziune *ob* cuprinde cel puțin o porțiune funcțională activă din proteina *ob* (non-*ob*) care se leagă printr-o legătură peptidică la cel puțin o porțiune funcțională activă din polipeptida *ob*. Secvențele non-*ob* pot fi amino-terminale sau carboxi-terminale față de secvențele *ob*. Mult mai preferabil, pentru exprimarea stabilității proteinei de fuziune *ob* proteolitic inactive, porțiunea de proteină non-*ob* este legată printr-o legătură peptidică la proteina *ob* cu capătul amino-terminal. Molecula ADN recombinantă cuprinzând o astfel de proteină de fuziune, conține secvența de codificare având cel puțin o porțiune funcțională activă din proteina non-*ob* legată în cadru la secvența de codificare *ob* și de preferință cuprinde o porțiune de clivaj pentru proteaza specifică, de exemplu, trombina sau factorul Xa, de preferință la joncțiunea *ob*-non-*ob*. Într-un aspect specific, proteina de fuziune este exprimată în *Escherichia coli* sau *Pichia pastoris*.

Într-un aspect specific, *infra*, vectorii sunt preparați pentru exprimarea genelor *ob* umane și murine, cu sau fără codonul Gln-49, în sistemul de exprimare bacteriană și în sistemul de exprimare a drojdiei (*Pichia*), ca proteine de fuziune. Gena *ob* este preparată cu o porțiune de clivaj endonucleazică, de exemplu, utilizând PCR și primeri noi. Se dorește confirmarea secvențelor generate PCR deoarece probabilitatea de includere a unui punct de mutație este mai mare cu această tehnică. Se utilizează o plasmidă conținând histidina marcată (His-tag) și o porțiune de clivaj proteolitic. Prezența histidinei face posibilă izolarea selectivă a proteinelor recombinante pe coloana Ni-chelație sau prin purificare prin afinitate.

Într-un aspect specific, *infra*, porțiunea de clivaj proteolitic a trombinei este prelucrată astfel că tratamentul cu proteaza a trombinei va elibera o lungime complet matură (de exemplu în absența secvenței semnal) a polipeptidei *ob*.

Într-un alt aspect se poate, de asemenea, utiliza vectorul *pGEZ* (Smith și colab. *Gene* 67:31-40 (1988)). Acest vector fuzionează cu *schistosoma japonicum* glutationina S-transferaza ADNc, la secvența de interes. Proteinele bacteriene sunt cultivate și proteinele recombinante pot fi rapid purificate pe o coloană cu afinitate redusă pentru glutationină. Suportul GST poate fi substanțial elevat din proteinele de fuziune prin digestia cu proteaze parțial specifice. După clivaj, suportul și proteina de fuziune neclivată, pot fi îndepărtate prin absorbție pe glutation agaroză. Dificultatea cu sistemul ocazional crește atunci când proteina codificată este insolubilă în soluțiile apoase. Exprimarea proteinelor recombinante în sistemul bacterian poate rezulta din multiplicarea incorectă a proteinei de exprimare, fiind necesară remultiplicarea. Proteina recombinantă poate fi remultiplicată înainte sau după clivaj, pentru a forma polipeptida *ob* funcțională activă. Polipeptida *ob* poate fi remultiplicată prin fazele (i) incubarea proteinei în tamponul de denaturare care conține un agent de reducere și apoi (ii) incubarea proteinei în tamponul care conține un agent de oxidare și de preferință conține un agent de stabilizare a proteinei sau agentului chaotropic sau ambii. Perechi de agenți redox adecvați (reducere/oxidare) pot include, fără a limita la aceștia, glutation redus/glutacion bisulfură, cis-/cisteină, cistamină/cisteamină și 2-mercaptoetanol/2-xetilbisulfură. Într-un aspect special, fuziunea proteinei poate fi realizată într-un denaturant cum este ureea, înainte de schimbarea în soluție tampon reducătoare. Într-un aspect preferat, proteina este purificată, de exemplu, prin cromatografie cu schimb ionic sau Ni-chelare, înainte de schimbarea în soluția tampon reducătoare. Agenții de denaturare includ, dar fără a se limita la aceștia, ureea și guanidina clorhidrică. Proteina recombinantă este apoi diluată de cel puțin aproximativ 10 ori, mult mai preferat de aproximativ 100 de ori, într-o soluție tampon de oxidare, care conține agentul de oxidare, cum ar fi de exemplu, dar fără a fi limitați la aceștia, 0,1 M tris-HCl, la pH 8,1 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 0,3 M glutacion oxidaza. Proteina de fuziune este apoi incubată timp de aproximativ 1 până la 24 h, de preferință aproximativ

2 până la 16 h, la temperatura camerei, într-o soluție tampon de oxidare. Soluția tampon de oxidare poate conține un agent de stabilizare pentru proteină, de exemplu zahăr, alcool sau sulfat de amoniu. Agentul tampon de oxidare poate să mai conțină un agent chaotropic la o concentrație joasă pentru a destabiliza interacțiunile intermoleculare incorecte și astfel se promovează multiplicarea proprie. Agenții chaotropici convenabili includ, fără a se limita la, detergenți, polioli, L-arginină, guanidina clorhidrică și polietilen glicol (PEG). Important este să se utilizeze o concentrație suficient de scăzută de agent chaotropic pentru a evita denaturarea proteinei. Proteina remultiplicată poate fi concentrată de cel puțin 10 ori, mai preferat printr-o cantitate de diluare în soluția tampon de oxidare. Procesele de fermentație bacteriană pot fi astfel rezultatele preparării proteinei recombinante care conține nivele neacceptabile de endotoxine. De aceea, invenția studiază separarea acestor endotoxine, cum ar fi de exemplu prin utilizarea anticorpilor specifici ai endotoxinei sau altor molecule de legare a endotoxinelor. Prezența endotoxinelor poate fi terminată prin tehnici standard, cum ar fi prin utilizarea reactivilor E-TOXATE (Sigma, St. Louis, Missouri) sau prin bioanalize.

În plus, față de exemplele specifice, prezenta invenție studiază utilizarea sistemelor de exprimare a baculovirusului de mamifere și drojdie, pentru exprimarea proteinei *ob*. De exemplu, sistemele de exprimare a baculovirusului, vectorii de transfer non-fuziune, cum sunt, fără a se limita la aceștia, *pVL941* (*Bam*H) porțiunea clonată (Summer), *pVL 1393* (*Bam*HI, *Sma*I, *Xba*I, *Eco*RI, *Not*I, *Xma*III, și porțiunea de clonare *Pst* Invitrogen), *pVL1392* (*Bgl*III, *Pst*I, *Nat*I, *Exm*II, *Eco*RI, *Xba*I, *Sma*I și porțiune de clonare *Bam*HI; (Summers și Invitrogen) și *pBlue Bac*III (*Bam*HI, *Bgl*III, *Pst*I, *Nco*I) și porțiune de clonare *Hind*III, cu screeningul posibil recombinant albastru/alb; (Invitrogen) și vectorii de transfer, fuziune, cum sunt, fără a se limita la aceștia, *pAc700* (*Bam*HI și porțiunea de clonare *Kpn*I, în care porțiunea de recunoaștere *Bam*HI începe cu codonul de inițiere; Summers), *pAc701* și *pAc702* (același ca *pAc700*, cu diferența în cadru de citire), *pAc360* (*Bam*HI) porțiunea de clonare, cu perechea de bază 36 în partea inferioară a codonului de inițiere a polihedrinei; Invitrogen (195) și *pBlueBac His A, B, C* (trei cadre diferite de citire, cu *Bam*HI, *Bgl*III, *Pst*I, *Nco*I și porțiunea de clonare *Hind*III, o polipeptidă N-terminal pentru ProBond purificare și screeningul recombinant pe plăci, albastru/alb; (Invitrogen (220)).

Vectorii de exprimare la mamifere, studiați pentru utilizare conform prezentei invenții, includ promotorii, cum ar fi dihidrofolat reductaza promotor (DHFR), de exemplu orice vector de exprimare cu un vector de exprimare. DHFR sau un vector DHFR/metotrexat, de amplificare, cum ar fi *pED* (*Pst*I, *Sal*I, *Sma*I și porțiunea de clonare *Eco*RI, cu un vector care exprimă atât gena clonată, cât și *DHFR*; vezi Kaufman, *Ourrent Protocols în Molecular Biology*, 16,12 (1991). Alternativ, un vector co-amplificator de glutamin sintetază/metionină sulfoximină, cum este *pEEI4* (*Hind*III, *Xba*I, *Sma*I, *Sba*I și *Bcl*I ca parte de clonare, în care vectorul exprimă glutamin sintaza și gena clonată; Celltech.) Într-un alt aspect, un vector care direcționează exprimarea epizomală sub control *EBV-Epstein Barr Virus* poate fi utilizat ca, de exemplu, o porțiune de clonare *pREP4* (*Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Nat*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II și *Kpn*I), promotorul constitutiv *RSV-LTR*, markerul selectabil higromicină; (Invitrogen), *pMEP4* (*Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Nat*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *pvu*II și *Kpn*I) ca porțiuni de clonare, gena imediat apropiată consecutivă *hJMV*, markerul selectabil de higromicină; (Invitrogen), *pMEP4* (*Kpn*I, *Pvu*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, *Bam*HI ca porțiune de clonare, promotorul genei *Ila* metalotioneină inducibilă, markerul selectabil de higromicină; (Invitrogen), *pREP8* (porțiunea, de clonare *Bam*HI, *Xho*I, *Not*I, *Hind*III, *Nhe*I și *Kpn*I, promotorul *ESV-LTR*, markerul selectabil histidinol; Invitrogen), *pREP9* (porțiunea de clonare *Kpn*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nat*I, *Xho*I, *Sfi*I și *Bam*III) promotorul *RSV-LTR*, *G418* ca marker selectabil; (Invitrogen) și *pEBVHis* (promotorul *RSV-LTR*, markerul selectabil de higromicină, peptidă N-terminală purificabilă per

RO 121036 B1

rezină ProBond și clivată prin enterochinază; (Invitrogen). Exprimarea vectorilor mamiferelor, selectabili pentru utilizare în prezenta invenție, include *pRc/CMV* (porțiunea de clonare *Hind III*, *BstXI*, *NotI*, *Shal* și *Apal*, selecția G418; (Invitrogen), *pRc/RSV* (porțiunea de clonare *HindIII*, *SpeI*, *BstXI*, *NotI*, *XbaI*, selecția G418; (Invitrogen) și altele. Vectorii de exprimare pentru mamifere, vaccinia virus (vezi Kaufman 1991, de mai sus) pentru utilizare conform invenției, include dar fără a se limita la aceasta, *pSCII* (partea de clonare *SmaI*, *TK* și selecția β -gal), *pMJ601* (porțiunea de clonare *Sall*, *SmaI*, *AflI*, *NarI*, *BspMII*, *BamHI*, *Apal*, *NheI*, *SacII*, *KpnI* și *HindIII* selecția *TK*- și β -gal) și clonarea în porțiunea *pTKgptFIS* (*EcoRI*, *PstI*, *Sall*, *AclI*, *HindII*, *SbaI*, *BamHI* și *Pha*, selecția *TK* sau *XPRT*). Sistemele de exprimare în drojdie pot fi așadar utilizate conform prezentei invenții pentru exprimarea polipeptidei *ob*. De exemplu, vectorul de nefuziune *pYES 2* (porțiunea de clonare *XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NatI*, *GstXI*, *EcoRI*, *BstXI*, *BamHI*, *SacI* și *HindIII*; (Invitrogen) sau fuziunea *pYESHisA, B, C* (porțiunea de clonare *XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NotI*, *BstXI*, *EcoRI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI* și *HindIII*), peptida cu N-terminal este purificată cu rezina ProBond și clivată cu enterochinază (Invitrogen) pentru a se menține numai două, acestea putând fi întrebuințate conform prezentei invenții. În continuare apare intenția ca analogii peptidei modulatorie a greutății corporale, să fie preparați din secvențe de nucleotide derivate în scopul prezentei invenții.

În plus, pentru exprimarea recombinării la a polipeptidei *ob*, prezenta invenție prezintă și permite prepararea polipeptidei *ob* sau a fragmentelor acesteia, utilizând tehnici superior dezvoltate și bine cunoscute pentru sinteza peptidei în fază solidă. Invenția studiază atât Boc popular, cât și Fmoc popular care se utilizează la fel cu alte tehnici a grupărilor de protecție, pentru prepararea polipeptidei sau fragmentelor acesteia. Tehnici diferite pentru remultiplicarea și oxidarea catenelor secundare de cisteină, pentru a se forma o legătură bisulfurică, sunt bine cunoscute în domeniu.

Anticorpi ai polipeptidei *ob*

Conform prezentei invenții, polipeptida *ob* produsă recombinant sau prin sinteză chimică și fragmentele sau derivații sau analogii acesteia incluzând proteinele de fuziune, se pot utiliza ca produse imunogene pentru a genera anticorpii de recunoaștere a polipeptidei *ob*. Astfel de anticorpi includ, dar fără a se limita la acestea, fragmentele *Fab* cu o singură catenă, himere, monoclonale, policlonale și colecția de exprimare *Fab*. O moleculă este "antigenă" atunci când este capabilă de o interacțiune specifică cu o moleculă antigenă de recunoaștere a sistemului imunitar, cum ar fi o imunoglobulină (anticorp) sau receptor antigenic celular T. O polipeptidă antigenă conține cel puțin aproximativ 5 și de preferință cel puțin aproximativ 10 aminoacizi. Porțiunea antigenă a moleculei poate fi acea porțiune care este imunodominantă pentru anticorp sau receptorul celular de recunoaștere T sau acesta poate fi o porțiune utilizată pentru generarea anticorpului la moleculă, prin conjugarea porțiunii antigenice la molecula suport pentru imunizare. O moleculă antigenă nu este necesar ca să fie ea însăși imunogenă, adică să fie capabilă de elicitarea răspunsului imun, fără un suport.

Un "anticorp" este o imunoglobulină, incluzând anticorpii și fragmentele lor, care se leagă la epitopul specific. Termenul cuprinde anticorpi himerici, monoclonali și policlonali, dintre care, anticorpii himerici sunt descriși cu mai multe detalii în **US 4816397** și **4816567**, ca și porțiunile de legături antigenice ale anticorpilor, incluzând *Fab*, *F(ab')₂* și *F(v)* (incluzând anticorpii cu catene simple). În acest sens, fraza de "moleculă anticorp" în forme gramaticale diferite așa cum se utilizează aici, se referă atât la molecula de imunoglobulină intactă, cât și la o porțiune activă imunologic din molecula de imunoglobulină conținând porțiunea de combinare a anticorpului.

O "porțiune de combinare a anticorpului" este o porțiune structurală din molecula anticorpului care cuprinde o catenă grea și o catenă ușoară variabilă și regiuni hipervariabile care leagă specific antigenul. Moleculele anticorp exemplificatoare sunt molecule de imunoglobulină intacte, molecule de imunoglobulină substanțial intacte și acele porțiuni de moleculă de imunoglobulină care conțin paratipul, incluzând porțiunile cunoscute în domeniu, ca Fab, Fab', F(ab)₂ și F(v), porțiuni care sunt preferate pentru utilizare în metodele terapeutice descrise aici. Porțiunile Fab și F(ab')₂ ale moleculelor de anticorp sunt preparate prin reacția proteolitică a papainei și respectiv pepsinei, asupra moleculelor de anticorp intact substanțial, prin metode care sunt bine cunoscute. Vezi, de exemplu, **US 4342566**, Theofilopolpus și colab. Porțiunile moleculei de anticorp Fab' așadar binecunoscute și sunt produse de porțiunile F(ab')₂ apoi reducerea legăturilor bisulfurice care leagă cele două porțiuni din catenă grea, cu mercaptoetanolul, după care urmează alchilarea mercaptan proteinei rezultate, cu un reactiv cum ar fi iodacetamida. Se preferă un anticorp care conține moleculele de anticorp intacte. Faza "anticorp monoclonal" în diferitele ei forme gramaticale, se referă la un anticorp având numai o specie de anticorp a cărei porțiune de combinare este capabilă de reacție imunologică cu un antigen special. Un anticorp monoclonal prezintă în mod tipic o singură legătură de afinitate pentru oricare antigen, cu care acesta imunoreacționează. Un anticorp monoclonal poate să conțină deci o moleculă de anticorp având o pluralitate de porțiuni de combinare a anticorpului, fiecare fiind imunospecifică pentru diferiți antigeni, de exemplu un anticorp monoclonal bispecific (himeric). Termenul de "adjuvant" se referă la un compus sau la un amestec care cuprinde un răspuns imun la un antigen. Un adjuvant poate să servească ca depozit tisular care eliberează lent antigenul și astfel este un sistem activator limfoid care cuprinde răspunsul imun, nespecific (Hood și colab. în *Immunology*, p.384, second ed., Benjamin/Cummings, Menlo Park, California (1984)). Adesea, o primă încercare numai cu un antigen, în absența unui adjuvant, va conduce la elicitarea răspunsului imun celular sau umoral. Adjuvanții includ, dar fără a se limita la aceștia, adjuvantul complet Freund, adjuvantul incomplet Freund, saponina, gelurile minerale cum ar fi hidroxidul de aluminiu, agenții tensioactivi cum sunt lizolecitina, polioli pluronici, polianionii, peptidele, emulsiile uleioase sau hidrocarbonate, hemocianinele limpet canelurate, dinitrofenolul și adjuvanții umani, potențial folositori ca BCG (bacille Calmette-Guerin) și *Corynebacterium parvum*. De preferință, adjuvanții sunt acceptabili farmaceutici. Diferitele procedee cunoscute în domeniu, pot fi utilizate pentru producerea anticorpilor policlonali la polipeptida *ob* sau fragmente, derivați sau analogi ai acestora. Pentru producerea unui anticorp, diferitele animale gazdă pot fi imunizate prin injectarea cu polipeptida *ob* sau a derivatului acesteia (de exemplu, proteina de fuziune sau un fragment al acesteia), incluzând, dar fără a se limita, la iepuri, șoareci, șobolani, oi, capre etc). Într-un alt aspect, polipeptida *ob* sau fragmentele acesteia pot fi conjugate la suportul imunogen, de exemplu albumina serică bovină (BSA) sau hemocianina limpet canelurată (KLH). Diferiți adjuvanți pot fi utilizați pentru creșterea răspunsului imun în funcție de speciile de celule gazdă, incluzând fără a se limita la, adjuvanții Freund (complet sau/și incomplet), geluri minerale, cum ar fi hidroxidul de aluminiu, substanțe tensioactive ca lizolecitina, polioli pluronici, polianionii, peptidele, emulsiile uleioase, hemocianinele limpet canelurate, dinitrofenolul și adjuvanți umani potențial folositori, cum sunt BCG (bacille Calmette-Guerin) și *Corynebacterium parvum*. Pentru prepararea anticorpilor monoclonali dirijați către polipeptida *ob*, fragmentele, analogii sau derivații acesteia, se poate utiliza orice tehnică care prevede producerea moleculelor de anticorpi, prin linii celulare continue, în cultură. Acestea includ, dar fără a se limita la tehnica hibridoma, dezvoltată original de Kohler și colab. *Mature*, 256: 495-497 (1975), ca și tehnica trioma, tehnica hibridoma cu celule B umane (Kozbor și colab., *Immunology Today*, 4: 72 (1983) și tehnica

hibridoma EBV, pentru a se produce anticorpii monoclonali umani (Cole și colab. în *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp.77-96, Alan, R. Liss.-Lnc (1985)). Liniile celulare durabile de producere a anticorpilor, pot fi create prin tehnici diferite de tehnica fuziunii, cum ar fi tehnica de transformare directă a limfocitelor B, cu ADN oncogenic sau transfecția cu virusul Epstein-Barr. A se vedea de exemplu M. Schreier și colab. *Hybridoma Techniques* (1980); Hammerling și colab. " *Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas*" (1981); Kennett și colab. " *Monoclonal Antibodies*" (1980); vezi așadar **US 4341761; 4399121; 4427783; 4444887; 4451570; 5466917; 4472500; 4491632 și 4493890.**

Într-un aspect preferat al prezentei invenții, anticorpii monoclonali pot fi produși la animalele fără germeni, utilizând o tehnică recentă (**PCT/US 90/02545**). Conform prezentei invenții, anticorpii umani pot fi utilizați și pot fi obținuți prin utilizarea de celule hibridoma umane (Cote și colab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2026-2023 (1983) sau prin transformarea celulelor B umane cu virusul RBV *in vitro* (Cole și colab., 1985, de mai sus). De fapt, conform prezentei invenții, tehnicile dezvoltate pentru producerea de "anticorpi himerici" (Morrison și colab., *J. Bacteriol.* 159-870 (1984); Neuberger și colab. *Nature* 312: 604-608 (1984); Takeda și colab. *Mature*, 314: 452-454 (1985)) prin legarea genelor de la molecula specifică de anticorp de șoarece, pentru polipeptida *ob* la un loc cu genele de la molecula de anticorp uman cu o activitate biologică convenabilă, se pot utiliza astfel de anticorpi sunt în scopul prezentei invenții. Astfel de anticorpi himerici umani sau umanizați sunt preferați pentru utilizare în terapia bolilor sau disfuncții umane (descrise aici), deoarece anticorpii umani sau umanizați sunt mult mai puțin asemănători față de anticorpii xenogenici, pentru a induce un răspuns imun, în special un răspuns alergic, prin ele însele. Potrivit prezentei invenții, tehnicile descrise pentru producerea anticorpilor cu catenă simplă (**US 4946778**) pot fi adaptate pentru producerea anticorpilor cu o singură catenă specifică polipeptide *ob*. Un aspect suplimentar a prezentei invenții, utilizează tehnicile descrise pentru construcția colecțiilor de exprimare Fab (Huse și colab., *Science*, 246:1275-1281 (1989), pentru a permite o identificare rapidă și ușoară a fragmentelor Fab monoclonale, cu specificitatea dorită pentru polipeptida *ob* sau a derivaților sau analogilor acestora. Fragmentele de anticorpi care conțin idiotipul moleculei de anticorp, poate fi generat prin tehnici cunoscute. De exemplu, astfel de fragmente, care includ, dar fără a se limita la acestea, fragmentul $F(ab')_2$ care poate fi produs de pepsina de digestie a moleculei de anticorp; fragmentele de Fab' care pot fi generate prin reducerea punților bisulfurice ale fragmentelor $F(ab')_2$ și fragmentelor Fab care pot fi generate prin tratarea moleculei de anticorp cu papaină și cu agentul de reducere. În producerea anticorpilor, screeningul pentru anticorpii doriti, poate fi însoțit de tehnici cunoscute în domeniu, de exemplu prin radio imunoanaliza ELISA (analiza imunosorbantă cu legare enzimatică), imunoanalizele de tip "Sandwich", analizele imunoradiometrice reacțiile de precipitare, difuziune în gel, analizele de imunodifuziune, imunoanalizele *in situ* (utilizând, de exemplu, marcarea radioizotopă sau enzimată, marcate cu aur coloidal etc.), analize de absorbție Western, reacții de precipitare, analize de aglutinare (de exemplu, analize de aglutinare a gelului, analize de hemaglutinare), analize de fixare a complementului, analize de imunofluorescență, analize cu proteina A și analize de imunolectroforeză etc. Într-o întrupare a prezentei invenții, anticorpii de legătură este găsit prin detectarea marcajului pe anticorpii primari. Într-un alt aspect, anticorpii primari este detectat prin legătura de detectare a anticorpului secundar sau a reactivului la anticorpii primari. Într-un alt aspect, anticorpii secundari este marcat. Se cunosc în domeniu multe mijloace pentru detectarea legăturii într-o liză și care este în scopul prezentei invenții. De exemplu, selectarea anticorpilor care determină recunoașterea unui epitopic al polipeptidei *ob* se poate utiliza analiza care generează hibridom, pentru produsul care se leagă la polipeptida *ob*, fragmentul care conține acest

epitop. Pentru selectarea unui anticorp specific unei polipeotide *ob* dintr-o specie anumită de animal, acesta poate fi selectat pe baza unei legături pozitive cu polipeptida *ob* exprimată prin, sau izolată din celulele acestei specii de animal. Anticorpii menționați, pot fi utilizați în metodele cunoscute în domeniu, cu referire la localizarea și activitatea polipeptidei *ob*, de exemplu, prin analiza de absorbție Western, formarea de imagine a polipeptidei *ob in situ* măsurarea nivelelor acestora în probe fiziologice convenabile etc.

Într-un aspect specific pot fi generați, anticorpii care agonizează sau antagonizează activitatea polipeptidei *ob*. Astfel de anticorpi, pot fi testați utilizând analizele descrise aici pentru ligandii de identificare.

Într-un aspect specific anticorpii sunt dezvoltați prin imunizarea iepurilor cu peptide sintetice, prevăzute de secvența de proteină sau cu proteine recombinante, realizate prin utilizarea vectorilor de exprimare bacteriană. Alegerea peptidei sintetice este realizată după analiza structurii proteinei prevăzute, așa cum s-a descris mai sus. În special, sunt alese secvențele de peptide între porțiunile putative de clivaj. Peptidele sintetice sunt conjugate la un suport cum ar fi KLH homocianină sau BSA, utilizând carbodiimida și utilizând adjuvantul Freund pentru imunizarea iepurilor. În vederea preparării proteinei recombinante, vectorul *pGEX*, poate fi utilizat pentru exprimarea polipeptidei (Smith și colab., 1988, prezentat mai sus). Alternativ, acesta se poate utiliza numai în domenii hidrofile, pentru a genera fuziunea proteinei. Proteina exprimată, va fi preparată cantitativ și utilizată pentru imunizarea iepurilor în adjuvantul Freund. Într-un alt aspect specific, polipeptida recombinantă *ob* este utilizată pentru imunizarea puiilor de găină și a anticorpilor anti-*ob* de pui de găină, care sunt separați din gălbenușul de ou, de exemplu, prin purificare proteinei *ob* pe baza finității. De preferință, puii de găină utilizați la imunizare sunt menținuți în condiții specifice fără patogeni (SPF). Într-o altă întrupare, anticorpii pentru leptină sunt generați la șoarece *ob/ob*, la care este absentă proteina *ob* de circulație și astfel, aceștia sunt așteptați a fi capabili pentru generarea răspunsului polipeotidei anti-*ob*, deoarece aceștia nu vor fi tolerați de polipeptidă și șoarecii de tip sălbatic celulele splenice din ambele grupe de șoareci, pot fi fuzionate cu celulele myeloma, pentru prepararea de hybridomas pentru anticorpii monoclonali. Într-un alt aspect, polipeptidele *ob* recombinante se utilizează pentru imunizarea iepurilor și anticorpii policlonali sunt purificați înainte de o altă utilizare. Anticorpii purificați sunt utilizați în special pentru analizele semicantitative, în special pentru detectarea prezenței polipeptidei *ob* de circulație în ser sau plasmă.

Anticorpii monoclonali produși din tabele, față de peptidele modulatorie, pot fi sortați pe baza diferitelor proprietăți, de exemplu, izotip, epitop, afinitate etc. Anticorpii monoclonali sunt de un interes special, pentru neutralizarea activității peptidelor modulatorie. Astfel de anticorpi monoclonali pot fi identificați cu adevărat ca modulatori de greutate în analizele pentru activitatea acestora. Anticorpii cu afinitate superioară sunt așadar utili atunci când este posibilă purificarea prin imunoafinitate a modulatorului recombinant sau nativ. De preferință, anticorpii anti-modulator utilizați în metodele de diagnostic și terapie conform prezentei invenții, este un anticorp policlonal purificat prin afinitate. În plus, este de preferat ca, moleculele utilizate pentru anticorpii antimodulatori, să fie sub formă de porțiuni Fab, Fab', F(ab')₂ sau F(v) ale întregilor molecule de anticorpi.

Implicațiile de diagnostic

Prezenta invenție se mai referă la o diversitate de aplicații de diagnostic, incluzând metodele pentru detectarea prezenței condițiilor și/sau stimulilor care influențează anormalitățile greutății corporale sau a adipozității, prin referințe în ceea ce privește capacitatea acestora de a elicită activitățile care sunt mediate prin modulatorii prezenți. Așa cum s-a menționat mai sus, peptidele modulatorie de greutate pot fi utilizate pentru producerea

RO 121036 B1

anticorpilor în ele însele, printr-o varietate de tehnici cunoscute și astfel de anticorpi ar putea fi apoi izolați și utilizați ca în testele pentru prezența unei activități speciale de transcriere în celulele țintă suspectate. În mod alternativ, acizii nucleici conform prezentei invenții, pot fi utilizați în diagnostic.

Diagnoza pe bază de anticorp

Așa cum s-a sugerat mai înainte, o metodă de diagnostic utilă din prezenta invenție cuprinde examinarea unei probe sau al unui mediu celular cu ajutorul unei analize, incluzând o cantitate efectivă de antagonist față de proteina modulator, cum ar fi un anticorp antimodulator, de preferință un anticorp policlonal purificat prin afinitate și mult mai preferabil un mAb. În plus, este preferabil ca, pentru moleculele de anticorpi anti-modulatoare utilizate aici să fie, de exemplu, sub formă de porțiuni de Fab, Fab', F(ab')₂ sau V(v) sau de molecule de anticorpi, întregi. Așa cum s-a discutat mai înainte, pacienții capabili de a beneficia de această metodă, incluzând pe cei suferind de cancer, SIDA, obezitate sau alte condiții de anormalitate a greutateii corporale, reprezintă un element sau un factor caracteristic. Metodele pentru izolarea modulatorului și inducerea anticorpilor anti-modulatori și pentru determinarea și optimizarea abilității anticorpilor anti-modulatori, pentru a ajuta la examinarea celulelor țintă, sunt bine cunoscute în domeniu. Așadar, anticorpii care includ atât anticorpii policlonali cât și anticorpii monoclonali și medicamentele care modulează producerea sau activitatea modulatorilor de control al greutateii și al altor factori de recunoaștere și/sau a subunităților acestora, pot poseda anumite aplicații de diagnostic și pot fi utilizați, de exemplu, în scopul de detectare și/sau măsurare a condițiilor de anormalitate a greutateii corporale, putând fi dezvoltate în mod asemănător. De exemplu, peptidele modulatoare sau fragmentele active ale acestora, pot fi utilizate pentru a se produce atât anticorpi policlonali, cât și anticorpi monoclonali pentru ele însele, într-o varietate de medii celulare, de tehnici cunoscute, cum ar fi de exemplu utilizarea tehnicii hybridoma în limfocitele fuzionate din splina de șoarece și celule myeloma. Aceste tehnici sunt descrise în detalii, în continuare. În mod asemănător, moleculele mici, care mimează sau antagonizează activitatea, sau activitățile factorilor de recunoaștere a receptorilor conform prezentei invenții, pot fi descoperiți și sintetizați, și pot fi utilizați în protocoalele de diagnostic și/sau terapie.

Prezența modulatorilor de greutate în celule, poate fi stabilită prin procedee imunologice uzuale aplicabile la aceste determinări. Se cunoaște un număr de astfel de procedee utile. Trei din aceste procedee care sunt utile în mod special, utilizează fie un factor de recunoaștere a receptorului marcat cu un marcaj detectabil, un anticorp Ab₁, marcat cu un marcaj detectabil sau anticorpul Ab₂, cu un marcaj detectabil. Procedeele pot fi sumarizate prin următoarele ecuații în care asteriscul indică marcarea acestei particole și "WM" reprezintă modulatorul de greutate:

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

$$B. \quad WM + Ab^* = WM Ab_1^*,$$

$$C. \quad WM + Ab_1 + Ab_2^* = Ab_1 WM Ab_2^*$$

Procedeele și aplicațiile acestora sunt cunoscute în domeniu și în acest sens pot fi utilizate în scopul prezentei invenții. Procedeu "competitiv", Procedeu A, este descris în **US 3654090** și **3850752**. Procedeu B este reprezentativ pentru tehnici de analiză competitive, cunoscute. Procedeu C, procedeu "sandwich", este descris în **US RE 31006** și **4016043**. De asemenea, sunt cunoscute alte procedee cum ar fi procedeu "anticorp dublu" sau DASP.

În fiecare caz, modulatorii de greutate din complexii cu unul sau mai mulți anticorpi sau parteneri de legătură și un membru al complexului, este marcat cu un marcaj detectabil. Faptul că s-a format un complex, dacă se dorește, se poate determina cantitatea acestuia, prin metode cunoscute aplicabile pentru detectarea acestui marcaj. Din cele de mai sus se poate vedea că proprietatea caracteristică a Ab_2 este că aceasta va reacționa cu Ab_1 . Aceasta este datorită faptului că Ab_1 , care se dezvoltă într-o specie de mamifere, a fost utilizat într-o altă specie ca antigen, pentru dezvoltarea anticorpului Ab_2 . De exemplu, Ab_2 se poate dezvolta la capre, utilizând ca antigeni, anticorpi de iepure. Ab_2 va fi așadar un anticorp antiiepure, dezvoltat la capre. Pentru scopurile acestei descrieri și pentru revendicări, Ab_1 se va referi la anticorpul primar sau la anticorpul antimodulator de greutate și Ab_2 va fi preferat la un al doilea anticorp anti- Ab_1 .

Marcajele cele mai comune utilizate pentru aceste studii sunt elemente radioactive, enzime, substanțe chimice fluorescente prin expunere la lumină ultravioletă și altele.

Un număr de materiale fluorescente sunt cunoscute și pot fi utilizate pentru astfel de marcaje. Acestea includ de exemplu, fluoresceina, rodamina și auramina. Materialul special de detectare este anticorpul anti-iepure preparat la capre și conjugat cu fluoresceina, cu ajutorul unui izotocianat. Modulatorii de greutate sau partenerii de legare a acestora, pot fi așadar marcați cu elemente radioactive sau cu o enzimă. Marcajul radioactiv poate fi detectat prin oricare dintre procedeele de numărare curențe, convenabile. Izotopul preferat, poate fi selectat dintre ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}F , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I și ^{186}Re .

Enzimele pentru marcare sunt, de asemenea, folosite și pot fi detectate prin oricare tehnică utilizată în prezent, colorimetrică, spectrofotometrică, fluorospectrofotometrică, amperometrică sau gazometrică. Enzima este conjugată la particula selectată prin reacția cu moleculele la care aceasta se leagă, cum ar fi, de exemplu, carboimideie, diizocianatii, glutaraldehida și altele. Multe enzime care pot fi utilizate în aceste procedee sunt cunoscute și pot fi utilizate. Preferate sunt peroxidaza, β -glucuronidaza, β -D-glucozidaza, β -D-galactozidaza, ureaza, glucozoxidaza plus peroxidaza și fosfataza alcalină. **US 3654090**, **3850752** și **4016043** se referă la aceste enzime, la metodele și materialul adițional de marcare. Potrivit unui alt aspect al prezentei invenții, kiturile de testare pentru utilizarea lor de către un specialist în domeniul medical pot fi preparate pentru determinarea prezenței sau absenței activității de transcriere predeterminată sau a activității capacității de transcriere predeterminată în celulele țintă suspectate. Potrivit cu tehnicile de testare discutate mai sus, o clasă de astfel de kituri, va conține cel puțin modulatorul de greutate marcat sau partenerul de legătură al acestuia, de exemplu, un anticorp specific și direcțiile, desigur dependent de metoda selectată, de exemplu, "competitiv", "Sandwich", "DASP" și altele. Aceste kituri pot conține așadar, reactivi periferici cum sunt stabilizatorii, soluțiile tampon, etc.

În acest sens, kitul de testare poate fi preparat pentru demonstrarea prezenței sau capacității celulelor, pentru o activitate de transcriere predeterminată, cuprinzând:

(a) o cantitate predeterminată din cel puțin un component reactiv imunochimic marcat, obținut printr-o legătură directă sau indirectă a modulatorului de greutate prezent sau a partenerului de legare specifică la marcajul detectabil;

(b) alți reactivi; și

(c) direcțiile pentru utilizarea acestor kituri.

Mult mai specific, kitul de testare diagnostică poate cuprinde: (a) o cantitate cunoscută de modulator de greutate așa cum s-a descris mai sus (sau partener de legătură), care este, în general, legat la faza solidă, pentru a forma un imunosorbant sau alternativ, la un capăt convenabil sau la produse cu mai multe astfel de capete etc. (sau partenerii lor de legătură) unul din fiecare, (b) dacă este necesar, alți reactivi; și (c) direcțiile de utilizare ale acestor kituri de testare.

RO 121036 B1

Într-un alt mod, kitul de testare poate fi preparat și utilizat pentru scopurile menționate mai sus, care se operează conform unui protocol predeterminat (de exemplu "competitiv", "sandwich", "anticorp dublu", etc.) și cuprinde:

- (a) o componentă de marcare care a fost obținută prin cuplarea modulatorului de greutate, la marcajul detectabil;
- (b) unul sau mai mulți reactivi imunochimici adiționali, din care cel puțin un reactiv este ligand sau un ligand imobilizat, ligand care este selectat dintr-o grupă care constă din:
 - (i) un ligand capabil de legare cu un component marcat (a);
 - (ii) un ligand capabil de legare cu partenerul de legătură al componentei marcate (a);
 - (iii) un ligand capabil de legare cu cel puțin un component care trebuie determinat și
 - (iv) un ligand capabil de legare cu cel puțin un partener de legătură a cel puțin unui component (componente) care trebuie determinat și
- (c) direcțiile pentru realizarea protocolului pentru detectarea și/sau determinarea unui component sau a mai multor componente a reacției imunochimice între modulatorul de greutate și partenerul de legare specifică a acestuia.

Diagnoza pe bază de acid nucleic

Așa cum s-a demonstrat în exemple prezentate aici, acizii nucleici ai prezentei invenții pot fi utilizați pentru detectarea defectelor asociate cu defectele polipeptidei *ob* care rezultă în fenotipurile obeze. De exemplu, probele de acid nucleic (de exemplu, analiza Northern sau analiza RT-PCR), se pot utiliza pentru determinarea fenotipului obez care este asociat cu absența exprimării ARNm de *ob* sau a exprimării ARNm de *ob* nefuncționale, de exemplu, ca în cazul *db/db* la șoareci (în care deficiența rezultă din absența receptorului *ob*) sau acolo unde o mutație, produce un ARNm netranscris. Mai mult decât atât, tehnicile de diagnostic pe bază de acid nucleic, conform prezentei invenții, pot fi utilizate în combinație cu tehnicile bazate pe anticorpi, pentru a înțelege mai departe structura moleculară a fenotipurilor obeze și anorexice. Clonele ADNc umane care au fost recent izolate, au fost secvențate, așa cum s-a menționat aici. Aceasta, facilitează determinarea secvenței complete a genei umane (vezi fig. 20 A până la SECV. ID Nr.22). Secvențele de ADN din intronii genei umane *ob*, au fost obținute (fig. 20) și au fost utilizate pentru prepararea primerilor PCR, pentru a amplifica PCR în secvența de codificare a genei *ob* din ADN-ul genomic, identificându-se astfel mutațiile sau variantele alelice a genei *ob*, toate în conformitate cu protocolul descris în continuare în detaliu. Primerii PCR specifici pentru amplificarea *ob* genomic uman, sunt descriși în exemplul specific, inclusă aici. Ipoteza curentă este că, mutațiile de heterozigoți în gena *ob* vor fi asociate cu diferitele teste de diagnostic pe baza secvenței ADN pentru obezitate. Dacă aceasta este adevărată, se va permite deci stabilirea riscului de dezvoltare a obezității la individ și se face posibilă aplicarea tratamentului medicamentos și/sau schimbările în stilul de viață, înainte ca greutatea corporală crescută să fie complet dezvoltată.

Alternativ, prezența microsateliților care segregă cu formele de mutanți ale *ob* umane poate fi utilizată pentru diagnoză. Diferenții primeri PCR, incluzând pe cei bazați pe secvența de nucleotidă, sunt prevăzuți în fig. 20 A până la C, putând fi utilizați în acest scop. Gena *ob* poate fi așadar folositoare în diagnoza măsurătorilor ARN-ului și proteinei conținute, în ceea ce privește tulburările nutriționale. Aceasta va fi important să fie cunoscut într-o tulburare nutrițională specială, atunci când ARN *ob* și/sau proteina conținută este neregulată sau având o reglare inferioară. Astfel, dacă o persoană obeză are nivelele de *ob* crescute, se pare că problema este dependentă de partea inferioară a *ob*, în timp ce, dacă *ob* este redusă, se pare că, nivelele scăzute necorespunzător pentru *ob*, pot constitui cauza obezității (dacă defectul este sau nu legat de gena *ob*). În sens invers, dacă pacientul suferind de cancer sau SIDA cu pierdere în greutate are nivele ridicate de *ob*, se ajunge la concluzia că

exprimarea superioară necorespunzătoare a *ob* este responsabilă de pierderea în greutate. ADNc-ul uman clonat va fi utilizat pentru măsurarea nivelelor de ARN *ob* uman. În plus, proteina umană recombinantă, va fi preparată și utilizată pentru dezvoltarea imunoanalizelor care permit măsurarea nivelelor de grăsime și posibil, de plasmă ale proteinelor *ob*.

Implicații terapeutice

Polipeptidele, acizii nucleici și anticorpii prezentei invenții, au un potențial terapeutic semnificativ. De preferință, o cantitate eficientă terapeutic din acest agent, este administrată într-un purtător, diluant sau excipient acceptabil farmaceutic.

Fraza "acceptabil farmaceutic" se referă la entități și compoziții moleculare care sunt tolerabile fiziologic și care nu produc o reacție alergică tipică sau o reacție similară dificilă, cum ar fi o tulburare gastrică, vertij și altele, când se administrează la om. De preferință, așa cum se utilizează aici, termenul de "acceptabil farmaceutic" înseamnă că este aprobat de Agenția de Reglementări Federală sau Guvernul de Stat sau care este menționat în U.S. Pharmacopeia sau alte farmacopei în general recunoscute pentru utilizare la animale și mult mai special, la oameni. Termenul de "purtător" se referă la un diluant, adjuvant, excipient sau purtător, cu care compusul este administrat. Astfel de purtători farmaceutici pot fi lichide sterile, cum ar fi apa sau uleiurile, incluzând pe cele de petrol, animale, vegetale sau de origine sintetică, cum ar fi uleiul de arahide, uleiul de soia, uleiul mineral, uleiul de susan și altele. Apa sau soluțiile saline și soluțiile apoase de dextroză și soluțiile de glicerol, sunt preferate pentru se utiliza ca purtători, în special pentru soluțiile injectabile. Purtătorii farmaceutici convenabili sunt descrise în Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18 th Ec, Mack Publishing (Co., Easton, PA (1990).

Fraza "cantitate eficientă terapeutic" este utilizată aici pentru a preciza cantitatea suficientă pentru a reduce cu cel puțin aproximativ 15%, de preferință cu cel puțin 50%, mult mai preferabil cu cel puțin 90% și cel mai preferabil pentru a preveni un deficit clinic semnificativ în activitatea, funcția și răspunsul organismului gazdă. Alternativ, o cantitate eficientă terapeutic este suficientă pentru a cauza o îmbunătățire în starea clinică semnificativă a organismului gazdă. Administrarea polipeptidei *ob* recombinante are ca rezultat în special, descreșterea grăsimilor tisulare. Polipeptida *ob* poate fi preparată, utilizând vectori de exprimare standard, bacterieni sau/și de mamifere, sintetici sau purificați din plasmă sau din ser toate fiind menționate în detaliu, ca mai sus. Alternativ, exprimarea crescută a polipeptidei *ob* native, poate fi indusă prin tehnici recombinante omoloage, așa cum s-a descris mai sus.

Reducerea activității polipeptidei *ob* (prin dezvoltarea antagoniștilor, inhibitorilor, utilizarea anticorpilor de neutralizare sau moleculelor antisens) va rezulta în câștigul de greutate care poate fi dorit pentru tratamentul pierderilor în greutate asociate cu cancerul, SIDA sau anorexia nervoasă. Modularea activității *ob* poate fi utilă pentru reducerea greutateii corporale (prin creșterea activității scesteia) sau pentru creșterea greutateii corporale (prin scăderea activității acesteia).

Tratamentul terapeutic pe bază de polipeptide

Prin cea mai simplă analiză, gena *ob* determină greutatea corporală la mamifere, în special la șoareci și la om. Produsul genetic *ob* și corespunzător moleculele anoloage, apar ca făcând parte din modul de semnalizare prin care țesutul adipos comunică cu creierul și cu alte organe. Se crede că polipeptida *ob* este ea însăși o moleculă de semnalizare, de exemplu un hormon. Polipeptida *ob* sau un fragment funcțional al acesteia sau antagonistul acesteia, poate fi administrat oral, sau parenteral, de preferință parenteral. Deoarece homeostaza metabolică este un proces continuu, se preferă administrarea cu eliberare controlată a polipeptidei *ob*. De exemplu, polipeptida poate fi administrată utilizând infuzia intravenoasă, o pompă osmotică implantabilă, un emplastru transdermal, lipozomi sau alte moduri de

administrare. Într-o întruchipare, poate fi utilizată o pompă (Langer și colab. eds., Medical Applications of Controlled Release CRC Press, Boca Raton Florida (1974); Sefton, CRC CRIT. Ref. *Biomed. Eng.* 14 : 201 (1987); Buchwald și colab. *Surgery* 88; 507 (1980); Sau dek și colab. *N.Engl. J.Med.* 321: 574 (1989)). Într-o altă întruchipare, materialele polimerice pot fi utilizate (Langer, 1974, așa cum s-a prezentat mai sus; Sefton, 1987, așa cum s-a prezentat mai sus; Smolen și colab., eds. *Controlled Drug Bioavailability Drug Product Design and Performance*, Wiley, New York (1984), Ranger și colab. *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23 : 61(1983); vezi așadar Levy și colab. *Science*, 228: 190 (1985); During și colab. *Ann. Neurol.* 25: 351 (1989) ; Howard și colab. *J. Neurosurg.* 71: 105 (1989)). Conform unui alt aspect, un sistem de eliberare controlată se poate plasa în proximitatea țintei terapeutice, de exemplu la creier, fiind necesară în acest caz numai o fracțiune din doza sistemică (vezi de exemplu Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, vol.2, pp.115 -138 (1984). Alte sisteme de eliberare controlată sunt discutate de către Langer în revista *Science*, 249: 1527-1533 (1990), într-un alt aspect, compusul terapeutic poate fi eliminat în veziculă, în special un lipozom (vezi Langer, 1990, supra); Treat și colab. în *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez -Berestein and Fidler (eds), Liss, New-York, pp. 353-365 (1989); Lopez -Berestein, ibid. pp. 317, 327; vezi generally ibid).

Într-un alt aspect, celulele recombinante care au fost transformate cu gena *ob* și care exprimă nivele ridicate de polipeptidă, pot fi transplantate la subiectul care necesită polipeptida *ob*. De preferință, celulele anologice transformate cu *ob* sunt transplantate pentru a se evita rejecția; alternativ, o tehnologie este convenabilă pentru a proteja celulele non-autologe care produc factori solubili în matrița polimerului, care previn rejecția și recunoașterea imună. Polipeptida *ob* poate fi administrată pe căi intravenoase, intraarteriale, intraperitoneale, intramuscular sau subcutanat. Alternativ, polipeptida *ob* cu formulare proprie poate fi administrată pe cale nazală sau orală. O furnizare constantă de polipeptida *ob* se poate asigura prin prevederea unei doze eficiente terapeutic (de exemplu, o doză eficientă pentru a induce schimbările metabolice, la subiect), la intervalele necesare, de exemplu zilnic, la fiecare 12 h etc. Acești parametri vor depinde de severitatea condiției de boală care trebuie tratată, alte acțiuni, cum ar fi modificarea dietei, care se stabilește în funcție de greutatea, vârsta și sexul subiectului și alte criterii, care vor fi în mod real determinate conform standardelor de bună practică medicală a specialiștilor în domeniu.

Compoziții farmaceutice

Conform unui alt aspect al prezentei invenții, se face referire la compozițiile farmaceutice de mai sus. Astfel de compoziții farmaceutice, pot fi utilizate pentru administrare prin injecții sau pentru administrare orală, pulmonară, nazală sau alte forme de administrare. În general, în prezenta invenție sunt cuprinse compozițiile farmaceutice care conțin cantități eficiente de proteine sau derivați de proteine ca produse ale prezentei invenții, la un loc cu diluanți, conservanți, dizolvanți, emulgatori, adjuvanți și/sau purtători acceptabili farmaceutici. Astfel de compoziții includ diluanți cu conținut diferit de substanțe tampon (de exemplu, Tris-HCl, acetat, fosfat), pH și tărie ionică; aditivii cum ar fi detergenți și agenți de solubilizare (de exemplu Tween 80, polisorbit 80), antioxidanți (de exemplu, acidul ascorbic, metabisulfitul de sodiu), conservanți (de exemplu, Thimersol, alcool benzilic) și substanțe voluminizante (de exemplu, lactoza, manitolul); încorporarea materialului în preparatele de macroparticole, ale compușilor polimerici cum ar fi acidul polilactic, acidul poliglicolic etc. sau în lipozomi se poate utiliza, de asemenea, acidul hialuronic. Astfel de compoziții pot influența starea fizică, stabilitatea, gradul de eliberare *in vivo* și gradul de clearance *in vivo* a proteinelor și derivaților prezenți. Vezi de exemplu, Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed (1990, Mack Publishing Co, Easton, PA 18042) pag 1435-1712, care sunt încorporate aici prin referințe. Compozițiile pot fi preparate sub formă lichidă sau pot fi sub formă de pulbere uscată, de exemplu ca formă liofilizată.

Administrarea pe cale orală

Pentru utilizare în prezenta invenție, sunt studiate formele de dozare orală, solide, care sunt descrise în general, în Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. (1990 Mack Publishing Co. Easton PA 18042) la capitolul 89, care este încorporat aici prin referințe. Formele de dozare solide includ tablete, capsule, pilule, trichiști sau tablete rom-bice, cașete sau pelete. Așadar, încapsularea lipozomală sau proteinoasă, poate fi utilizată pentru formularea compozițiilor prezente (de exemplu, microsfele proteinoase, reportate de **US 4925675**). Încapsularea lipozomală poate fi utilizată și lipozomii pot fi derivați, utilizând diferiți polimeri (de exemplu, **US 5013556**). O descriere a formelor de dozare posibile pentru terapie, sunt date de Marshall, în *Modern Pharmaceutics*, Cap-10, Banker and Rhodes ed. (1979), încorporate aici prin referințe. În general, formularea include proteina (sau proteina modificată chimic) și ingredientele inerte care o protejează în trecerea prin zona stomacală și astfel se permite eliberarea materialului biologic activ în intestin. Se studiază în mod speci-fic formele de dozare orale ale derivaților de proteine de mai sus. Proteina poate fi modificată chimic, astfel ca eliberarea orală a derivatului să fie eficace. În general, modificarea chimică, studiată este legarea a cel puțin o jumătate la proteină (sau peptidă) în însăși molecula acesteia, unde acea jumătate permite (a) inhibarea proteolizei; și (b) absorbția în circulația sanghină, din stomac sau intestin. Se dorește așadar, creșterea stabilității generale a pro-teinei și creșterea timpului de circulație în organism. Exemple de astfel de porțiuni, includ: polietilen glicolul, copolimerii de etilenglicol și propilenglicolul, carboximetilceluloza, dextra-nul, polivinil alcoolul, polivinil pirolidona și poliprolina. Abuchowski și colab. 1981, așa cum s-a prezentat mai sus; Newmark și colab. *J. Appl. Biochem*, 4, 185-189 (1982). Alți polimeri care pot fi utilizați, sunt poli-1,3-dioxolanul și poli-1,3,6-tioxocanul. Pentru utilizare farma-ceutică, se preferă, așa cum s-a indicat mai sus, porțiuni de polietilenglicol. Pentru proteina (sau derivatul acesteia), localizarea eliberării poate fi stomacul, intestinul subțire (duodenul, jejunul sau ileum) sau intestinul gros. Specialiștii au formule convenabile care nu se vor dizolva în stomac, acestea eliberând materialul în duoden sau, de asemenea, în intestin. De preferință, eliberarea va evita efectele dăunătoare asupra regiunii stomacale, fie prin pro-tecția proteinei (sau a derivatului acesteia) sau prin eliberarea unui material biologic activ peste zona stomacală, cum ar fi, de exemplu, în intestin. Pentru a asigura rezistența com-pletă în zona stomacală, un înveliș impermeabil la un pH de cel puțin 5,0, este esențial. Exemplele de ingrediente inerte mult mai comune, care sunt utilizate ca învelișuri enterice, sunt acetatul de celuloză trimelitat (CAT), hidroxipropilmetilceluloza ftalat (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, polivinil acetat ftalat (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, celuloză acetat ftalat (CAP), Eudragit L, Eudragit S și Shellac. Aceste învelișuri pot fi utilizate ca filme mixte. Un înveliș sau un amestec de învelișuri se poate utiliza pentru tablete, care nu sunt prevăzute pentru protecție față de stomac. Acest înveliș poate include zahăr sau unele învelișuri fac ca tableta să fie mai ușor înghițită. Capsulele pot fi formate dintr-un înveliș tare (cum ar fi în velișul de gelatină) și conțin substanța terapeutică uscată, cum ar fi pulberile; pentru forme lichide, se poate utiliza un înveliș moale de gelatină. Materialul pentru învelișul casetelor poate fi un amidon consistent sau alte substanțe comestibile. Pentru pilule, tablete rom-bice, tablete turnate sau tablete triturate, se pot utiliza tehnici de masare umedă. Substanțele tera-peutice pot fi incluse în formulă, ca multiparticule fine sub formă de granule sau pelete sau particule cu dimensiuni de aproximativ 1 mm. Formula materialului pentru administrarea capsulei, poate fi așadar sub forma de pulbere, matrițe pentru comprimare ușoară sau chiar tablete. Medicamentul poate fi preparat prin comprimare. Se pot include, de asemenea, colo-ranți și agenți de aromatizare. De exemplu, proteina (sau derivați acesteia) poate fi formulată (cum ar fi prin încapsulare de microsfele sau lipozomi) și apoi produsul conține a substanța

RO 121036 B1

comestibilă, cum ar fi agenții de aromatizare și băuturi răcoritoare conținând coloranți. Se 1
 poate dilua sau spori volumul substanței terapeutice, cu un material inert. Acești diluanți pot
 include carbohidrații, în special manitoul, *alfa*-lactoza, lactoza anhidră, celuloza, zaharoza, 3
 dextranii modificați și amidonul. Anumite săruri anorganice, pot fi, de asemenea, fi utilizate
 ca materiale de umplutură, incluzând trifosfatul de calciu, carbonatul de magneziu și clorura 5
 sodiu. Unii diluanți comerciali convenabili sunt Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress
 și Avicell. Substanțele de dezintegrare pot fi incluse în formula de medicament, într-o formă 7
 de dozare, solidă. Materialele utilizate ca dezintegranti sunt, fără a se limita la acestea, ami-
 donul incluzând dezintegranti comerciali pe bază de amidon, Explotab. Se pot utiliza glico- 9
 latul de amidon sodiu, amberlita, carboximetilceluloza sodică, ultramilopectina, alginatul de
 sodiu, gelatina, coajă de portocale, acid carboximetil celuloză, sponge naturală și bentonită. 11
 Alte forme de dezintegranti sunt rezinele insolubile schimbătoare de cationi. Gumele sub
 formă de pulberi, pot fi utilizate ca dezintegranti și ca agenți de legătură și aceștia pot include 13
 gume sub formă de pulberi cum este agar, Karaya sau tragacanta. Dezintegranti utili sunt
 acidul alginic și sarea de sodiu. Agenții de legătură pot fi utilizați pentru a menține la un loc 15
 agentul terapeutic, pentru a forma o tabletă tare și include materiale din produse naturale
 cum este acacia, tragacanta, amidonul și gelatina. Alte materiale includ metilceluloza (MG), 17
 etil celuloza (EC) și carboximetilceluloza (CMC), polivinilpirolidona (PVP) și hidroxipropilmetil
 celuloza (HPMC) care pot fi utilizate în soluții alcoolice pentru granulara substanței terapeu- 19
 tice. Un agent antifricțional poate include în formula medicamentului pentru prevenirea aglo-
 merării în timpul procesului de preparare. Lubrificanții pot fi utilizați ca un strat între substanța 21
 activă și peretele matriței și aceștia pot include, dar fără a se limita la: acidul stearic conținând
 săruri de magneziu și calciu, politetrafluoretilen (PTFE), parafină lichidă, uleiuri vegetabile 23
 și ceruri. Lubrificanții solubili care pot fi, de asemenea, utilizați, sunt sulfatul lauril de sodiu,
 sulfatul lauril magneziu, polietilenglicolul de diferite greutate moleculare și Carbowaxul 4000 25
 și 6000. Glidanții care pot îmbunătăți proprietățile de curgere ale medicamentului în timpul
 formulării și pot ajuta rearanjarea în timpul comprimării, pot fi de asemenea adăugați. Gli- 27
 danții pot include amidonul, talcul, silica pirogenică și silicoaluminatul hidratat. Pentru a
 ajuta dizolvarea substanței terapeutice în mediul apos, se poate adăuga un agent tensioactiv 29
 sau un agent de umectare. Agenții tensioactivi pot include detergenți anionici cum ar fi
 sulfatul lauril sodic, dioctil sodiu sulfosuccinatul și dioctil sodiu sulfonatul. Detergenți cationici 31
 pot fi utilizați și pot include clorura de benzalconiu sau clorura de benzetoniu. Lista deter-
 genților neionici potențiali care ar putea fi incluși în formulă ca agenți tensioactivi urmată din 33
 lauromacrogol 400, polioxil 40 stearat, polioxietilen hidrogenat, ulei de ricin 10, 50 și 60,
 glicerol monostearat, polisorbit 40, 60, 65 și 80, esterul zaharozei cu acid gras, metilceluloza 35
 și carboximetil celuloza. Acești agenți tensioactivi ar putea fi prezenți în formulă împreună
 cu proteina sau derivatul acesteia, fie singur sau în amestec de diferite proporții. Aditivii 37
 care determină o creștere potențială a absorbției proteinei (sau derivatului acesteia), sunt
 de exemplu acizi grași, ca acid oleic, acid linolenic și acid linoleic. Se pot utiliza după 39
 dorință, formule pentru eliberarea controlată a medicamentului. Medicamentul poate fi încor-
 porat într-o matriță inertă, care permite eliberarea lui de exemplu, prin mecanisme de difu- 41
 ziune sau mecanisme de extracție prin solubilizare, gume etc. Astfel de matrițe pentru dege-
 nerare lentă, pot fi de asemenea încorporate în formulă. O altă formă de eliberare controlată 43
 a medicamentului este metoda bazată pe sistemul terapeutic Oros (Alza Corp.), de exemplu,
 medicamentul este conținut în membrana semipermeabilă care permite apei să intre și să 45
 preseze medicamentul în exterior, printr-un singur orificiu mic, datorită efectelor osmotice.
 Unele învelișuri enterice au, de asemenea, efecte de întârziere a eliberării medicamentului. 47
 Pot fi utilizate alte învelișuri pentru aceste formule. Aceste învelișuri includ o varietate de

zaharuri care ar putea fi puse în utilajul de acoperire. Agentul terapeutic ar putea fi, de asemenea, dat sub formă de tablete acoperite de film, materialele utilizate în acest caz, fiind împărțite în două grupe. Prima grupă conține materiale neenterice și include metilceluloza, etilceluloza, hidroxietilceluloza, metilhidroxietilceluloza, hidroxipropilceluloza, hidroxipropilmetilceluloza, carboximetilceluloza sodică, providona și glicolii polietilenici. A doua grupă constă din materiale enterice care sunt esteri obișnuiți ai acidului ftalic. Se poate utiliza, de asemenea, un amestec de materiale pentru a se prevedea un film de acoperire optim. Filmul de acoperire poate fi preparat în utilajul de acoperire sau în pat fluidizat sau prin acoperire prin comprimare.

Eliberarea pulmonară

Așa cum este menționat aici, eliberarea pulmonară a prezentei proteine (sau derivaților proteinei), are loc la nivelul plămânilor unui mamifer în timpul inhalării și traversării medicamentului prin epiteliul pulmonar în circulația sanghină. Alte referiri, includ pe Adjei și colab., *Pharmaceutical Research*, 7(6): 565-569 (1990); Adjei și colab. *International Journal of Pharmaceutics*, 63: 135-144 (1990) (acetat de leuprolide). Braquet și colab. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (suppl. 5): 143-146 (1989) (endotelin-1); Hubbard și colab. *Annals of Internal Medicine*, 3(3): 206-212 (1989) (alfa 1-antitripsină); Smith și colab. *J.Clin.Invest.* 84:1145-1146 (1989) (alfa 1-proteinaze); Oswein și colab. "Aerosolization of Proteins", Proceeding of Symposium on Respiratory Drug-Delivery II, Keystone, Colorado (March 1990) (recombinant human growth hormone); Debs și colab. *J. Immunol.* 140: 3482-3488 (1988) and Platz și colab. **US 5284656** (granulo-cyte colony stimulating factor). Pentru utilizare practică conform prezentei invenții, sunt studiate o gamă largă de dispozitive mecanice desemnate eliberării pulmonare a produselor terapeutice, fără a se limita la acestea, incluzând nebulizatori, dispozitive de inhalare cu doze măsurate și dispozitive de inhalare a pulverilor, din care toate sunt cunoscute în domeniu.

Câteva exemple specifice de dispozitive comerciale convenabile pentru practica acestei invenții sunt nebulizatorul Ultravent, fabricat de Mallinckrodt, Inc.LouisSt.Missouri; nebulizatorul Acorn II, fabricat de Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; inhalatorul Ventolin pentru doze măsurate fabricat de Glaxo Inc.Research, Triangle Park, North Carolina și inhalatorul de pulveri Spinhaler fabricat de Fisons Corp.Bedford, Massachusetts. Toate aceste dispozitive sunt necesare pentru utilizarea acestor formule convenabile, pentru distribuirea proteinei (sau derivatului acesteia). Tipic, fiecare formulă este specifică tipului de dispozitiv utilizat și poate cuprinde utilizarea unui material propellant convenabil, în adiție cu diluanții uzuali, adjuvanții și/sau purtătorii utili în terapie. Așadar, utilizarea lipozomilor, microcapsulelor sau microsferelor, complexșilor de incluziune sau a altor tipuri de purtători este, de asemenea, studiată. Proteina modificată chimic poate fi așadar preparată în diferite formule, dependent de tipul de modificare chimică sau de tipul dispozitivului utilizat. Formulele convenabile pentru utilizare cu nebulizatori, cu jet sau cu ultrasunet, vor cuprinde în mod tipic, proteina (sau derivatul acesteia, dizolvată în apă, la concentrația de aproximativ 0,1 până la 25 mg de proteină activă biologic, per mililitru de soluție. Formula poate așadar să conțină o substanță tampon și un zahăr simplu (de exemplu, pentru stabilizarea proteinei și reglarea presiunii osmotice). Formula pentru nebulizator poate ține un agent tensioactiv, pentru a reduce sau preveni agregarea indusă la suprafață a proteinei, cauzată de atomizarea soluției în formarea aerosolului. Formulele pentru utilizare cu dispozitivul de dozare măsurată, va cuprinde în general pulverea divizată conținând proteina (sau derivatul acesteia) suspendată într-un carburant, cu ajutorul unui agent tensioactiv. Carburantul poate fi orice material convențional utilizat pentru acest scop, cum ar fi de exemplu clorlorcarbon, hidroclorlorcarbon, hidroflorcarbon sau hidrocarbon, incluzând triclorformetanul, diclorodiflormetanul, diclortetrafloretanul și 1,1,1,2-tetrafloretanul sau combinațiile lor.

RO 121036 B1

Ca agenți tensioactivi convenabili, se utilizează sorbitanul trioleat și lecitina de soia.	1
Acidul oleic poate fi, de asemenea, utilizat ca agent tensioactiv. Formulele pentru dispensarea pulverii din dispozitivul de inhalare, vor cuprinde pulberea uscată, fin divizată	3
care conține proteina (sau derivatul acesteia) și care poate conține un agent de voluminizare cum este lactoza, sorbitolul, zaharoza sau manitolul, în cantități care să faciliteze	5
dispersarea pulberii din acest dispozitiv, de exemplu, de la 50 la 90% în greutatea formulei. Proteina (sau derivatul) va fi preparată cel mai avantajos, într-o formă de macroparticulă cu	7
o dimensiune medie a particulei mai mică de 10 μm (sau microni), cei mai preferabil 0,5 până la 5 μm, pentru cea mai efektivă eliberare în plămânul distal.	9
<i>Eliberarea nazală</i>	
Se studiază, de asemenea, eliberarea nazală a proteinei (sau derivatului acesteia).	11
Eliberarea nazală permite trecerea proteinei în circuitul sanghin direct, după administrarea produsului terapeutic în nas, fără a fi necesară depunerea produsului la nivel pulmonar.	13
Formulele pentru eliberare nazală, includ formulele cu dextran sau ciclodextran.	
<i>Metodele de tratament. Metodele de preparare a medicamentului.</i>	15
Într-un alt aspect al prezentei invenții, sunt prezentate metodele de tratament și de preparare a medicamentului. Condițiile îmbunătățite sau modulate prin administrarea prezen-	17
ților derivați, sunt cele indicate mai sus.	
<i>Dozare</i>	19
Pentru toate moleculele menționate mai sus, așa cum se studiază în următoarele studii, informația va apare cu privire la nivelele de dozare convenabile pentru tratamentul	21
diferitelor condiții la diferiți pacienți și specialiști în domeniu, considerând contextul terapeu-	
tic, vârsta și starea generală a individului, vor fi capabili să stabilească propriul dozaj. În	23
general, pentru injectare sau infuzare, dozajul va fi cuprins între 0,01 μg de proteină bio-	
activă/kilogram corp (calculând numai masa de proteină, fără o modificare chimică) și 10	25
mg/kg (pe aceeași bază). Schema de dozare poate varia în funcție de timpul de înjumătățire	
în circulația sanghină a proteinei sau derivatului utilizat, când polipeptida este eliberată din	27
doza bolus sau prin infuzare continuă, din formula utilizată.	
<i>Administrarea cu alți compuși.</i>	29
Se poate administra prezenta proteină (sau derivații acesteia) pentru terapia altor boli	
asociate cu obezitatea, în combinație cu una sau mai multe compoziții farmaceutice, utilizate	31
pentru tratamentul altor complicații clinice ale obezității, cum ar fi cele utilizate pentru trata-	
mentul diabetului (de exemplu, insulina), a presiunii sanguine ridicate, colesterolului ridicat	33
și a altor condiții adverse, incidente obezității. Așadar, se pot co-administra supresanți de	
apetit, de exemplu amfetamine. Administrarea poate fi simultană (de exemplu, administrarea	35
unui amestec din proteina prezentă și insulină) sau poate fi în serie.	
<i>Tratamentul terapeutic pe bază de acid nucleic</i>	37
Gena <i>ob</i> poate fi introdusă în celulele de grăsime umană, pentru dezvoltarea terapiei	
genetice, în obezitate. O astfel de terapie, ar fi de așteptat, să scadă greutatea corporală.	39
Invers, introducerea unor elemente de construcție antisens în celulele de grăsime umane,	
ar reduce nivelele de polipeptida <i>ob</i> activă și ar fi prevăzute pentru creșterea adipozității cor-	41
porale. Într-un alt aspect, gena care cuprinde polipeptida <i>ob</i> , este introdusă <i>-in vivo-</i> în	
vectorul viral. Astfel de vectori includ un virus atenuat sau defectiv ADN, cum ar fi, dar fără	43
a se limita la virusul simplex (HSV), papiloma virusul, virusul Epstein Barr (EBV), adeno-	
virusul, virusul adeno-asociat și altele. Sunt preferate virusurile defective la care lipsesc în	45
totalitate sau parțial genele virale. Virusul defectiv nu este infectiv după introducerea în	
celulă. Utilizarea vectorilor virali defectivi, permite administrarea în celulă într-o zonă specific	47
localizată, fără a însemna că vectorul poate infecta alte celule. Astfel, țesutul adipos poate	

fi țintit în mod specific. Ca exemple de vectori specifici sunt cei care includ, fără a se limita la, virusul herpes defectiv 1 (HSV1)vector, (Kaplit și colab. *Molec.Cell. Neurosci.*2:320-330 (1991)), un vector de adenovirus atenuat, cum ar fi vectorul descris de Stratford-Perricaudet și colab., *J. Clin. Invest.* 90: 626-630 (1992) și vectorul virusului defectiv adeno-asociat (Samulski și colab. *J. Virol.* 61: 3096-3101 (1987); Samulski și colab. *J. Virol.* 63: 3822-3828(1989)). Într-un alt aspect, gena poate fi introdusă într-un vector retroviral, de exemplu, așa cum s-a descris în Anderson și colab., **US 5399346**; Menn și colab., *Cell*, 33:153 (1983); Termin și colab., **US 46507645**, Termin și colab. **US 4980289**; Markowitz și colab. *J. Virol.* 62: 1120 (1988). Termin și colab. **US 5124263**; **WO 95/07358**, publicat pe 16 martie, 1995, de Dougherty și colab. și Kuo și colab. *Blood*, 82 : 845 (1993).

Alternativ, vectorul poate fi introdus *-in vivo-* prin lipofecție. Pentru decada trecută, a crescut utilizarea lipozomilor pentru încapsularea și transfecția acizilor nucleici *-in vitro-*. Lipidele cationice sintetice desemnate pentru a limita dificultățile și pericolele întâlnite în transfecția mediată de lipozomi se pot utiliza la prepararea lipozomilor, pentru transfecția *-in vivo-* a genei care cuprinde markerul (Felgner și colab. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 84 : 7413 - 7417 (1987); vezi Mackey și colab. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,85: 8027 - 8031 (1988)). Utilizarea lipidelor cationice, pot promova încapsularea acizilor nucleici cu încărcare negativă și așadar, pot promova fuziunea cu membranele celulare încărcate negativ (Felger și colab. *Science*, 337:387-388 (1989)). Utilizarea lipofecției pentru introducerea genelor exogene în organele specifice *-in vivo-* are anumite practici avantajoase. Moleculele țintă ale lipozomilor, la celule specifice, reprezintă o arie a beneficiului. Este clar că, direcția de transfecție la tipuri celulare speciale, vor fi în special avantajoase în țesutul cu heterogenitate celulară, cum sunt: pancreasul, ficatul, rinichii și creierul. Lipidele pot fi cuplate chimic la alte molecule, pentru scopul propus (vezi Mackey și colab. 1988, așa cum s-a prezetat mai sus). Peptidele țintă, de exemplu hormonii sau neurotransmițătorii și proteinele așa cum sunt anticorpii sau moleculele non-peptidice, ar putea fi cuplate chimic, la lipozomi. Astfel, este posibil să se introducă *in vivo* plasmida ADN liberă, ca vector. Vectorii ADN liberi pentru terapia genetică, pot fi introduși în celulele gazdă dorite, prin metode cunoscute în domeniu, de exemplu, prin transfecție, electroporare, microinjectare, transducție, fuziune celulară, dextran DBAE, precipitarea fosfatului de calciu, utilizarea perforatorului genetic sau utilizarea transportorului de vector ADN (vezi de exemplu Wu și colab., *J. Biol. Chem.*267 : 963-967 (1992); Wu și colab. *J. Biol. Chem.*263: 14621-14624 (1988); Hartmut și colab. Canadian Patent Application Nr.2012311 înregistrat pe 15 martie 1990.

Aplicații în agricultură

Gena *ob* poate fi așadar izolată din animalele domestice și se obțin, de asemenea, și polipeptidele *ob* corespunzătoare. Într-un exemplu specific, prezentat aici, proba derivată din gena *ob* murinică, hibridizează la secvențele codificate, omoloage, corespunzătoare, dintr-un mare număr de specii de animale. Așa cum s-a discutat pentru terapiile umane, proteinele recombinante pot fi așadar preparate și administrate la animale domestice. Administrarea polipeptidei poate fi implementată pentru a produce hrană mai slabă pentru animale, cum ar fi vitele, porcii, păsările, oile etc. De preferință, o polipeptidă *ob* autolog este administrată, ca și o polipeptidă anti-autolog studiată de prezenta invenție. Deoarece polipeptida *ob* constă din aproximativ 160 reziduuri de aminoacizi, aceasta nu poate fi superior imunogenică. Astfel, administrarea polipeptidei neautolog, nu poate rezulta din răspunsul imun. Alternativ, introducerea genelor clonate la animalele domestice transgenice, va favoriza scăderea potențială a greutateii corporale și a adipozității, prin supraexprimarea transgenei *ob*. Cele mai simple mijloace de obținere ar fi de a ținti transgena *ob* la țesutul gras, utilizând propriul promotor sau un alt promotor specific al țesutului gras. În mod contrat,

creșterea țesutului gras în organism ar putea fi dorită în alte circumstanțe, cum ar fi dezvoltarea țesutului gras la ficatul de vite, Kobe. Aceasta ar putea fi însoțită de țintirea transgenei *ob* antisens în țesutul gras sau prin utilizarea genei într-o tehnologie de konockout. Alternativ, când se dorește o creștere a greutateii corporale la un anumit procent de grăsimi, se poate administra un inhibitor sau agonist al polipeptidei *ob*. Astfel de inhibitori includ, dar fără a se limita la aceștia, anticorpi reactivi cu polipeptidă și fragmente de polipeptidă care se leagă, dar nu activează receptorul *ob*, de exemplu antagoniștii polipeptidei *ob*.

Implicații cosmetice

Polipeptida *ob*, are o valoare semnificativă pentru utilizare cosmetică, în mod suplimentar la la beneficiile sănătății. În special, deoarece polipeptidele *ob* conform prezentei invenții, incluzând derivații și analogii agonști ai acestora, sunt folositoare pentru modularea gradului și cantității de depozit celular gras la un animal, aceste polipeptide sunt folositoare pentru reducerea țesuturilor grase neplăcute, de exemplu, depozitele de grăsimi de pe abdomen, șolduri, coapse, ceafă și bărbie, care nu reprezintă o cantitate de țesut gras necesar pentru condiția de obezitate, dar care contribuie la aspectul individual. Efectul de reducere a grăsimii este gândit a fi însoțit în parte, de reducerea apetitului, de exemplu reducerea hranei ingerate prin creșterea metabolismului bazal sau ambel. Astfel, polipeptida *ob* prezentă, sau derivații acesteia sau analogii agonști, este utilă pentru administrarea la un subiect, pentru a efectua schimbări cosmetice în depozitele tisulare de grăsimi, fie prin modularea depozitului de grăsime, reducerea apetitului sau ambele. În plus, condițiile prezente și metodele invenției, pot fi utilizate în combinație cu procedee diferite, cum ar fi chirurgie cosmetică, desemnată modificării aspectului general al corpului (de exemplu, chirurgia cu laser sau liposucția desemnată pentru reducerea masei corporale, prin aspirarea sau ablațiunea țesutului gras), exercițiu (în special training corporal și mișcare), dietă cu grăsimi puține, hipnoză, biofeedback, care sunt exemple de metode care ar putea contribui la scăderea procentului de țesut tisular și la îmbunătățirea aspectului organismului. În acest sens, prezenta invenție se referă la o metodă pentru efectuarea cosmetică a modulării țesutului gras, cuprinzând administrarea unei cantități de polipeptidă *ob* a unei cantități de modulare a grăsimii sau administrarea unui derivat sau analog agonist al acestei polipeptide, în același scop, la individul care dorește modularea cosmetică a țesutului gras, pentru îmbunătățirea aspectului general al organismului. Într-un aspect special, modularea țesutului gras este o consecință a suprimării apetitului. De preferință, modularea țesutului gras, este o reducere a țesutului gras. Într-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o metodă pentru efectuarea cosmetică a pierderii țesutului gras, cuprinzând combinarea unui procedeu pentru modificarea aspectului corpului, cu administrarea unei cantități de polipeptidă *ob* pentru modularea țesutului gras, sau administrarea în același scop, a unui derivat sau analog agonist al acestei polipeptide, la individul care dorește modularea cosmetică a țesutului gras pentru îmbunătățirea aspectului general al corpului.

Receptorul ob

Dezvoltarea agoniştilor sau antagoniştilor cu molecule mici, ai factorului *ob*, va fi mult facilitată prin izolarea receptorului acestuia. Aceasta poate fi însoțită de prepararea polipeptidei *ob* active și utilizând-o pentru screeningul unei colecții de exprimare printr-o metodologie standard. Legătura la receptor în exprimarea acestei colecții, poate fi testată prin administrarea polipeptidei recombinante preparate utilizând vectori bacterieni de exprimare sau vectori de mamifere, de exprimare și observând efectele unei administrări pe termen scurt și ale unei administrări continue, asupra celulelor colecției de exprimare sau prin legătura de detectare directă a polipeptidei *ob*, la celule.

1 Așa cum se crede în prezent, receptorul *ob* este localizat asemănător în hipotalamus
 și poate în ficat, de preferință colecțiile ADNc din aceste țesuturi vor fi construite cu vectorii
 3 standard de exprimare a clonării. Aceste clone ADNc vor fi introduse apoi în celulele COS
 ca rezervă și elementele rezultate transformate, vor fi supuse unui screening cu ligandul
 5 activ, pentru identificarea celulelor COS de exprimare a receptorului *ob*. Clonele pozitive pot
 fi apoi izolate astfel ca să regenereze receptorul clonat. Receptorul clonat se va utiliza în
 7 conjuncție cu ligandul *ob* (valorând ca hormon), pentru a dezvolta componentele necesare
 pentru screeningul modulatorilor *ob* cu molecule mici. În prezenta invenție, se poate utiliza,
 9 de asemenea, un sistem special de analiză, cunoscut ca analiză de receptor.

Într-o analiză de receptor, materialul care trebuie analizat, este marcat corespunzător
 11 și apoi anumite colonii de testare celulară, sunt inoculate cu o cantitate atât de material mar-
 cat, cât și de material nemarcat, după care, studierea legăturii este astfel dirijată, pentru a
 13 se determina alungirea la care se leagă materialul marcat, la receptorii celulari. În acest mod,
 se pot stabili diferențele de afinitate între materiale. În acest sens, cantitatea purificată de
 15 modulator de greutate, poate fi radiomarcată și combinată de exemplu, cu anticorpi sau cu
 alți inhibitori, după care se vor efectua studiile privind aceste legături. Soluțiile vor fi apoi pre-
 17 parate astfel ca să conțină diferite cantități de modulator de greutate, marcate și nemarcate
 și apoi probele celulare vor fi inoculate și incubate. Monostraturile celulare rezultate, sunt
 19 apoi spălate, solubilizate și numărate cu un calculator gamma, pe o perioadă de timp sufi-
 cientă pentru a se produce o eroare standard <5%. Aceste date sunt apoi supuse analizei
 21 Scatchard, după care, se pot trage concluziile și se pot face observațiile privind activitatea
 materialului. În exemplul de mai sus se ilustrează maniera în care capacitatea de legare
 23 celulară a materialului analizat, poate să servească ca o caracteristică de deosebire. În
 schimb, analiza receptorului, va fi folositoare în special pentru identificarea receptorilor speci-
 25 fici modulatorilor prezenți, cum ar fi receptorul *db*.

O altă analiză utilă și studiată în conformitate cu prezenta invenție, este cunoscută
 27 ca analiza "cis/trans". Pe scurt, această analiză utilizează două elemente genetice, din care
 una este tipic plasmidă care exprimă continuu receptorul special de interes, când acesta este
 29 transfectat într-o linie celulară convenabilă, iar cea de-a doua care este o plasmidă care
 exprimă un element de informare cum ar fi luciferaza, sub controlul unui receptor sau
 31 complex ligand. Astfel de exemplu, dacă se dorește evaluarea compusului ca ligand pentru
 un receptor special, una din plasmide se va construi în așa fel, ca să rezulte în exprimarea
 33 receptorului, în linia celulară aleasă, în timp ce plasmida secundară, va poseda un promotor
 legat la gena luciferazei în care este înserat răspunsul elementului, la acest receptor special.
 35 Dacă compusul de testare este agonist pentru receptor, ligandul se va complexa cu recep-
 torul, rezultând astfel complexul care se leagă la elementul de răspuns și care inițiază trans-
 37 crierea genei luciferazei. Chemiluminescența astfel rezultată, este măsurată apoi fotometric
 și curbele răspunsului la doză sunt comparate cu cele ale liganzilor cunoscuți. Protocolul de
 39 mai sus, este descris în detaliu de **US 4981784** și **PCT WO 88/03168**, care se referă la sco-
 pul artizan. Odată ce gena recombinantă a genei *ob* este identificată poate fi analizat recep-
 41 torul *ob* recombinant. Acesta este obținut prin analizele bazate pe proprietățile fizice și func-
 ționale ale receptorului *ob*, incluzând marcarea radioactivă a receptorului, prin analiza de gel
 43 electroforeză, imunoanaliză, ligand de legătură etc. Mai mult decât atât, anticorpii la recep-
 torul *ob*, ar putea fi generați, așa cum s-a descris mai sus. Structura receptorului *ob* poate
 45 fi analizată prin diferite metode cunoscute în domeniu. De preferință, este analizată structura
 diferitelor domenii, în special porțiunea de legătură a *ob*. Analiza structurală poate fi realizată
 47 prin secvența de identificare cu alte proteine cunoscute, în special cu receptorii de hormoni
 și proteine.

Gradul de similaritate (sau omologie) poate să prevadă o bază pentru structura prevăzută și funcția receptorului sau domeniul acestora. Într-un aspect specific, compararea secvențelor poate fi realizată cu secvențele găsite în GenBank, utilizând de exemplu, programele FASTA și FASTP (Pearson și colab. *Proc. Acad. Sci. US*, 85:2444-48 (1988)). Secvența proteinei poate fi apoi caracterizată prin analiza hidrofilicității (de exemplu, Hopp și colab., 1981, așa cum s-a prezentat mai sus). Profilul hidrofilicității poate fi utilizat pentru identificarea regiunilor hidrofobe și hidrofile ale proteinei receptor *ob*, care în schimb pot indica regiunile extracitoplasmice, legătura membranei și regiunea intracitoplasmică.

Analiza structurală secundară (de exemplu, Chou și colab., 1974, așa cum s-a prezentat mai sus) poate fi așadar efectuată pentru identificarea regiunilor receptorului *ob*, care presupun structuri secundare specifice. Manipularea, translația și predicția structurii secundare ca și cadrul de citire deschis și de fragmentare, se pot realiza prin utilizarea unor programe de calculatoare. Prin prevederea unei polipeptide *ob* recombinante a unei surse abundente și a oportunității de izolare a receptorului *ob* (de exemplu, produsul genetic *ob*), prezenta invenție permite determinarea structurală cantitativă a conformației active a polipeptidei *ob* și receptorului *ob* sau domeniilor acestuia. În special, este prevăzut destul material pentru analizele de rezonanță magnetică nucleară (RMN), spectroscopie în infraroșu (IR) și ultraviolet (UV), în special dicroismul circular (CD). În special, prin RMN se prevede o analiză structurală foarte puternică a moleculelor în soluție, care aproximează foarte mult zonele native ale acestuia (Marion și colab. 1983, așa cum s-a prezentat mai sus, Bar și colab., 1985, așa cum s-a prezentat mai sus; Kimura și colab., 1980, așa cum s-a prezentat mai sus). Alte metode de analiză structurală pot fi de asemenea utilizate. Acestea includ, fără a se limita la aceasta, cristalografia de raze (Engstrom, 1974, așa cum s-a prezentat mai sus).

Se pot studia mult mai preferabil, co-cristalele polipeptidei *ob* și receptorul *ob*. Analiza co-cristalelor prevede o informație detaliată privind legarea, care la rândul ei permite un design rațional pentru agoniștii liganzi și pentru antagoniștii liganzi. Modelarea pe calculator poate fi utilizată, în special în metodele RMN sau raze X (Fletterick și colab., *Computer Graphics and Molecular Modeling*, în *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1986)). Identificarea și izolarea genei cuprinzând receptorul *ob* conform prezentei invenții, se prevăd pentru exprimarea receptorului în cantități mai mari decât atunci când poate fi izolat din surse naturale sau celule indicatoare care sunt în special prelucrate pentru a indica activitatea receptorului exprimat după transfecția sau transformarea celulelor. În acest sens, în afară de designul rațional al agoniștilor și antagoniștilor pe baza structurii polipeptidei *ob*, prezenta invenție studiază o metodă alternativă pentru identificarea liganzilor specifici ai receptorului *ob*, utilizând diferite analize de screening, cunoscute în domeniu. Invenția de față poate fi mai bine înțeleasă cu referire la următoarele exemple, care intenționează a fi exemplificatoare, dar nelimitative pentru prezenta invenție.

În continuare se prezintă 17 exemple de realizare a invenției în legătură cu fig. 1...67, care reprezintă.

Fig. 1 (A până la E) reprezintă secvența de acid nucleic (SECV. ID Nr. 1) și secvența dedusă de aminoacid (SECV. ID Nr.2) derivată pentru murine *ob* ADNc. Perechea de bază 39, leader 5' este urmată de un sistem în citire deschisă prevăzut pentru 167 de aminoacizi și o secvență necodificată de aproximativ 3,7 kb 3'. (În cerere înregistrată mai înainte, Seria Nr. 08/347, 563 la 30 noiembrie 1994 și seria nr.08/438, 431, înregistrată în mai 10, 1995, s-a determinat suplimentar o secvență necodificată adițională 5' cu 58 perechi de bază, ca produs artificial de clonare. Acest produs artificial care nu aparține unei zone de codificare este format din 39 perechi de bază, iar zona necodificată 5' este schițată în fig. 1 sau zona

necodificată 3' a genei). Este prezentat un total de aproximativ 2500 perechi de bază pentru secvența 3' necodificată. Analiza secvenței de proteine prevăzută, prin observarea și utilizarea programului pe computer Sig.Seq indică prezența unei secvențe semnal (subliniată). Microheterogeneitatea ADNc a fost notată ca fiind de aproximativ 70% din ADNc având un codon de glutamină la codonul 49, iar cele 30% nu prezintă acest codon (vezi fig. 5 și 6, infra). Acest aminoacid este subliniat, acesta fiind codonul de arginină care este C57BL/6J *ob/ob* mutanți la șoareci (șoareci IJ).

Fig. 2 (A și B) prezintă secvența de acid nucleic (SECV. ID Nr.3) derivată pentru *ob* ADNc uman. Nucleotidele sunt numerotate de la 1 la 701 cu porțiunea de start la nucleotida 46 și o terminație la nucleotida 550.

Fig. 3 prezintă secvența complet dedusă de aminoacizi (SECV. ID Nr.4) derivată din gena umană *ob*, corespunzător secvenței de acid nucleic a fig. i 2A și B. Aminoacizii sunt numărați de la 1 la 167. O secvență semnal cu porțiunea de clivaj este localizată după aminoacidul 21(Ala) astfel ca proteina matură să se extindă de la aminoacidul 22 (Val) până la aminoacidul 167 (Cys).

Fig. 4 prezintă comparația între secvențele de aminoacizi murinice deduse (SECV. ID Nr.2) și umane (SECV. ID Nr.4). Secvența de *ob* umană având secvența dedusă de aminoacizi a fost superior omoloagă celei de la șoareci. Modificările conservative sunt notate printr-o linie și modificările neconservative sunt notate printr-un asterisc. Codonul de glutamină variabil este subliniat, așa cum este în poziția mutației nonsens în C57BL/6J *ob/ob* (IJ) la șoareci. În general, există o identitate de 83% la nivelul de aminoacizi, așadar numai opt substituții au fost găsite între valină la codonul 22 (imediat sub linia de desfășurare a secvenței semnal, mature) și cisteina în poziția 117.

Fig. 5 prezintă o secvență de aminoacizi cu lungimea completă (SECV. ID Nr.5) derivată pentru gena *ob* la murine, așa cum se arată în fig. 3, dar glutamina este absentă la poziția 49. Aminoacizii sunt numerotați de la 1 la 166. O secvență semnal în porțiunea de clivaj este localizată după aminoacidul 21 (Ala) (și astfel, înainte de anularea glutaminei 49), astfel ca proteina matură să se extindă de la aminoacidul 22 (Val) la aminoacidul 166 (Cys). Fig. 6 reprezintă o secvență de aminoacizi complet dedusă (SECV. ID Nr.6) derivată de la gena *ob* umană, așa cum se arată în fig. 4, dar glutamina este absentă la poziția 49. Aminoacizii sunt numerotați de la 1 la 166. O secvență semnal în porțiunea de clivaj este localizată după aminoacidul 21 (Ala) (și astfel, înainte de anularea glutaminei 49), astfel ca proteina matură să se extindă de la aminoacidul 22 (Val) la aminoacidul 166 (Cys).

Fig. 7(A) prezintă desenul fizic al locației *ob* în cromozomul de murine și schițele de clonare YAC și P1 "M și N" corespund la părțile de restricție *MulI* și *NotI*. Numerele corespund animalelor individuale care sunt recombinante în zona *ob* a 1606 din meioză, așa cum s-au însemnat. Met, Pax 4, *D6Rck39*, *D6Hck13* și *Cpa* se referă la localizarea în regiunea *ob* care se leagă de probele de DNA. YACs au fost izolate utilizând ca probe *D6Rck13* și *Pax-4* și terminațiile au fost redobândite, utilizând vektorul PCR și/sau terminația plasmidei de eliberare și utilizare în locul izolării noului YAC (B). A rezultat contigul YAC. Unul dintre fragmentele YAC din acest contig Y902A0925 a fost himeric. Fiecare dintre probele utilizate la genotipul recombinant la animale, este indicat în paranteze (6) corespunde la YAC 107; (5) corespunde la M16(+) (sau M16 (pLUS)); (4) corespunde la adu(+); (3) corespunde la aad (pICL); (2) corespunde la 53 (pLGL) și (1) corespunde la 53(+). (C) Contigui PI al clonelor PI bacteriofage, sunt izolate cu probele terminațiilor selectate de YAC. Gena *ob* este izolată în clona PI izolată utilizând terminația distală a YAC YB6S2F12 (terminația (4))(denumită alternativ aici, adu(+)). Fig. 8 prezintă o fotografie a petei de bromură de etidium la aminoacidul 192 izolat independent prin patru experimente de captare a exonului, amplificate și caracterizate de PCH.

RO 121036 B1

Fig. 9 este o fotografie a petei de bromură de etidium a clonelor amplificate de PCR, suspectate de a purta *ob*. Fiecare din cele 7 clone care nu poartă un artificiu, a fost reamplificată utilizând PCR și electroforizată pe gel de agaroză 1% în TBS și colorată cu bromură de etidium. Dimensiunea markerilor (rămași în zona nenumărată) este corespunzătoare din punct de vedere comercial "1 kB scară". Zona 1, clona 1D12, conține "secvența HIV". Zona 2, clona 1F1, conține o clonă nouă în afara zonei *ob*. Zona 3, conține clona 1H3. Zona 4, conține clona 2B2, care este identică cu 1F1. Zona 5, conține clona 2G7, care conține exonul *ob*. Zona 6, conține clona 2G11 care este identică cu 1F1. Zona 7, care conține clona 2H1, care nu conține un insert.

Fig. 10 prezintă secvența de (SECV. ID Nr.7) a clonei 2G7, care include un exon ce codifică parțial gena *ob*. Secvențele primer utilizate pentru amplificarea acestui exon sunt prezentate în figură (SECV. ID Nr.8 și 9).

Fig. 11 (A). Analiza PCR de transcripție reversă a ARNm din diferite țesuturi ale aceluiași șoarece, cu 2G7 primeri și actin primeri. Reacțiile RT-PCR sunt efectuate utilizând 100 ng din ARN revers, transcris cu oligoproteina dT ca primer pentru prima sinteză de ADNc cu filamente răsucite. Amplificarea PCR este realizată pentru 35 de cicluri cu denaturare de 94 pentru 1'; pentru 1', hibridizarea are loc la 55°C, iar la 72°C au loc extensiile pentru 2' cu o a doua autoextensie a 1', per ciclu. Produsele RT-PCR sunt rezolvate pe gel de agaroză de concentrație 2%, cu punct de topire scăzut, în mediu tampon 1 x TBB. (B) Pata Western a ARNm din diferite organe ale șoarecelui se utilizează cu PCR, marcată 2G7, ca probă. 10 μg din ARN-ul total din fiecare din aceste țesuturi se supun la electroforeză pe un gel de agaroză cu formaldehidă. Proba este apoi hibridizată la temperatura de 65°C în Rapid Hybe (Amersham). Semnalele autoradiografice apar după o oră de expunere; experimentul prezentat este rezultatul unei expuneri de 24 h.

Fig. 12(A). Pata de bromură de etidium din reacția RT-PCR asupra celulelor grase (țesut adipos alb) ARN din fiecare tulpină de șoarece este menționată în tabel. ARN-ul total (100 ng) pentru fiecare probă, se transcrie revers, utilizând oligoproteinele dT și revers transcripțaza și ADNc simplu răsucit care rezultă astfel, este amplificat cu PCR, cu primerii 2G7 (benzile inferioare) sau actin primerii (benzile superioare). Atât primerii 2G7, cât și actin primerii sunt incluși în aceeași reacție PCR. Produsele se realizează pe gel de agaroză 1% TBE (B), analiza Western corespunzând la (A). 10 μg de ARN-ul din celulele grase (țesutul adipos alb) din fiecare tulpină de șoarece, așa cum s-a indicat, se prelucrează și se experimentează cu proba 2G7 marcată PCR, așa cum este redat în fig. 11 B mai sus. O creștere de aproximativ 20 de ori a nivelului de ARNm, apare în cazul ARN din țesutul gras, alb, de la specia (U) *C57BL/6J ob/ob*, referitor la perechea de animale slabe. În ambele experimente prin RT-PCR și Western, n-a existat niciun semnal detectabil în ARN. 2G7, de la specia de șoarece SIV/ *Ckc-+^{DaC}ob^{2J}/ob^{2J}* (2J), chiar după 2 săptămâni de la expunere. Se prezintă autoradiografia după 24 h. Se utilizează același filtru, pentru, hibridizare la proba de actină (partea inferioară a tabelului).

Fig. 13 reprezintă analiza Western la animalele adiționale 2J și a animalelor martor, care confirmă absența ARNm *ob*, la animalele 2J. Analiza western este realizată la fel ca în fig. 11 și 12. În acest caz, ARN-ul martor este ap2, în transcripția specifică a celulelor grase. Nu există nici o semnificație privind variația de densitate la benzile ap2.

Fig. 14 compară secvența ADN a *C57BL/6J* (normal) și *C573L/6J ob/ob* (IJ) la șoareci, în zona punctului de mutație, care duce la introducerea codonului de stop prematur (mutație nonsens) în tulpina mutantului ADNc. Secvența *ob/ob* la șoareci, are o mutație C→T care modifică un reziduu de arginină în poziția 105. Această modificare de bază este arătată ca o informație de la ordonatorul automat al ADN. RT-PCR se realizează utilizând ARN din

RO 121036 B1

1 țesutul alb gras, de la ambele tulpini(+/+ și *ob/ob*), utilizând primerii din zonele 5' și 3' necodi-
ficate. Produsele de reacție PCR sunt purificate pe gel și secvențate manual, direct, utilizând
3 ordonatorul automat 373A, Applied Biosystems, Inc, cu primerii de-a lungul ambelor fila-
mente ale secvenței codificate.

5 Fig. 15(A) reprezintă pete de absorbție a ADN genomic, de la fiecare tulpina de
șoarece, din tabel. Aproximativ 5 μg ADN (derivat al ADN genomic preparat din ficat, rinichi
7 sau splină) se digeră cu restricție enzimatică conform indicației. ADN se aduce la electro-
foreză pe gel de agaroză 1% TBE și se probează cu PCR, marcat 2G7. Digestia enzimatică
9 arată, utilizând Bg/II, o creștere a dimensiunii fragmentului de aproximativ 9 kB (cel mai
mare) Bg/II, în SM/Ckc-+, ^{Dac}*ob*^{2J}/*ob*^{2J}(2J) ADN. RFLPs nu este detectabil, cu nici o altă
11 enzimă de restricție. Prin cartarea de restricție preliminară a AD-ului genomic, se arată că
porțiunea polimorfă Bg/II este de aproximativ 7kB la partea superioară a porțiunii de start a
13 transcrierii. Nici una din celelalte enzime testate, n-a avut o extindere precedentă în porțiu-
nea de start a ARNm. (B) Begregare polimorfismului Bg/II în tulpina SM/Ckc-+^{Dac}*ob*^{2J}/*ob*^{2J}.
15 Un număr de 6 descendenți obezi și 5 descendenți slabi din aceeași generație a coloniei
coisogenice SM/Gkc-+^{Dac}*ob*^{2J}/*ob*^{2J}(2J) au fost genodeterminați ca grupă sanghină, prin mar-
17 carea polimorfismului Hg/II, așa cum este arătat la (A). Toate fenotipurile de animale obeze
sunt homozigote pentru alelele mai mari ale fragmentului polimorf Bg/II. ADN în zona de
19 "control", se prepară din țesut nerelevant de șoarece SM/Ckc -+^{Dac}+/+, pe soiuri separate,
din colona SM/Ckc -+^{Dac}*ob*^{2J}/*ob*^{2J}.

21 Fig. 16 este o pată de absorbție ADN genomic digerat EcoRI, din speciile prezentate
conform tabelului, utilizând *ob* ADNc ca probă, (de exemplu, pata zoo). Semnalele de hibridi-
23 zare sunt detectabile în fiecare dintre probele de vertebre, chiar după o hibridizare stringent
moderată.

25 Acidul dezoxiribonucleic ADN provenit de la pisică în acest experiment a fost ușor
degradat. ADN-ul de restricție este experimentat pe gel de agaroză 1% TBE și transferat pe
27 o membrană imobilon, pentru experimentare. Filtrul este hibridizat la 65°C și spălat în
SSC/0,2% SDS de două ori, la temperatura de 65°C, apoi de două ori timp de 20 min și apoi
29 se expune timp de 5 zile, utilizând filmul Kodak X-OMAT (RQchester, N.Y.).

Fig. 17 prezintă zona de exprimare a clonării vectorului pET-15 b(Novagen)(SECV.
31 ID Nr.11 și 12).

Fig. 18 prezintă analiza eluatului de pe coloana de rezine(Ni) de legare la histidină,
33 pentru fuziunea *ob* a recombinantului murin matur, la His-tag (A) și fuziunea *ob* uman matur
la His-tag (B). Bacteriile sunt transformate cu vectorii pETM9 și respectiv pETHI4. După
35 inducția cu 1 m MIPTG în condiții optime, bacteria transformată este capabilă de a produce
100-300 μg/mililitru proteină *ob* de fuziune, în primul rând în părțile de incluziune. Aceste
37 părți de incluziune sunt solubilizate cu 6M guanidină clorhidrică sau cu uree și proteina de
fuziune (prezentă în supernatantul de liză) este încărcată pe coloana de rezine (Ni) de legare
39 la histidină, în 10 ml de soluție tapon de legătură, cu uree. Coloana este apoi eluată treptat
cu alicotii de 5 ml, de 20 μM, 60 μM și 300 μM imidazol și în final cu o soluție tampon. Alicotii
41 sunt apoi analizați pentru prezența polipeptidei *ob* de fuziune pe gelul acrilamidă 15%.
Fiecare zonă conține echivalentul a 100 μl de extract bacterian.

43 Fig. 19 (A). Translația *in vitro* a ARN *ob*. ADNc *ob* uman este subclonat în vectorul
pGEM. Se linearizează plasmida și la un loc cu fragmentele răscucite de ARN se sintetizează
45 utilizând polimeraza Sp6. ARN sintetizat *in vitro* este codificat în prezența (sau în absența)
membranelor microzomale pancreatice de canine. A fost observat un produs codificat primar
47 de aproximativ 18 kD după codificarea *in vitro*.

Adiția membranelor microzomale la reacție, determina apariția unui al doilea produs de codificare mai subțire cu aproximativ 2kD față de produsul primar codificat. Dimensiunea produsului de translație a interieukinei-1 alfa ARN la care secvența de semnal codificată este absentă, este nemodificată prin adiția membranelor microzomale. Aceste date arată că este prezentă secvența semnal, funcțională. (B) Codificarea *in vitro*, în prezența sau în absența proteinazei K. Tratatamentul cu proteaza are ca rezultat proteoliza completă a produsului primar codificat 18kD, în timp ce forma prelucrată 16 kD este nemodificată. Permeabilizarea microzomului cu 0,1 % TRITON-X100 redă forma prelucrată de proteaza sensibilă. Aceste rezultate indică faptul că, produsul este codificat în lumenul microzomului.

Fig. 20 (A până la E). Secvența genei umane *ob* (SECV. ID Nr.22 și 24). (F) O diagramă schematică a genei murine *ob*. (G) O diagramă schematică a genei umane *ob*. În ambele cazuri (F) și (G), startul și stopul codoanelor este subliniat. Nu există nici o evidență a primului intron omolog la șoarece și a celui uman, în gena umană, dar existența acestuia nu poate fi exclusă.

Fig. 21 prezintă un desen schematic al unei strategii de clonare utilizată pentru a se obține exprimarea recombinantă a *ob* la drojdia *Pichia*. (A) Vectorul de exprimare al *ob* cu o secvența semnal a factorului alfa de conjugare. (B) Desenele schematiche ale structurii proteinei de fuziune recombinantă, incluzând secvența de aminoacid (SECV. ID Nr.26), care arată porțiunea XhoI și porțiunile de clivaj putativ KEX-2 și 5TE -13 și surplusul de aminoacizi N-terminali prezent după clivajul KEX-2 (SECV. ID Nr.27). (C) O strategie alternativă pentru producerea *ob* mature cuprinde prepararea unui element cu o secvență de aminoacid corespunzător la porțiunea de clivaj XhoI și la porțiunea de elevaj KEX-2 imediat superioară secvenței polipeptidei mature (SECV. ID NR.28).

Fig. 22.Strategia de exprimare alternativă la *Pichia*. (A) vectorul de exprimare a *ob* de fuziune cu His-tag adoptat din sistemul de exprimare pET sub controlul secvenței semnal prin factorul de conjugare *alfa* (SECV. ID Nr.35).(B) Desenele schematiche ale structurii proteinei de fuziune recombinante *ob* conținând His-tag, care includ secvența semnal a factorului de conjugare *alfa*, porțiunile de clivaj putativ KEX-2 și STE -13, H is-tag și porțiunea de clivaj a trombinei, care ar putea produce polipeptida *ob*, cu un surplus de trei zidouri de aminoacizi N-terminal.

Fig. 23 (A). Analiza PAGE de exprimare a murinelor *ob* (atât formele microheterogene, de exemplu cele care conțin Gln 49 și cele la care Gln 49 este absentă), la drojdia *Pichia* transformată. Banda așteptată de aproximativ 16 kD este vizibilă în fluidul de cultură a drojdiei transformate (zonele doi și trei), dar nu și în cultura fluidă de la drojdia netransformată (prima zonă). (B) Analiza PAGE a polipeptidei *ob* recombinante parțial purificată pe carboximetilceluloză, un schimbător slab de cationi. O bandă de aproximativ 16 kD este foarte vizibilă în fracțiunile 3 și 4 din coloană, eluarea acestei coloane fiind efectuată cu 250 mM de NaCl. Zona 1 prezintă simpla încărcare; zona 2, trecerea materialului pe coloană; zonele 3-5 prezintă fracțiunile eluate cu 250 mM NaCl.

Fig. 24 arată că proteina *ob* circulă în plasma de șoarece. (A). Imunoprecipitățile sîngelui de șoareci. Se utilizează 0,5 ml de plasmă de șoarece care este preclarificată cu Sepharoză neconjugată și incubată peste noapte cu anticorpi imunopurificați anti-*ob* conjugați cu perle 4B de Sepharoză. Imunoprecipitatul este apoi separat pe gel SDS-PAGE 15%, transferat și aspirat în sistemul Western, cu anticorpul anti-*ob*. Proteina migrează cu o greutate moleculară de aproximativ 16 kD, în aceeași poziție ca și proteina matură de șoarece *ob*, exprimată în drojdie. Proteina este absentă în plasmă la șoarecele C57BL/6J și crește de zece ori mai mult în plasmă la șoarecele (J57BLB/Ks, raportat la șoarecele de tip sălbatic; db la șoarece a sugerat o supraproducție de proteină *ob*, secundară rezistenței la efectele

RO 121036 B1

acesteia. (B) Nivelele crescute de *ob* la șobolanii grași. Șobolanul gras este obez ca rezultat al mutației recesive pe șobolan, cromozomul 5. Datele genetice sugerează un defect în aceeași genă de mutație la șoarece db. Plasma de la șobolanii grași și perechile slabe ale acestora este imunoprecipitată și se analizează prin absorbția Western. O creștere de 20 de ori mai mare în nivelul de circulație al *ob* este observat la animalele mutante. (C). Cantitatea de proteină *ob* în plasma de șoarece. Cantitățile crescute de proteină recombinantă la șoareci, se adaugă la 100λ plasmă de șoareci *ob* și apoi aceasta este imunopresată. Intensitatea semnalului măsurată prin absorbție Western, comparată cu cea de la 100λ de plasmă de la șoarecele de tip bec. O creștere lineară în intensitatea de semnal a fost observată cu cantități crescute de proteină recombinantă, ceea ce demonstrează că imunoprecipitățile sunt realizate în condițiile de exces de anticorpi. Semnale similare au fost observate în proba de plasmă și în proba cu 2 ng proteină recombinantă, indicând nivelul de circulație în plasma de șoarece care este de aproximativ 20 ng/ml. (D) Proteina *ob* în extractele de țesut adipos. Extractele cito-plasmaticice din țesutul adipos de șoarece se prepară din db și tipul de șoarece sălbatic. Analiza de absorbție Western arată nivele crescute de proteină 16 kD în extractele preparate de la șoarecele db

Fig. 25 arată că proteina *ob* circulă la nivele variabile în plasma umană. Probele de plasmă sunt obținute de la șase voluntari subțiri. Imunoprecipitarea și analiza de absorbție Western arată prezența unei proteine imunoreactive 16 kD, identică ca dimensiune cu proteina umană recombinantă având 146 aminoacizi, exprimată prin drojdie. Nivelurile variabile de proteine au fost observate în fiecare din cele șase probe. (B) Analiza ELISA (Imunoanaliza legată de enzime) pentru *ob* uman. Plăcile microtitrate sunt acoperite cu anticorpi *ob* anti-umani imunopurificați. Se adaugă apoi cantități cunoscute de proteină recombinantă pe aceste plăci și detectarea se efectuează utilizând anticorpi anti-*ob* biotinilați, imunopurificați. Absorbanta la 414 nm este înregistrată la concentrații cunoscute de *ob*, pentru a se produce curba standard. Curba standard astfel rezultată arată că analiza este capabilă de detectarea a 1 ng/ml sau mai mult din proteina *ob* umană. (C) Cantitatea de proteină *ob* în plasma umană. Imunoanaliza ELISA este efectuată utilizând 100λ de plasmă de la șase voluntari slabi și standardele utilizate sunt prezentate în tabelul B. Nivelurile proteinei *ob* de ordinul a 2ng/ml în HP1 până la 15 ng/ml în HP6 au fost astfel observate. Aceste date sunt corelate cu analiza de absorbție Western, datele fiind prezentate în tabelul A.

Fig. 26 arată că proteina *ob* formează legături disulfurice intermoleculare și intramoleculare. (A) Analizele de absorbție Western în condiții de reducere și fără reducere. Analiza de absorbție Western a plasmii umane și de șoarece se repetă cu și fără adădire de agenți de reducere, la proba tampon. Când se omite *beta*-mercaptoetanolul din proba tampon, imunoprecipitatele din plasma db migrează cu apariția masei moleculare 16 kD și 32 kD. Adădirea de *beta*-mercaptoetanol la proba tampon, duce la dispariția jumătății 32 kD (vezi fig. 24). Acest rezultat este recapitulat când proteina de șoarece este exprimată în drojdie, *Pichia pastoris*. În acest caz proteina *ob* de șoarece migrează către poziția dimerului. În condiții de reducere, proteina de șoarece recombinantă, purificată, migrează cu apariția greutatei moleculare de 16 kD, indicând că forma moleculară 32 kD este rezultatul a una sau două legături bisulfurice intermoleculare. Proteina umană exprimată *in vivo* și în *Pichia pastoris*, cu masa moleculară de 16 kD migrează atât în condiții de reducere, cât și fără reducere (datele nu sunt prezentate). (B) Proteina umană exprimată în drojdie conține legătura bisulfurică intramoleculară. Proteinele secretate cuprind, în general, conformația corectă atunci când se exprimă în sisternul de exprimare *Pichia pastoris*. Proteina umană matură cu 146 de aminoacizi este exprimată în *Pichia pastoris* și purificată din mediul de drojdie printr-o purificare în două faze, protocolul cuprinzând IMAG și gel filtrarea. Proteina recombinantă purificată

RO 121036 B1

este supusă spectrometriei de masă înainte și după clivajul cianogenbromuri: Clivajul bromurii de cianogen are loc la gruparea carboxi terminală a reziduurilor de metionină. Masa moleculară a proteinei recombinante de drojdie este de $16,024 \pm 3$, Da. (masa moleculară calculată = $16,024$ Da). Clivajul bromurii de cianogen se produce după trei grupări metionină în secvența proteinei la aminoacizii 75, 89 și 157. Fragmentul de bromură de cianogen este măsurat cu masa de $8435,6$ Da, corespunzător amino acizilor 90-157 și 158-167 care sunt legați prin legături cis -117 și cis -167 (calculat ca masa moleculară= $8434,5$ Da) N.D.=nedetectat.

Fig. 27 prezintă prepararea proteinei recombinante bioactive. Secvența de nucleotide corespunzătoare proteinei *ob* mature de șoarece, având 145 de aminoacizi, este clonată în vectorul de exprimare pET 15 b .Acest vector pET determină inserția liniei polihistidinei la partea superioară. (His-tag) a secvenței clonare, care permite o purificare "eficientă utilizând analiza IMAG, Immobilized Metal Affinity Chromatography. Proteina recombinantă bacteriană este inițial distribuită în fracțiunea membranei insolubile, după liza bacteriană fracțiunea de membrană este solubilizată utilizând clorhidrat de guanidium și apoi este încărcată pe coloana IMAG. Proteina este eluată de trei ori și tratată cu trombină pentru a se îndepărta porțiunea His-tag, așa cum se va descrie mai departe. Randamentul proteinei solubile este de 45 ng/ml din cultura bacteriana.

Fig. 28 arată efectele biologice ale proteinei *ob*. Perioada de ingerare a hranei (tabelele A-C) și greutatea corporală (tabelele D-F). Grupe de câte zece animale au primit zilnic injecții intraperitoneale cu proteina *ob* la o doză de 5 mg/kg/zi (substanță solidă, în pătrate) injecții zilnice cu PBS (substanța solidă în cercuri) sau nici un tratament (substanță solidă triunghiulară). Grupele de tratament includ șoareci C57B1/6J *ob/ob* (tabelele A și D), C57B1/ Ks db/db (tabelele B și E) și CBA/J +/+ (tabelele G și F). Hrana ingerată de șoareci este măsurată zilnic și greutatea corporală este înregistrată la intervale de trei până la patru zile, așa cum este indicat. (Scala greutății corporale în g este diferită pentru șoarecii de tip sălbatic față de *ob* și db la șoareci). Hrana ingerată de șoarecii *ob* care primesc proteine este redusă după prima injecție și stabilizată după a patra zi, la un nivel aproximativ de 40% din cea observată în grupa injectată fals ($p < 0,001$). Greutatea corporală a acestor animale descrește în medie cu $1,3$ g/zi și se stabilizează după trei săptămâni, la un nivel aproximativ de 60% din greutatea inițială ($p < 0,0001$). Nu s-a demonstrat nici un efect al proteinei db la șoareci. Efecte slabe dar semnificative asupra greutății corporale sunt observate la șoareci CBA/J, la două puncte timpurii ($p < 0,02$). Eroarea standard a fiecărei măsurători este prezentată printr-o bară, iar semnificația statistică a acestor rezultate este prezentată în tabelul 1.

Fig. 29 arată rezultatele la o pereche de șoareci subnutriți. (A) Grupa A, de patru șoareci C57B1/6J *ob/ob*, este hrănită cu o cantitate de hrană egală cu cea consumată de o grupă de șoareci *ob*, care primesc proteina recombinantă. Pierdere în greutate pentru ambele grupe este calculată după cinci zile, după opt zile și după douăspre zece zile. Grupa de șoareci având restricție de hrană pierde mai puțin în greutate (linia hașurată) decât șoarecii care au primit proteina (linia solidă) ($p < 0,02$). Acest rezultat arată că efectul de reducere a greutății proteinei *ob* este rezultatul efectelor asupra hranei ingerate și energiei consumate. (3) Fotografia șoarecilor tratați *ob*. Sunt prezentați doi șoareci obezi C57B1/6J *ob/ob*. Șoarecele din stânga a primit PBS și cântărește 65 g, care a fost greutatea inițială. Șoarecele din dreapta a primit zilnic injecții cu proteina *ob* recombinantă. Greutatea inițială a acestui animal a fost de 65 g și greutatea după trei săptămâni de tratament cu proteina, a fost de 38 g. (C). Ficatul la șoarecele tratat și la cel netratat *ob*. Se prezintă ficatul de la șoarecii tratați și netratați C57B1/6J *ob/ob*. Ficatul de la șoarecele care a primit PBS are un aspect voluminos de ficat gras și cântărește $5,04$ g. Ficatul de la șoarecii care au primit proteina *ob* recombinantă are un aspect normal și greutatea de $2,23$ g.

Fig. 30 arată hibridizarea *in situ* a țesutului adipos *ob*. ARN *ob* sens și antisens este marcat *in vitro* utilizând polimeraza Sp6 și T7 și digoxigenina. ARN-urile marcate sunt hibridizate în secțiunile de țesut adipos scufundate în parafina, din partea epididimală a labei grase de șoarece de opt săptămâni C57B1/Ks (tipul sălbatic marcat) și de la șoarecele C57B1/Ks db/db (marcat db). În această figură, picăturile de lipide apar ca vacuole necolorate în celule. Citoplasmă este o margine subțire la periferia celulelor și nu se poate deosebi de membrana celulară. Hibridizarea la toate formațiunile de adipocite în acest domeniu, a fost detectată în secțiunile de tip sălbatic utilizând numai proba antisens și nivelele mult crescute, au fost văzute în secțiunile tisulare de la animale db/db.

Fig. 31 prezintă BNA *ob* care este exprimat în adipocite *in vivo* și *in vitro*. ARN-ul total (10 μg) din diferite surse se aduce la electroforeză pe proba *ob* hibridizată și absorbită ca mai sus. În primul rând, diferențele dintre flotabilitatea celulară după digestia collagenazei, se utilizează pentru purificarea adipocitelor. ARN-ul *ob* este prezent numai în fracțiunea adipocitelor. Zona S indică fracțiunea stromovasculară și A indică fracțiunea adipocitelor. În plus, ARN-ul *ob* nu este exprimat în zona celulară U preadipocitară 3T3-422, nediferențiată. Adipocitele diferențiate din aceste linii celulare, exprimă clar nivelele detectabile de ARNm de *ob* (zona D).

Fig. 32 arată că ARN de *ob* este exprimat în toate depozitele adipoase tisulare. Toate depozitele tisulare adipoase testate au fost exprimate ca ARN de *ob*. Grăsimea inghinală a labei exprimă oarecum nivele scăzute de ARN, așadar există o variabilitate în nivelul semnelor în diferite experimente (fig. 31A). Zona (1) epididimală (2) inghinală (3) abdominală (4) parametrială din partea grasă a labei. Grăsimea cafenie este de asemenea exprimată la un nivel scăzut de *ob* ARN. (fig. 31B) Nivelul *ob* exprimat în grăsimea cafenie este nemodificat la animalele care trăiesc la temperatura de 4°C timp de o săptămână, în timp ce abundența de grăsime cafenie specifică UCP ARN care este cunoscută că poate fi inductibilă la rece, poate crește de cinci ori.

Fig. 33 reprezintă exprimarea ARN a *ob* la șoarecii db/db și la cei tratați cu tioglucoză. ARN total din grăsimea parametrială a labei de la șoarecii aurii db/db și cei tratați cu tioglucoză (GTG) este analizat prin electroforeză și absorbție Western. GTG administrat ca o doză unică este cunoscut că determină obezitatea prin inducerea de leziuni specifice hipotalamice (A) Șoarecii, femele de o lună CBA, sunt tratați cu GTG (2 mlg/g), ceea ce are ca rezultat o creștere mai mare de 20 g la animalele tratate în raport cu animalele de control (sub 5 g) (B). Hibridizarea probei *ob* la ARN de la db/db și șoarecii tratați cu GTG prezintă o creștere de 20 de ori în abundența de ARN *ob* față de animalele de control ARN (actină sau GAPDH).

Fig. 34 reprezintă analiza de absorbție Northern la ARN uman. Aceste pete conțin 10 mg din ARN total din țesutul adipos uman (PAT, tabelul A) și 2 mlg de poli A+ARN din țesuturile umane (tabelul A) sunt hibridizate la probele umane *ob* sau umane cu *beta*-actină, așa cum este indicat. Un semnal intens la aproximativ 4,5 kb este observat cu ARN total din țesutul adipos. Hibridizarea la poliA+ARN arată semnale detectabile în inimă (HE) și placentă (PL), în care ARN *ob* n-a fost detectat în creier (BR), plămâni (LV), ficat (LI), musculatura scheletică (SM), rinichi (KI) și pancreas (PA). În fiecare caz, lungimea expunerii autoradiografice este indicată. De notat este că geneza benzilor moleculare inferioare observate în placentă (de exemplu ARN cu îmbinare alternantă, ARN de degradare) nu este cunoscută.

Fig. 35 reprezintă YAC contig conținând gena *ob* umană și 8 markeri microsateiți. Se prezintă schița care are conținut de STS cu YAC de bază, în zona cromozomului 7 care conține gena *ob* umană, așa cum s-a prezentat prin SEGMAP/versiunea 3,29 (Green și colab. *PGR Methods Applic.* 1:77-90 (1991)). Cele 19 STS-uri unice sunt ordonate în tabelul

RO 121036 B1

3 la partea superioară a acestuia. Cele 8 STSs microsatelite specifice sunt indicate cu asterisc 1
 în tabelul 4. Sunt indicate, de asemenea, STS-urile corespunzător genelor Pax4 și ob, ca și 3
 pozițiile prevăzute ale centromerelor (CEH) și 7q telomere (TEL) referitoare la contig. Fiecare 5
 dintre clonele 43 YAC sunt menționate prin linia orizontală, cu denumirea dată la stânga și 7
 partea YAU estimată (în kb, măsurată prin electroforeză cu pulsații) care se redă în paran- 5
 teze. Prezența YTS în MC este indicată printr-un cerc întunecat la o poziție convenabilă. 7
 Când STS corespunde la terminația inserției, YAC de la acesta este derivat. Pentru 5 YAC- 9
 uri la partea inferioară (sub linia orizontală) 1 sau mai mulți YTS(uri) așteptate a fi prezente 9
 (bazate pe ordinul STS stabilit) n-au fost detectate (așa cum se evaluează prin testarea 11
 YAC-urilor individuale cu STS specifice corespunzătoare analizei PCR, în număr de cel puțin 11
 două) și acestea sunt prezentate ca cercuri deschise la pozițiile corespunzătoare. Majori- 13
 tatea YAC-urilor sunt izolate dintr-un hibrid hamster-uman cu colecția de celule (Green și 13
 colab., *Genomics*, 25: 170-185 (1995)), cu denumirile lor originale, așa cum este indicat. 15
 YAC-urile care rămân sunt izolate din colecțiile genomice umane totale și localizarea colec- 15
 ției originale este prevăzută în tabelul 3. Boxele sunt plasate în jurul denumirii a 3 YAG (y 15
 WSS691, yWSS999 și yWSS2935) care au fost găsite prin analiza FISH în desen la 7q31,3. 17
 Contigul este dislocat în forma sa "necalculată" în care dimensiunile YAC nu sunt utilizate 17
 pentru a estima suprapunerea clonelor sau spațierea STS și toate STS-urile sunt astfel spa- 19
 țiate într-o manieră echidistantă. În forma "calculată" în care dimensiunea YAC se utilizează 19
 pentru estimarea distanței relative separând fiecare pereche adiacentă STS-urilor ca și extin- 21
 derea suprapunerii de clone, totalul YAC contig pare să cuprindă chiar peste 2Mb. 21

În continuare, este prezentată în general, metoda utilizată pentru identificarea mate- 23
 rialului genetic care exemplifică prezenta invenție. Această metodă cuprinde patru faze 23
 secvențiale:

(A) Cartarea genetică, B) Cartarea fizică, C) Izolarea genei candidat, și D) detectarea muta- 25
 ției. În cele ce urmează, se confirmă că, gena murinică a fost izolată (faza D) gena umană 27
 omoloagă a fost cercetată, fiind caracterizate atât genele murinice și umane, ca și proteinele 27
 putative. Fazele sunt prezentate cu detalii, în cele ce urmează.

A. Cartarea genetică

Mutația ob este segregată în încrucișări genetice și analiza legăturii standard este 29
 utilizată pentru poziția mutației relative la RFLPs (polimorfisme cu fragmente lungi, de res- 31
 tricție). Aceste date, plasează gena ob, în intervalul 5cM al cromozomului proximal 6, de șoa- 31
 rece (5cM reprezintă o măsură a distanței genetice corespunzătoare la 5 puncte de inter- 33
 secție genetice, aparente, la 100 de animale). În cartarea genetică ulterioară (Friedman și 35
 colab. 1991, așa cum s-a prezenta mai sus), sunt generate și utilizate, un total de 771 me- 35
 ioze informative. Poziția genetică care a fost o cartare relativă la ob, a fost publicată mai 37
 înainte. Cele două RFLP-uri apropiate, sunt descrise ca definite prin probe derivate din car- 37
 boxipeptidaza și genele met oncogene. Rezolvarea genetică a experimentelor descrise mai 39
 sus, este inadecvată la clona ob, în principal deoarece niciunul din markerii genetici nu for- 39
 mează o legătură solidă. În vederea identificării RFLP-urilor având legături solide, necesare, 41
 probele adiționale sunt izolate și încrucișarea genetică este expandată. O metodă cunoscută, 41
 microdisecția cromozomilor este utilizată pentru izolarea porțiunilor random de ADN din 43
 cromozomul proximal 6, de șoarece (Bahary și colab. *Mammalian Genome*, 4: 511 - 515 43
 (1993)). Probele individuale clonate, se testează pentru legătura solidă la ob. Pe această 45
 bază de studii, o probă D6Rck 13, denumită psd3, a fost selectată pentru analiza următoare 45
 aparținând propriei proximități genetice, față de ob. Această probă a fost utilizată la genotipul 47
 835 ob al descendentului din încrucișările interspecifice și intersubspecifice, care au indicat 47
 că, D6Rck 13 este non-recombinantă la toate animalele 835, așa cum s-a prezentat de către

Bahary și colab. În cursul cartării fizice, a fost identificat un nou marker polimorfic, dintr-un cosmid subclonal derivat în YAC53A6. Acest nou marker, a fost poziționat între D6Rckl3 și gena *ob* și a fost utilizat ca genotip adițional meiozelor, 771, informative, adiționale din încrucișările și încrucișările inverse intraspecifice. Un singur animal 167, a fost identificat că poartă un prag recombinant între *ob* și D6Rck39. Aceste studii arată că D6Rck 39/D6Rckl3 este -0,06 cM din *ob*. O probă adițională, Pax4, a fost identificată ca fiind 12 cM proximal la *ob*. Pax4 a fost recombinant la două animale; 111 și 420. Pax4 este un pseudogen care a fost cartat mai înainte la cromozomul 6 proximal de șoarece, de Gruss și colaboratori (Gruss și colab., *Genomics*, 11 : 424-434 (1991)). Pe această bază, s-a determinat că, gena *ob* rezidă în -0,2cM interval între Pax4 și D6Rckl3. Aceasta conduce la eforturi de clonare a ADN de inserare, la efortul de izolare a *ob*.

B. Cartarea fizică

Clonarea ADN în acest interval face utili cromozomii artificiali din drojdie (YAG), un vector de clonare relativ nou care permite clonarea sectoarelor lungi din ADN adiacent, adesea, mai mult de un milion de perechi de bază, în lungime.

Cromozomii artificiali de drojdie, sunt izolați utilizând D6Rckl3 și Pax4. Aceasta se însoțește de prepararea probelor de ADN purificate și utilizarea lor pentru izolarea YACs-urilor corespunzătoare. Aceste YAG (28, 16, 107 și 24) se izolează și se caracterizează inițial și pe baza rezultatelor analizelor, se ajunge la concluzia că, YAG 16 este YAC care se extinde apoi distal, de exemplu, cel mai apropiat față de *ob*. Terminația cheie a YAC 16 este apoi separată și se determină că această terminație este mai apropiată de *ob* decât Pax4. Această terminație este denumită 16M(+). Această concluzie a fost îmbogățită deoarece a arătat că această probă n-a fost recombinantă la animalul a 420 (ca și Pax4). Această terminație a fost secvențată și utilizată pentru dezvoltarea analizei PCR. Această analiză PCR a fost utilizată pentru screeningul colecției YAC. Se izolează patru clone pozitive. Caracterizarea ulterioară a acestor YAC-uri eliberarea terminațiilor, cartarea de restricție, gel electroforeză în domeniul impulsului și absorbția Southern cu încrucișări genetice, a determinat ca două din aceste YAC-uri, adu și aad, sunt critice pentru studiile ulterioare. YAC aad este de 550 kB, YAC nonchimeric, care are cea mai mare extindere distală. De aceea, terminația distală a acestui YAC, aad(pICL) s-a utilizat pentru completarea aplicației fizice. YAC și terminația sa distală, adu(+) s-a determinat ca fiind nonrecombinantă toți descendenții *ob* la animalele a 111 și 167 cu încrucișări genetice, sugerând că gena *ob* poate să rezide în acest TAC. Analiza PCR pentru aceste două terminații, aad (pICL) și adu(+), s-a dezvoltat și utilizat pentru izolarea mai multor YACs-uri și clone PI, pentru cartarea fizică continuă. Clonele importante P1, izolate prin acest efort, includ 498, 499, 500 (izolate utilizind proba derivată din aad(pICL) și 322, 323 și 324 (utilizând o probă din adu(+)). În același timp, YAC-urile izolate, au fost caracterizate prin D6Rckl3 (53A6, 25A6, 25A9, 25A10). Aceste studii au de terminat că, 53 A s-a extins proximal cel mai mult față de aad YAC. Dimensiunea intervalului între 53 A și aad a fost determinată a fi -70 kB. Terminația cheie de 53A6, 53 (pICL) a fost apoi utilizată pentru screeningul a trei colecții convenabile IAC și a colecției PI. Clona critică PI, 325 a fost izolată. Această clonă PI suprapusă cu clonele P1, izolate prin aad (pICL) și prin aad (pICL), au ca rezultat întreaga zonă adiacentă conținând YAC-urile și clonele P1, de -2,5 milioane perechi de bază în lungime și acoperind Pax4, 16 M(+), adu(+), aad(pICL), 53 (pICL), D6Rck39 și S6Rckl3 care sunt clonate. Prin cartarea atentă a porțiunilor de recombinare aparentă la animalele *111 și *167, s-a ajuns la concluzia că *ob* este situată la un interval de 400 kB. Pentru a se prevedea sursa de ADN care participă la izolarea genei *ob*, aproximativ 500 kB care acoperă regiunea de nonrecombinare, s-au izolat într-un număr total de clone de 24 P1. Aceste clone P1, incluzând 322 și 323, care sunt găsite a fi folositoare

RO 121036 B1

ca clone, au fost utilizate pentru captarea exonilor. Reprezentarea fizică a porțiunii de cromozom care poartă polipeptida *ob*, este arătată în fig. 7a. Fig. 7B reprezintă YAC adiacent fig. 7C reprezintă P1 adiacent.

C. Izolarea genelor candidate

Metoda utilizată pentru izolarea genelor în acest interval, a fost cea de captare a exonilor. Metoda aceasta este utilizată cu un vector comercial pentru identificarea exonului ADN (de exemplu, secvențele de codificare), prin selectarea legăturii funcționale din secvențele acceptoare și donoare, în ADN genomic, introdus în elementul de construcție testat. ADN-ul din aceste clone P1 a fost subclonat și dezvoltat în vectorul de captare a exonului. Aceste clone sunt inserții scurte clonate în vectorul Bluescript. Fiecare clonă a fost amplificată PCR, cu primerii PCR corespunzători secvențelor de plasmide care flanchează elementul de inserție. Amplificarea PCR este realizată direct pe bacteria care poartă plasmida. Reacțiile sunt stabilite, utilizând robotul Biomek. Produsele PCR sunt electroforizate pe gel de agaroză 1% în tampon TBS, care conține bromura de etidium. Tehnica de captare a exonilor a fost modificată, pentru eliminare de ADN din *Escherichia coli*, de contaminare, din clonele P1 și pentru screeningul exonilor artefactuali abundenți, care depășesc procentul de 80-90% de exoni putativi captați. Vectorul de captare a exonilor, include secvențele HIV; un scurt segment al secvențelor acestui vector, corespunde la acest produs artificial. Experimentarea captării exonilor a fost realizată utilizând diferite clone P1. Produsele de captare a exonilor, sunt apoi amplificate prin PCR, selectate și secvențate. Secvențele de "exoni" putativi sunt comparate cu cele din Banca Genetică, utilizând computerul Blast ca program. Aproximativ cincisprezece exoni se selectează pentru o altă examinare prin ET-PCR. Analiza Northern și absorbția zoo pentru prezența ARN-ului corespunzător sau a secvențelor conservate. Un număr de șapte din cincisprezece exoni putativi, 325-2, 323-9, 322-5, D1-F7, 1H3 și 2G7 au fost găsiți conținând un ARN de transcriere, 325-2 este o gena specifică de testare; 323-8 și 323-9 sunt asemănători celor doi exoni din aceeași genă exprimată în principal în creier și rinichi. 1H3 și 322-5 reprezintă două nivele scăzute a transcripților din creier. D1-F7 este un exon din gena clonată mai înainte, inozin monofosfat dehidrogenaza (IMPDH) care are perechi de exprimare omniprezente. Niciuna dintre aceste gene, nu pare să cuprindă polipeptida *ob* 2G7 care este exonul *ob*, așa cum se va discuta mai departe. După trei eforturi fără succes pentru captarea exonului genei *ob*, o altă încercare a fost făcută prin comasarea ADN-urilor de la toate P1-urile din regiunea critică *ob*. Acestea includ P1-urile: 258, 259, 322, 323, 324, 325, 498, 499, 500, 653, 654 și altele. Apoi, P1-urile 258, 260, 322 și 499 au fost subclonate în vectorul de captare a exonului și ulterior diferite plăci au fost preparate cu clonele bacteriene, din care fiecare a purtat un exon putativ. Au fost obținute aproximativ 192 de clone reprezentând candidații *ob* putativi. Așa cum s-a notat mai sus, un produs artifact consistent, asemănător multor astfel de produse izolate, conținând doi exoni captați derivați de la vector, au fost observate. Astfel, clonele au fost identificate atât în dimensiunea lor, cât și prin faptul că hibridizarea probelor de ADN corespunde benzilor de absorbție în testul Southern pe gel. În acest mod, clonele 185 până peste 192, au fost excluse dintr-o viitoare evaluare. Excluderea produselor artificiale numai pe baza dimensiunii, n-a fost posibilă, ca și cum în final s-ar ajunge la eliminarea exonului corespunzător *ob*. Astfel din cei 192 exoni, un număr total de 7 exoni au fost selectați pentru a fi mai departe studiați. Modelele de secvențare a șapte exoni, au fost preparate realizând astfel secvențarea. Secvențele pentru șapte exoni au fost analizate și s-a găsit că șapte dintre aceștia au fost identificați și unul a fost aparent artificial. În special, clona 1D12 a conținut "secvența HIV" de exemplu, o bandă artificială. Rămân apoi trei exoni pentru analiza următoare: 1F1 2G7 și 1H3. 1F1 este eliminat deoarece acesta este cartografiat în afara regiunii critice. Primerii PCR pentru ambele

RO 121036 B1

1H3 și 2G7, au fost selectați și sintetizați. Secvența exonului pe 2G7 a fost determinată, fiind prezentată în Fig. 10 (SECV. ID Nr. 7). Primerii pentru 2G7 sunt apoi selectați și sintetizați. Porțiunile secvenței corespunzător primerilor PCR sunt subliniate. Primerii utilizați sunit următorii:

5' CCA GGG GAG GAA AAT GTG (T_m = 60,0° C)

(SECV: ID Nr.8)

3' CAT CCT GGA CTT TCT GGA TAG G (T_m = 60,0°C)

(SECV. ID Nr.9)

Acești primeri amplifică genomul ADN cu PCR, în condițiile următoare 25-30 cicluri la 55°C, cu susținere pentru 2' la 72°C, extensie pentru 2' la 94°C, denaturare pentru 1± în PCR tampon, standard. Acești primeri au fost așadar utilizați pentru a genera o probă marcată, prin includerea ³²P-dCTP în reacția PCR, cu reducerea corespunzătoare a cantității de dCTP rece. Un RT-PCR este realizat pe o varietate de țesuturi-ARN și s-a concluzionat că 2G7 este exprimat exclusiv în țesutul gras alb, printre țesuturile examinate (Fig. 11A). Apoi 2G7 marcat cu ³²P a fost hibridizat la ARN-urile tisulare așa cum s-a dovedit prin analiza de absorbție Northern (Fig. 11 B) și s-a arătat ca ARN-ul a fost exprimat la un nivel ridicat în țesutul gras, dar acesta a fost exprimat sau neexprimat la nivele foarte scăzute în toate celelalte țesuturi (unde semnalele pot fi rezultatul contaminării grăsimii din preparatele tisulare). Zece μg din ARN-ul total din fiecare dintre țesuturile menționate sunt supuse electroforezei pe gel de agaroză, cu formaldehidă. Proba este hibridizată prin absorbție la temperatura de 65°C în tampon de hibridizare standard, Rapid Hybe (Amersham). Dimensiunea ARN a fost de aproximativ 4,9 kB. La acest punct 2G7 s-a considerat a fi o genă candidată viabilă, pentru *ob* și a fost apoi analizată.

D. Detectarea mutației

În vederea confirmării că 2G7 care cuprinde gena *ob* este necesar să se demonstreze diferențele în nivelele exprimării ARN din secvența ADN a acestei gene în mutant, prin comparație cu animalele de tip sălbatic. Două mutații separate ale genei *ob*, sunt convenabile pentru studiu, C57BL/6J *ob/ob* (1J) și CkC/Smj *ob/ob* (2J). Acestea se vor referi apoi la 1J și respectiv 2J. (Nomenclatura informată este utilizată referindu-se la tulpinile de șoareci studiate. Pretutindeni în această descriere și în figuri, se va înțelege că C57BL/6J se referă la C57BL/6J+/+; CKC/smJ se referă la SM/CKC -+^{Dac}+/+; CKC/smJ *ob/ob* se referă la SM/CKC-+^{Dac}-*ob*^{2J}/*ob*^{2J}). ARN s-a preparat din țesutul tisular care a fost izolat din 1J, 2J și animalele martor. ARN total pentru fiecare probă a fost tratat cu DNază și apoi a fost transcris invers. ADNc rezultat, simplu răsucit, a fost apoi amplificat prin PCR fie cu primerii 2G7 (condițiile sunt arătate mai sus) pentru banda inferioară sau cu actin primerii comercial convenabili pentru banda superioară. Produsele RT-PCR sunt aduse pe gel de agaroză 1% TBE fiind colorate cu bromură de etidium (fig. 12A). Utilizând RT-PCT s-a găsit că în timp ce 2G7 ARNm este exprimat în 1J în toate probele martor de șoarece, acesta a lipsit complet de 2J la șoarece. Nici un semnal n-a fost detectat după 30 de cicluri de amplificare. Acest experiment a prevăzut o evidență directă că 2G7 a corespuns la un exon din gena *ob* deoarece mutația 2G7 este relativ recentă și este menținută ca tulpină coisogenică, acest rezultat a fost prima evidență convenabilă care a indicat că 2G7 este un exon din gena *ob*, mutația localizată, asemănătoare în regiunea promotoare care duce la un eșec total al sintezei ARNm. Prezența unui semnal la 1J de șoarece în acest experiment RT-PCR sugerează ca 1J ar putea purta punctul de mutație care nu rezultă în mărimea schimbării măririi în dimensiunea probei de ARN. În plus, 2G7 ARNm este absent, când este testat prin RT-PCR din patru animale 2J adiționale.

RO 121036 B1

Acest rezultat este confirmat prin analiza de absorbție Northern (fig. 12B). ARN-ul celulelor grase este preparat din fiecare tulpină (G57B1/6J), 1J, CKC/smj și 2J). Se prelucrează 10µg din acest ARN și apoi se analizează prin absorbție Northern. Pata este comparată cu proba 2G7 care a fost marcată cu PCR prin amplificarea materialului, de exemplu banda din fig. 11, utilizând ³²P-dCTP în reacția PCR. Actina este controlul pentru cantitatea de ARN încărcată. Semnalul actinei este la fel de obiectiv în toate probele. Semnalul *ob* este absent în creier deoarece ARNm este specific celulelor grase. Rezultatele analizei Northern confirmă că ARN-ul specific 2G7 este absent în cazul 2J la șoareci. ARN *ob* este absent în CKC/smj *ob/ob* la șoareci deoarece această genă a tulpinii mutante obeze este distrusă fără a se obține vreun ARN. În plus, nivelul de 2G7 din ARN este crescut de la 10 la 20 de ori în 1J ca și țesutul gras *db/db*. Aceste rezultate sunt compatibile cu ipoteza că atât *ob* cuprinzând hormonul de circulație sau responsabilul pentru generarea semnalului din celulele grase, modulează greutatea corporală. Aceste rezultate determină concluzia că 2G7 este gena *ob* și se prevede ca 1J la șoareci să aibă un punct de mutație probabil o mutație nonsens care duce la o terminație prematură a translației. Rezultatele analizei Northern au fost replicate utilizând preparatele de ARN în celule grase de la patru animale diferite 2J (fig. 13). În această analiză, *ap*² este un element de transcriere specific celulelor grase care s-a utilizat drept control mai mult decât actina în fig. 12B. Nu este vreo semnificație în ceea ce privește densitatea bandei *ap*². *ap*² este marcată prin desemnarea primerilor PCR în forma din secvența *ap*² publicată. Produsele RT-PCR ale ARN în celulele grase sunt apoi marcate din nou, utilizând protocolul pentru marcarea PCR. Această analiză demonstrează prezența ARNm *ob* la animalele normale homozigote sau heterozigote și în absența acestuia la animalele mutante 2J. Mutația a fost identificată la șoareci 1J. Mutația este o schimbare de bază C cu T, care rezultă din schimbarea argininei la un codon de stop prematur aparent, la aminoacidul 108 și la toate interpretările de probabilitate pentru mutația 1J (fig. 14), cu toate nivelele ridicate de exprimare a ARNm *ob* (vezi fig. 12 și fig. 13, C57BL/6J zonele *ob/ob*). Mult mai recent, analiza de absorbție Southern a fost utilizată pentru a conchide că mutația 2J este rezultatul unei schimbări ARN detectabile la terminația 5' a *ob*, care pare să completeze exprimarea ARN abolit. Natura exactă a acestui rearanjament posibil rămâne să fie determinată. Analiza de absorbție Southern a ADN genomic din CKC/smj-(SM/Ckc- +^{DaC}) și G57BL/6 J la șoareci, utilizând patru endonucleaze de restricție diferite s-a realizat în vederea determinării, dacă mutantul *ob* produce un model de fragment unic (fig. 15A. Aproximativ 10 µg de ADN (derivat de la ADN genomic preparat din ficat, rinichi sau splină) se digeră cu enzima de restricție indicată. ADN este apoi supus la electroforeză pe gel de agaroză 1% TBE. ADN este transferat la membrana imobilon și hibridizat la proba PCR marcată 2G7. Banda cheie este banda superioară în elementul de digestie Bg/II pentru CKC/smj *ob/ob* (SM/Ckc- +^{DaC} *ob*^{2J}/*ob*^{2J} ADN. Această bandă este cu greutatea moleculară mai mare decât la alte tulpini indicând o mutație în această tulpină. Fig. 15B este absorbția Southern a elementului de digestie Bg/II a ADN genomic din descendentul încrucișării *ob*^{2J}/+x *ob*^{2J}/+. Câteva secvențe ADN au numai banda superioară, câteva având numai banda inferioară și câteva, pe ambele. Animalele având numai banda superioară sunt allo-obeze, de exemplu *ob*^{2J}/*ob*^{2J}. Aceste date arată că polimorfismul (de exemplu mutația) prezentat în fig. 15A este segregat în sens genetic.

Exemplul 1. Clonarea ADNc și determinarea secvenței *ob*

Utilizând proba PCR marcată 2G7, s-au izolat în total cincizeci de clone ADNc la șoareci, din colecția ADNcλgt 11 celule grase murinice (Clonetech 5'-STRECH ADNc din țesutul gras testicular al șoarecelui elvețian, *ML 3005b) și treizeci clone ADNc umane, de hibridizare încrucișată, din colecția de celule grase umane λgt 10 cDNA (Clonetech 5'-STRECH

RO 121036 B1

ADNc din abdomen *HIII08a). Screeningul colecției a fost realizat utilizând procedeul pe placa lift. Filtrele de pe placa lift sunt denaturate utilizând metoda de autoclavare. Filtrele sunt hibridizate în duplicat, cu proba PCR cu marcarea 2G7 (Tampon rapid Kybe, Hybe, la temperatura de 65°C, până a doua zi). După 2 până la 4 h de prehibridizare, filtrele sunt spălate de două ori cu SSC, 2% SDS, de două ori, timp de 30 min la temperatura de 65°C și apoi sunt expuse la filmul de raze X. Duplicatul pozitiv a fost placa purificată. Fagul din placa purificată a fost amplificat PCR, utilizând primeri vectori comerciali convenabili, de exemplu λ gt10 și λ gt11. Produsele PCR rezultate, corespund inserției ADNc pentru fiecare fag, cu o cantitate mică din secvența vectorului la fiecare terminație. Benzile au fost purificate pe gel și secvențate, utilizând ordonatorul automat ABI și primerii vectorilor pentru proba ADN polimerazei.

Datele de secvențare brute au fost apoi examinate manual, bază cu bază, pentru corectarea greșelilor sonore din programul computerului. Deoarece secvența corectă devine corespunzătoare, primerii din circuitul inferior sunt sintetizați și utilizați pentru o secvențare continuă. Astfel de experimente sunt repetate până ce fiecare clonă ADNc accesibilă este accesibilă este secvențată și sintetizată într-un numărător. Până acum, 3000 de perechi de bază din 5' terminal al ARNm au fost compilate. Una din clonele ADNc a fost extinsă la terminația 5' a ARNm, deoarece secvența acesteia a fost identică cu cea a produsului 5'RACE al ARN din țesutul gras (datele nu sunt prezentate).

Datele de secvențare arată că există 167 aminoacizi în cadrul de citire deschisă (fig. 1). Secvența consens de inițiere a translației Kozak, a fost prezentă cu un reziduu de adenozină în circuitul ATG cu trei baze. Două clase de ADNc au fost găsite ca fiind diferite prin incluziunea sau exclusiunea unui singur codon de glutamină. Acest reziduu este găsit într-o poziție imediată 3' la acceptorul legăturii, exonului 2G7. Deoarece codonul CAG al glutaminei include o posibilă secvență acceptor de legătură AG, se pare că există clivaj la porțiunea acceptoare de legătură cu o aparentă anulare a 3 perechi de bază, în subsetul ADNc, așa cum este arătat mai jos.

gln ser val
ag GAG TGG GTA (cu glutamină (SECV. 1D Nr.17)

↑
(porțiunea acceptor de legătură)

ser val
ag GAG TCG GTA

↑
(porțiunea acceptor de legătură)

În secvențele de mai sus, "ag" corespunde la circuitul presupus al secvenței intron în codonul de glutamină și AG este o porțiune de legătură alternativ-putativă. Acest reziduu de glutamină este localizat într-o regiune superior conservată a moleculei și importanța acesteia pentru activitatea biologică, este încă necunoscută.

S-a detectat o secvență semnal putativă N-terminal, porțiune de clivaj semnal care probabil are capătul carboxi terminal la reziduu de alanină de la aminoacidul din poziția 21. Această secvență semnal putativă a fost confirmată prin aplicarea algoritmului computerului la metoda von Heijne. Utilizând această tehnică, secvența semnal cea mai probabilă a fost identificată în regiunea, de codificare a polipeptidei corespunzătoare aminoacizilor 1-23, având secvența:

MCWRPLCRFLWLWSYLSYVQA ↑ VP (SECV. ID Nr. 10),

RO 121036 B1

În care săgeata indică porțiunea de clivaj din secvența semnal putativă. Restul secvenței de aminoacizi este mult hidrofilă și nu are nici un motiv structural notabil sau domenii de măsură a membranei altele decât secvența semnal N-terminal. În mod specific, nu s-a găsit secvențe consens pentru glicozilarea cu legătură N sau secvențe de amino acid bibazic, indicative pentru cleavajul proteinei în cazul proteinei prevăzute pentru prelucrare (Sabatini și colab. *The metabolic basis of inherited disease*, pp. 177-223, C.V. Scriver și colab. eds. McGraw-Hill, New York). Bazele de date ale cercetărilor efectuate utilizând programele Blast și Block n-au identificat nici o secvență omoloagă.

ARN-ul în țesutul gras uman a fost analizat prin absorbție Northern, fiind detectate specii de ARN cu dimensiuni similare genei *ob* la șoareci. Secvențarea și analiza clonelor ADNc arată că *ob* umană cuprinde polipeptida având 167 aminoacizi (fig. 2A și B și fig. 3). Două clase de ADNc, cu sau fără anularea a trei perechi de bază, au fost găsite la om (fig. 6). Genele *ob* umane și de șoarece, sunt superior omoloage în ceea ce privește regiunea de codificare prevăzută, dar au numai 30% omologie în regiunile, *ob* umană, netransferate 3' și 5'. O secvență semnal cu capătul N-terminal este, de asemenea, prezentă în polipeptida *ob* umană. Compararea secvențelor polipeptidice *ob* la om și șoarece arată ca cele două molecule și participă, în general, cu o identitate de 83%, la nivelul de aminoacizi (fig. 4). Capătul N-terminal al proteinelor mature din ambele specii participante chiar la omologie superioară, au numai șase substituiri de aminoacizi conservative și trei substituiri de aminoacizi neconservative, între cele 100 de reziduuri de aminoacizi cu N-terminal. ADN genomic este izolat de la șoarece, șobolan, iepure, șoarece de câmp, pisică, vite, oi, porci, oameni, pui de găină, țigar și *Drosophila*, digestia de restricție fiind efectuată cu EcoR1. Materialul digerat este electroforizat pe gel de agaroză 1% TBE. ADN este apoi transferat membranei imobilizate și probat cu ajutorul probei PCR cu marcă 2G7. Filtrul a fost hibridizat la temperatura de 65°C și spălat de două ori cu SSC, 0,2% SDS la temperatura de 65°C, de două ori, timp de douăzeci de minute pentru fiecare spălare, tamponul fiind schimbat de două ori. Aceste date arată că *ob* este conservată printre vertebrate (fig. 16). În această privință se va nota că există un semnal 2 + la ADN de țigar; țigarul este un pește.

În rezumat, o evidență corespunzătoare sugerează că greutatea corporală și adipozitatea sunt controlate fiziologic. Cu șapte ani în urmă, eforturile duc la identificarea a două componente cheie a acestui sistem: genele *ob* și *ob*. Așa cum s-a arătat în acest exemplu, gena *ob* a fost în prezent identificată, ca o genă specifică pentru celulele grase, care joacă un rol cheie în reglarea greutății corporale. Produsul acestei gene în care cel mai probabil este un hormon secretat, va avea importante implicații pentru diagnoza și tratamentul tulburărilor nutriționale la oameni și animale neumane.

Exemplul 2. Exprimarea *ob* la bacterii

Atât ADNc umane, cât și cei murinici codificați *ob* au fost clonați în vectorul de exprimare pET-15b (Novagen). Acest vector conține promotorul T7 în conjuncție cu operatorul lac și se exprimă proteina de fuziune conținând terminația de histidină (His-tag) și o porțiune de/clivaj a trombinei lângă circuitul porțiunii de inserție a secvenței de codificare (fig. 17) (SECV. ID Nr. 11 și 12). ADNc uman și de șoarece se modifică astfel că alanina, de la capătul secvenței semnal este răsucită la porțiunea NdeI, ca o secvență separată în regiunea 3'. Inserția porțiunii NdeI este desăvârșită, utilizând noii primeri ai PCR:

Mnde-5' (primii cinci primeri de murine):

CTTATGTTCA TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC (SECV. ID. Nr.13)

Mnde-3' (primii trei primeri de murine):

TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC (SECV. ID Nr.14)

Hnde-5' (primii cinci primeri umani):

RO 121036 B1

1 TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC (SECV. ID Nr.15)

Hnde-3'(primii trei primeri umani):

3 TTCCTTCCCA TATGGTACTC CTTGCAGGAA GA (SECV. ID Nr.16).

Primerii conțin în mijloc 6 perechi de bază cu dereglări, care sunt introduse în porțiunile de restricție NdeI, la fiecare capăt al fragmentului PCR. Fagul purtând fie ADNc umană, fie ADNc de șoarece, este amplificat PCR, utilizând acei promotori. Produsul PCR este digerat cu NdeI și purificat pe gel, pe un gel de agaroză 1%, având un punct de topire scăzut. Benzile de gel purificat, sunt supuse la subclonare în vectorul pET. Plasmidele care rezultă, sunt secvențate pentru a asigura că mutațiile nu sunt introduse în timpul fazei de amplificare PCR a clonării. Elementele de constructului pentru ADNc uman și murinic, au fost preparate pentru codificarea ADNc și în care glutamina 49 este absentă. În special elementele de construct pET 15b conținând fie secvența de codificare a *ob* umană, fie pe cea de șoarece, minus secvența semnal și fuzionate la Histag, au fost realizate utilizând metoda de clonare PCR. Aceste elemente de construct au fost secvențate pentru a asigura că nici o eroare de secvență n-a fost introdusă în regiunea de codificare a genei *ob* în timpul fazei de amplificare PCR. Două plasmide de construct rezultante, pETM9 și pETH14, sunt selectate pentru transformarea exprimării celulelor gazdă, bacteriene. Prin inducția cu 1mM IPTG în condiții optime, bacteria transformată este capabilă de a produce 100-300 μg/ml, polipeptidă *ob* de fuziune. Majoritatea proteinei *ob* de fuziune a fost găsită în corpul de incluziune. După solubilizare cu 6M guanidină -HCl sau uree, proteina de fuziune a fost purificată pe o coloană de rezine, cu legături His (Ni-chelare). Condițiile pentru purificarea pe coloană a proteinei de fuziune *ob* (incluzând legarea, spălarea și eluarea) au fost stabilite experimental. Proteina de fuziune *ob* se leagă la rezină la 5mM imidazol/6 M guanidină -HCl și rămâne legată până la 20 mM imidazol/6 M guanidină -HCl. Proteina poate fi eluată din rezină la 60 mM imidazol/6 M guanidină (fig. 18 A, B). Ambele proteine de fuziune *ob* purificate, umane și de șoarece au fost apoi dializate în PBS pentru separarea guanidinei -HCl din preparat, apoi se utilizează pentru creșterea, anticorpilor policlonali. În vederea testării activității biologice a produselor proteinelor de fuziune, condițiile de multiplicare a proteinelor purificate, au fost testate și dezvoltate. Acestea cuprind dializa inițială a proteinei de fuziune în soluția 1M guanidină, urmată de diluarea cu 0,4 M a soluției de arginină. His-tag se îndepărtează din proteinele de fuziune, înainte de analizare pentru funcția biologică. Capătul separat este obținut prin tratarea proteinei de fuziune cu trombina din placenta umană. În plus, secvențele de codificare a genei *ob* de șoarece și umane, minus secvența semnal, trebuie să fie fiecare înserate în vectorul pET 12 c, utilizând metoda de clonare PCR. Aceste elemente de construcție pot fi direct sintetizate pe proteinele de fuziune *ob*, în spațiul periplasmatic al celulelor bacteriei gazdă. Proteina de fuziune separată din spațiul periplasmatic, necesită numai o simplă gel filtrare pentru a fi purificată din proteinele gazdă și nu va fi denaturată în timpul acestui procedeu.

39 Exemplul 3. Prepararea anticorpilor polipentidei *ob*

În mod suplimentar utilizării proteinei recombinante pentru generarea anticorpilor policlonali, un set de patru secvențe peptide, din secvența *ob* murinică astfel dedusă, au fost identificate utilizând imunogenicitatea fragmentelor software (GCC Package). Cele patru fragmente de peptide cu carboxil terminal, sunt:

(SECV. ID Nr.18):

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

(SECV. ID Nr.19):

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

(SECV. ID Nr.20):

RO 121036 B1

Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp (SECV. ID Nr.21):	1
Ser-Arg -Leu -Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys	3
Aceste peptide sunt conjugate la KLH și peptidele KLF conjugate sunt utilizate pentru imunizarea iepurilor, utilizând tehnici standard.	5
Antiserul specific policlonal pentru fiecare peptidă este recuperat de la iepuri.	
Exemplul 4. Translocarea polipeptidei ob, <i>in vitro</i>	7
În vederea confirmării prezenței secvenței semnal funcționale, ADNc uman care include întregul cadru de citire deschisă, este subclonizat în vectorul pGEM. Numai ADNc uman este utilizat în acest experiment deoarece subclonele de șoarece n-au fost separate. Filamentul pozitiv de ARN ob uman, este transcris utilizând polimeraza Sp6 și s-a utilizat în reacția de translație <i>-in vitro-</i> , cu sau fără membranele microzomale pancreatice, canine. Produsul de translație primar care a migrat cu o greutate moleculară aparentă de 18 kD, care este consistentă cu cea prevăzută de secvența ADNc. Incluziunea membranelor microzo- male în reacție, a inhibat eficiența generală a translației, de 5 ori. Cu toate acestea, aproxi- mativ 50-70% din produsul de translație primar ob, a fost redus de aproximativ 2kD, în pre- zența preparatului de membrană, sugerând că, secvența semnal este funcțională (fig. 19A). Dimensiunea produsului de translație al interleukinei-1 alfa REA, care nu codifică secvența semnal, a fost neschimbată, când membranele microzomale au fost incluse în reacție. În vederea confirmării că translocarea proteinei ob a avut loc, produsele de translație <i>-in vitro-</i> au fost tratate cu Proteinaza -K. Tratamentul proteazei a rezultat în proteoliza completă a produsului de translație primar 16 kD, în timp ce forma prelucrată 16 kD a fost neafectată prin tratamentul enzimatic, indicând că acesta s-a translocat în lumenul microzomilor (fig. 19B). Datele sunt compatibile cu ipoteza că, ob este o moleculă secretată. După clivajul sec- venței semnal, două reziduuri de cisteină vor rămâne în proteina prevăzută, crescând posi- bilitatea ca molecula să conțină o legătură de bisulfură caracteristică altor polipeptide secre- tate (Shen și colab. <i>Science</i> , 224:1(1984)).	9 11 13 15 17 19 21 23 25 27
Exemplul 5. Caracterizarea Genei ob	
Pentru stabilirea legăturilor între modificările de obezitate și modificările genetice ale genei ob la om, secvența genei ob umane a fost determinată (vezi fig. 20 A până la C) (SECV. ID Nr.22 și 24). Primerii specifici pentru secvența de codificare umană s-au utilizat pentru screeningul colecției P1 umane. Au fost obținute trei clone P1, diferite, care s-au dez- voltat și amplificat PCR, utilizând primerii care flanchează porțiunea de legătura între primul și cel de-al doilea exon de codificare. Întreaga regiune a intronului, în jurul 2kb, a fost amplifi- cată și parțial secvențată (vezi fig. 20A; și așa cum s-a indicat în SECV. ID Nr.22 și 24). Structura genei în ambele gene umane și murinice, a fost caracterizată utilizând analizele PCR și alte tehnici standard. Gena ob de șoarece a fost găsită a fi consistentă celor trei exoni, din care al doilea și al treilea participă la interpretarea secvenței de codificare (fig. 20D). Regiunea de codificare a genei ob umane prezintă aceeași structură; cu toate acestea, genei umane îi lipsesc exonul 5' și intronul (fig. 20E).	29 31 33 35 37 39
Două seturi de primeri generați din secvențele intronice ale genei umane au fost preparate (fig. 20A până la G). Secvențele primerilor sunt următoarele & F și R se referă în continuare și respectiv invers):	41 43
HOB 1gF 5'-CCCAAGAAGCCCATCCTG-5' (SECV. ID Nr.29)	
HOB 1gR 5'-GACTATGGGTCCAGTCCAGTGCC-3' (SECV. ID Nr.30)	45
HOB 2gF 5'-CCACATGCTGAGCACTTGTT-3' (SECV. ID Nr.31)	
HOB 2gR 5'-CTTCAATCCTGGAGATACCTGG-3' (SECV. ID Nr.32)	47

Probele de ADN au fost obținute din diferite surse și aceste seturi de primeri au fost utilizate pentru amplificarea ADN genomic uman, din diferiți indivizi obezi. Produsele PCR sunt aduse pe gel de agaroză cu punct de topire scăzut și benzile au fost separate și digerate cu agaroză. Secvențele au fost obținute utilizând ordonatori ABI 373A ADN și kitul terminator Taq dideoxi (ABI, Perikin-Elmer). Un punct de mutație în gena *ob* dintr-o probă a unui pacient, a fost detectată până în prezent. Această mutație este în primul exon și nu modifică secvența de aminoacid. Datele preliminare arată că secvența de inserție poate fi prezentă în primul exon al altui pacient. O metodă de secvențare automată diferită, utilizând Seque-neza în loc de polimerază, poate fi utilizată pentru a produce mult mai ușor de secvențe pentru detectarea mutației, care sunt ușor citibile.

Exemplul 6. Exprimarea *ob* în drojdii

Urmărind clonarea pozițională a *ob*, este important să se dezvăluie mecanismul fiziologic prin care proteina *ob* reduce consumul de hrană și greutatea corporală. Prima fază în această direcție a fost de a produce recombinant, o proteină funcțională, utilizând un sistem de exprimare. În plus față de sistemul de exprimare bacterian, cu succes deplin, a fost, de asemenea, selectat un sistem de exprimare la drojdie. Exprimarea drojdiei are diferite caracteristici atractive, pentru exprimarea *ob*. Cea mai importantă este că, proteinele eucariote active biologic, sunt mult mai probabile de a fi produse. Polipeptida *ob* este secretată de celulele mamifere. Secreția de proteină este foarte similară celor eucariote, ceea ce înseamnă că aparatul secretor de drojdii este mult mai similar modulului secretor la mamifere, față de cel secretor la bacterii. În special, modificările de proteină *ob* văzute în celulele de mamifere, vor putea fi văzute asemănător în exprimarea prin sistemul secretor de drojdie. În plus, multiplicarea proteinei este efectuată în trecerea prin aparatul secretor și astfel se eliberează prin aparatul secretor al drojdiei, asemănător modulului de multiplicare a proteinei cu o activitate biologică nativă. Acest fapt este semnificativ pentru *ob*, deoarece reziduurile celor două cisteine pot forma o punte bisulfurică. În contrast cu modul secretor, zona de reducere a citoplasmei celulare, previne formarea punților bisulfurice și de aceea, este esențial ca *ob* să treacă prin sistemul secretor în vederea formării acestei legături bisulfurice, *in vivo*. Alte avantaje determină, cu ușurința și rapiditatea manipulării drojdiei, disponibilitatea vectorilor și a tulpinilor și o vastă experiență în domeniul tehnologiei recombinante la drojdii. Sistemul de exprimare pentru *Pichia pastoris* a fost ales din patru motive: (1) acesta conține nivele superioare de exprimare a proteinei heterologe, față de sistemele prevăzute pentru drojdii, cum ar fi *Sacharomyces cerevisiae*; (2) glicozilarea proteinei este similară sistemului de mamifere din *Pichia pastoris* decât pentru *Sacharomyces cerevisiae* (așadar, porțiunile de glicozilare nu au fost detectate pentru *ob*, utilizând un computer de cercetare, rămânând încă posibilitatea de glicozilare a porțiunilor neidentificate); (3) *Pichia pastoris* secretă foarte puține proteine native și astfel, este în general simplu de purificat proteina străină, astfel exprimată; și (4) vectorii și speciile de drojdie sunt convenabile produse comerciale (din Invitrogen). Două strategii pentru generarea vectorilor de exprimare la drojdii sunt prezentate în fig. 21 și 22. Vectorul ales este pPIC.9. Acest vector conține porțiunea de clonare chiar sub circuitul inferior al factorului de conjugare *alfa*, al secvenței de codificare prepro, care dirijează proteina codificată, prin gena clonizată, în porțiunea de clonare care trebuie secretată de sistemul secretor. Altă caracteristică importantă a vectorului este gena HIS4 care permite selectarea pentru absorbția vectorului, utilizând tulpina de drojdie auxotropică pe mediul deficitar de histidină, urmând apoi transformarea drojdiei, cu acel vector. Strategia de clonare a fost următoarea: amplificarea PCR a ADNc *ob*, utilizând primerul 5' care conține la capătul 3', secvența complementară secvenței *ob*, chiar după porțiunea de clivaj a peptidei conducătoare, prevăzută și terminația 5', are o secvență complementară terminației 3' a

secvenței factorului de conjugare *alfa*, al vectorului. Primerul 5' conține așadar, o porțiune
 XhoI. Primerul 3' a fost desemnat să aibă la terminația 3', o secvență complementară la
 ultimii câțiva aminoacizi ai *ob* și porțiunea EcoRI la terminația 5'. Urmărind amplificarea PCR,
 produsul PCR a fost digerat cu XhoI și EcoRI și clonat printr-o digestie similară pPIC.9.
 Urmărind clonizarea ambilor ADNc *ob* la om și șoareci, fiecare cu sau fără glutamină la codo-
 nul 49, clonele individuale au fost izolate pentru toate patru elementele de construcție și
 secvențate pentru verificarea că aceste elemente de construcție au fost clonizate într-o orien-
 tare corectă și structura, care nu conține nici o mutație din faza de amplificare PCR. După
 identificarea clonelor cu secvența corectă, acestea au fost transformate în tulpină de *Pichia*
pastoris GS115, un auxotrof de histidină. Pentru două elemente de construcție a *ob* la șoa-
 recii, clonele de drojdie transformate, sunt supuse unui screening pentru exprimarea pro-
 teinei. Ca urmare a evidenței că drojdia transformată conține *ob*, s-au efectuat analiza ADN
 de absorbție și analiza de hibridizare a coloniei, ambele arătând secvența *ob* în drojdia trans-
 formată, dar nu și în drojdia netransformată. În continuare, drojdia transformată a secretat
 proteina 161cD într-un mediu de cultură, în care, drojdia netransformată nu secretă o pro-
 teină de această dimensiune (fig. 23A). Aceasta este dimensiunea prevăzută a *ob*. Clonele
 individuale pentru ambele elemente de construcție la șoareci, au fost identificate ca fiind
 expresori superiori ai *ob* și curent, strategia de purificare a fost dezvoltată pentru purificarea
ob, pentru omogenitate. O tehnică a fost purificarea *ob* pe o coloană cu schimbători de
 cationi (fig. 23B): datele preliminare sugerează că poate fi utilizat un schimbător cationic
 puternic. Cu toate acestea, după cromatografia cu schimbători cationici, produsul *ob* putativ
 este pierdut. Aceasta indică prezența unei proteaze în probă. O strategie pentru câștigarea
 acestei probleme, este de a prepara fuziunile His-tag *ob* pentru exprimare în drojdie (fig. 22).
 O altă evaluare a fost demonstrată pentru *ob* care nu se asociază solid cu His-tag, dar se
 asociază cu coloana Ni-chelare. Purificarea polipeptidei *ob* prin Ni-chelare, urmată de gel
 filtrare, duce la obținerea unui produs de o puritate suficientă pentru analiza spectrală de
 masă. Prin spectroscopia de masă, se confirmă că greutatea moleculară a proteinei expri-
 mate, este identică cu greutatea moleculară prevăzută, care confirmă faptul că *ob* a fost
 exprimată cu succes în *Pichia*. Cu toate acestea, protocolul de purificare prin gel filtrare/Ni-
 chelare, nu produce o polipeptidă *ob* într-o formă suficient de pură. În mod suplimentar, sunt
 prezente molecule mici. Se pare că, activitatea proteolitică eluează din coloana Ni-chelare
 în volumul liber. În acest sens, este planificat un procedeu de purificare în trei faze: Ni-che-
 lare, schimb cationic (care elimină contaminanții cu molecule mici), urmând apoi gel filtrarea.
 Prin estimarea nivelului de exprimare prin reacția de colorare cu albastru Coomassie a
 gelului SDS PAGE, sunt prezentate aproximativ 10 miligrame/litru, când drojdia se dezvoltă
 în flacoane sub agitare. Aceste nivele sunt așteptate să crească în vasele de fermentație și
 fermentația este inițiată cu speranța obținerii unor cantități mai mari de proteină. Cu privire
 la elementele de construcție *ob* umane, clonele de drojdie transformate, conținând nume-
 roase copii de genă *ob*, au fost identificate și este de așteptat ca acestea să exprime pro-
 teina *ob*. Pe măsura dezvoltării anticorpilor, aceștia vor fi utilizați pentru confirmarea identi-
 tății proteinei secretate 16kD.

Exemplul 7. Exprimarea nivelului superior al peptidei de fuziune *ob* la bacterii. Prepa- rarea stocurilor congelate

La fiecare din cei doi alicotți de 4 ml de mediu sterilizat M9ZB, fără sursă de carbon,
 se adaugă 40 μl dextroză stoc (0,4 g/ml, filtrat pentru sterilizare), 10 μl stoc de ampicilină
 (200 mg/ml și 5 μl stoc de cloramfenicol mililitru, în etanol). Pentru inoculare se utilizează o
 singură colonie de *Escherichia coli* cu *ob* 1 ADN clonat, uman și șoarece într-un vector
 Novagen pET-14 b. Tuburile sunt incubate la temperatura de 37°C până a doua zi. Se iau

RO 121036 B1

1 apoi 0,5 ml din culturile obținute a doua zi, care se utilizează pentru inocularea a 50 ml de
mediu M9ZB cu dextroză, ampicilină și cloramfenicol. Acestea sunt incubate la temperatura
3 de 30°C și absorbanta la 600 nm (A_{600}) a fost monitorizată periodic. La A_{600} de aproximativ
1-1,2, 175 μ l alicofți de cultură, se amestecă cu 25 μ l 60% glicerol în tuburi eppendorf, de 2
5 ml, congelate rapid în lichid de nitrogen și păstrate la temperatura de -80°C.

Dezvoltarea culturii: 50 ml din mediul M9ZB cu 0,5 ml de dextroză 40%, 125 μ l ampi-
7 cilină stoc și 50 μ l cloramfenicol stoc, au fost inoculați cu 1 ml stoc congelat și incubat la
30°C. La A_{600} de 1-1,2, 10 ml din această cultură se utilizează pentru inocularea fiecărui grup
9 de patru flacoane a 2 l, cu 500 ml din mediul M9ZB cu dextroză, ampicilină și cloramfenicol.
Materialul este incubat la 30°C până la o inducție de A_{600} de aproximativ 1-1,2 cu o con-
11 concentrație finală de 0,5 mM IPTG. Culturile sunt incubate până a doua zi. Celulele sunt recol-
tate prin centrifugare la 4000 rotații pe minut, timp de 20 min. Acest sistem de exprimare
13 produce o polipeptidă ob recombinantă, ca un procentaj superior, corect, de proteine totale,
pe ordinul de grame/litru de *Escherichia coli*.

15 *Liza celulară și resuspendarea corpiilor de incluziune*

Pasta celulară este resuspendată într-un volum minim de 20 mM HEPES la pH 7,2,
17 10% glicerol, 0,1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 1% aprotinină, 1 mM, 5 μ g/ml leupeptină și 50 μ g/ml
DNază I. Suspendarea a fost urmată de congelare, decongelare de trei ori, utilizând nitrogen
19 lichid și apă caldă. Celulele lizate sunt apoi centrifugate la 10000 rot/min, timp de 30 min
și resuspendate în 20 mM HEPES, la pH 7,5, 0,1 M NaCl. Suspensia este sonicată,
21 adăugând apoi Triton X100, la o concentrație finală de 2%. Această suspensie este apoi
centrifugată timp de 15 min la o viteză de 18000 rot/min. După mai mult de două astfel de
23 cicluri, sunt efectuate trei cicluri de spălare cu Triton liber. În final, peletele se dizolvă în 6 M
GdHCl (guanidină clorhidrică), 20 mM HEPES la pH 7,5 prin sonicare, urmată de
25 centrifugare. Supernatantul este utilizat pentru o altă purificare. Proteina ob este purificată
în stare nemultiplicată, prin cromatografie de afinitate ionică, cu metale imobilizate (IMG).
27 Soluția este aplicată la o coloană de 40 ml, de la Pharmacia, de sefaroză cu debit fix de
chelare, încărcată cu 5 volume de 50 mM NiO₄ și care se echilibrează în 6 M Cd HCl, 20 mM
29 HEPES, la pH 7,5. Coloana este spălată apoi cu 6 M Gd HCl, 30 mM imidazol, 20 mM
HEPES la pH 7,5. În final, proteina este eluată cu același tampon conținând 0,2 M imidazol.
31 Proteina nemultiplicată se aduce în 6M GdHCl și se păstrează la 4°C, după adăugare de
acetat de sodiu (NaAc) până la 10 mM și pH-ul este ajustat la aproximativ 4,5, cu acid acetic.

33 *Remultiplicarea și purificarea proteinei*

O soluție de 6 M GdHCl conținând 100 mg de proteină, este tratată cu 67 μ l de 1 M
35 ditiotritol (DTT) și se diluează la aproximativ 67 ml cu 6 M GdHCl, 10 mM NaAc, la pH 4,5.
Amestecul se lasă sub agitare la temperatura camerei, timp de aproximativ o oră. Se
37 diluează apoi cu 4 l de glicerol 20%, cu 2,5 mM CaCl₂ și 20 mM Tris, la pH 8,4 cu amestec
tampon, sub agitare. După omogenizare, soluția rămâne la temperatura camerei, timp de
39 aproximativ 8 h cu agitare continuă. Se adaugă apoi 2000 unități de trombină de bovine puri-
ficată (din trombostat, produs Parke-Davis) și amestecul rămâne în continuare sub agitare
41 lentă. După 2,5 h, amestecul este redoat cu 2000 unități de trombină și clivajul histidinei-tag
este continuat încă 3 h. Clivajul trombinei este oprit prin adăugarea PMSF, la o concentrație
43 finală de 0,1 mM. Soluția este filtrată și păstrată la temperatura de 4°C. Proteina cleavată este
apoi purificată pe aceeași coloană IMAC ca mai sus, echilibrată în 1 M KCl, 20 glicerol, 20
45 mM HEPES, la pH 8,4 cu amestec tampon. După încărcarea soluției de proteine, aceasta
se spală cu același amestec tampon și proteina clivată este eluată cu 1 M KCl, 20% glicerol,
47 40 mM imidazol, 20 mM HEPES, la pH 8,4. Proteina neclivată este eluată la 0,2 M imidazol.

Proteina clevată, purificată, este concentrată, tratată cu 50 -100 mM EDTA, 10 mM
fericianură de potasiu (pentru completarea oricărei oxidări incomplete) și se filtrează prin gel,
pe o coloană superdex 75 16/60. Utilizând acest procedeu, se obține un procent apropiat de
50% proteină inițială. Odată ce este purificată, proteina exprimată este caracterizată prin
diferite metode. Caracterizarea fizică include metoda de dispersare ușoară, dinamică, pentru
determinarea omogeneității structurii și se utilizează ca măsură a propriei multiplicări. Datele
obținute prin dispersarea ușoară, arată că polipeptida *ob* umană este exprimată predominant
sau exclusiv ca monomer, în timp ce polipeptida *ob* murină găsită va fi găsită ca dimer, cât
și ca monomer. Analizele cu reactivul Ellman și analiza spectroscopică de masă, confirmă
că reziduurile de cisteină formează o legătură bisulfurică la proteină. Această formă oxidată
a polipeptidei este administrată la șoareci, așa cum este descris aici, fiind demonstrată activi-
tatea biologică. Dicroismul circular este utilizat pentru determinarea brută a geometriei struc-
turale a proteinei. Spectrele CD în tamponul fiziologic (pH de aproximativ 8, aproximativ forța
ionică fiziologică) arată că polipeptida *ob* umană are aproximativ 60% structură alfa-helix și
aproximativ 40% structură arbitrară, inelară. Polipeptida *ob* murinică a fost găsită că are
aproximativ 50% structură alfa-helix și 50% structură arbitrară, inelară, prin spectroscopie
CD. Proteoliza limitată, urmată de spectrometrie de masă (Cohen și colab.1995, așa cum
s-a prezentat mai sus), a fost utilizată pentru identificarea porțiunilor de polipeptidă *ob*, care
sunt accesibile proteolizei. Analiza a demonstrat prezența unei structuri spirale flexibile a
reziduurilor de aminoacizi 54 până la 60 (așa cum se arată în fig. 4). Asemănător, această
spirală se conectează la două domenii cu structură definită 2°C, de exemplu alfa-helix.
Important este, așa cum s-a arătat în exemple, că bioactivitatea proteinei purificate a fost
analizată prin administrarea proteinei la rozătoarele slabe, cât și la cele obeze, cu o pompă
osmotică (de exemplu, o pompă osmotică ALZET, de la Alza Corporation, Palo Alto, CA) sau
prin doza bolus zilnică administrată intraperitoneal, o perioadă de cel puțin peste două săptămă-
ni, fiind observate efectele privind comportamentul privind hrana și greutatea corporală.

Exemplul 6. Efectele de reducere a greutății de polipeptida *ob*(Leptină)

Produsul genetic al polipeptidei *ob* la șoarece, joacă un rol important în reglarea greu-
tății corporale. Prin acest exemplu se stabilește că proteina *ob* circulă în plasma de șoarece,
șobolan și în plasma umană. Forma de circulație la cele trei specii are o greutate moleculară
identică, prin SDS-PAGE, la secvența polipeptidei deduse, fără secvența semnal, sugerând
că, *in vivo* proteina nu este prelucrată după clivajul secvenței semnal. Proteina *ob* este
absentă în plasma de șoarece C57/B16J *ob/ob* și prezintă concentrații mai ridicate de 10 ori
în plasma de șoarece db/db și nivele de douăzeci de ori mai ridicate în plasma de șobolani
fa/fa, raportat la martori. Se sugerează că aceste animale obeze, mutante, sunt rezistente
la efectele *ob*. S-au observat diferențe de șapte ori în nivelele de plasmă ale proteinei *ob* într-
o grupă de șase subiecți umani, slabi. Injecțiile zilnice ale proteinei *ob* recombinante la șoa-
reci, reduc dramatic masa corporală la șoarecele *ob/ob* și au efecte semnificative asupra
greutății corporale la șoarecele de tip sălbatic, dar nu au nici un efect asupra șoarecelui
db/db. Aceste date sugerează că produsul genetic în poziția polipeptidei *ob* servește ca o
funcție endocrină în ceea ce privește reglarea greutății corporale.

Materiale și Metode

Iepurii au fost imunizați cu proteina recombinantă, în adjuvantul Freund (HEP, Inc.).
Anticorpii *ob* anti-șoarece imunopurificați, sunt preparați prin trecerea antiserului peste
coloana sefaroză 413, conjugat cu proteina recombinantă, așa, cum este descris de (Warlow
și colab., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Gold
Spring Harbor, NY (1988)). Imunoprecipitarea plasmei de șoarece a fost efectuată după cum
urmează: 0,5 ml de plasmă de la șoarece, șobolan și om, conținând aproximativ 2,5 mM

RO 121036 B1

EDTA, se aduc pentru pre-clarificare cu Sepharoză-4B neconjugată, la temperatura camerei, prin basculare timp de 2 h. Sepharoza este îndepărtată printr-un sistem de rotire și apoi se adaugă 50 ml de suspensie 50% de anticorp conjugat cu sefaroză, conținând anticorpul purificat prin afinitate, la o concentrație de 1 mg/ml de Sepharoză utilizată. O jumătate de mililitru de 2 x RIPA tampon se adaugă pentru a se obține condițiile legăturii finale, după cum urmează: 50 mM Tris-HCl, la pH 7,5, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% dezoxicolat de sodiu și 0,025% azidă de sodiu. Reacția este efectuată până a doua zi la temperatura de 4°C, cu basculare. Sepharoza conjugată cu anticorpul, se spală de 8 ori, utilizând un tampon RIPA, urmată de spălarea de trei ori cu PBS și apoi cu SDS-PAGE 15%. Proteinele sunt transferate pe nitroceluloză și analizate prin absorbția Western, cu un anticorp imunopurificat biotinitat, față de proteina recombinată. Anticorpul secundar este utilizat pentru detectare, HRP-streptavidin și ECL. Pentru determinarea cantitativă a polipeptidei *ob* în serul de șoarece, cantitățile crescute de proteină *ob* recombinantă multiplicată, de șoarece (0,01 ng, 0,1 ng, 0,5 ng, 2,0 ng și 15,0 ng) se adaugă la 100 λ de plasmă *ob/ob* G57BL/6J și se incubează la 4°C timp de 3 h cu Sepharoză proteină A, conjugată cu anticorpul. După o spălare extensivă cu tamponul A (10 mM fosfat tampon de sodiu la pH 7,4; 100 mM NaCl; 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF), probele sunt resuspendate în tamponul simplu, se încarcă pe 15% SDS-PAGE și se retransferă pe membrana de nitroceluloză. Analiza de absorbție Western este realizată utilizând un anticorp anti-amino-terminal biotinitat imunopurificat, ca anticorp primar și HRP-streptavidina, ca anticorp secundar, urmând detectarea prin EGL. Extractele citoplasmice sunt preparate prin omogenizarea țesutului adipos în tampon NDS (10 mM Tris la pH 7,5, 10 mM NaCl, 60 mM ICCI, 0,15 mM. spermină, 0,5 mM spermidină, 14 mM *beta*-mercaptoetanol, 0,5% NP-40), EGTA, 2 mM EDTA, 0,5% NP-40), prin omogenizare de polytron și omogenizarea dounce și apoi se separă nucleeele prin efectuarea centrifugării până la 700 grame. Imunoprecipitățile sunt realizate așa cum s-a descris mai sus, exceptând faptul că se utilizează anticorpii *ob* anti-umani imunopurificați. Pentru ELISA, 100 ml de soluție 1 mg/ml de anticorp *ob* anti-uman imunopurificat, se dizolvă într-o soluție de PBS tamponat cu borax și se ține peste noapte pentru microtitrare (Corning cat. # 2595) pe plăci la temperatura de 4°C. Plăcile se spală apoi de 4 ori cu o soluție salină de borat, conținând 0,05% Tween 20 și lichidul în exces este îndepărtat. Plăcile sunt blocate prin incubare la temperatura camerei, timp de 2 h cu 240 ml per cavitate, de soluție salină de borax conținând 0,3% gelatină și apoi se spală și se usucă. Atât cantități cunoscute de probe de proteină *ob* umană multiplicată sau probe de plasmă, într-un volum de 100 ml, sunt incubate în cavități individuale, până a doua zi, la temperatura de 4°C. După spălare, plăcile sunt incubate cu 100 ml de anticorp anti-uman imunopurificat, biotinitat (0,1 mg/ml în soluția de gelatină tamponată cu borax), timp de 4 h, la temperatura camerei. După spălare, se adaugă pe plăci (HRP)-Streptavidina peroxidaza din hrean (0,1 mg/ml soluția tamponată cu borax, 0,3% gelatină). Soluția substratului HRP (ABTS, 0,3 mg/ml și H₂O₂, 0,00% acid citric) este apoi utilizată pentru detectarea și măsurarea OD, la 414 mN, pentru determinarea cantitativă a legăturii la anticorp. Secvențele codificate ale geneo *ob* umane și de șoarece, sunt amplificate PCR din plasmidele care conțin secvențele ADNc *ob* și sunt subclonizate în plasmidul pPIC.9 (Invitrogen). Primerul 5' uman, utilizat a fost:

5' GTATCTCTCGAGAAAAGAGTGCCCATCCAAAAGTCCAAG 3' (SECV. ID Nr.34) și primerul 3' utilizat, a fost:

5' GCGCGAATTCTCAGCACCCAGGGCTGAGGTC 3' (SECV. ID Nr. 35).

Pentru șoarece, primerul utilizat a fost:

5'CTATCTCTCGAGAAAAGAGTGCCTATCCAGAAAGTCCAGG 3' (SECV. ID Nr.36)

RO 121036 B1

și primerul 3' a fost: 1
5'GCGCGAATTCTCAGCATTCAGGGCTAACATC 3' (SECV. ID Nr.37). Primerul 5' atât pen- 3
tru șoarece, cât și cel uman, conține porțiunea XhoI la terminația 5' și secvențele de codifi- 3
care pentru ultimii 4 aminoacizi ai secvenței semnal, factorului de conjugare *alfa*, prezentă 5
în vectorul pPIC.9. Acest vector dirijează secretarea genelor exprimate heterolog, din celu- 5
lele mediului de cultură. Primerul 5' PCR, include așadar primele 19 nucleotide ale genei *ob* 7
în cadru de citire deschis, după porțiunea de clivaj a secvenței semnal, înainte de alanină, 7
la aminoacidul din poziția 21. Primerul 3' conține porțiunea EcoRI la capătul 5', care este 9
urmat imediat de secvențele complementare codonului stop *ob* putativ. Condițiile PCR sunt 9
următoarele: denaturarea timp de 1 min la 94°C, susținerea timp de 1 min la 55°C și extensia 11
timp de 2,5 min la 72°C. Ciclul inferior PCR (15 cicluri) și PFU polimeraza de control al citirii 11
(Stratagena) se utilizează pentru a limita numărul de mutații generate de PCR. Produsele 13
PCR au fost digerate cu XhoI și EcoRI și clonizate într-un vector de digestie similar, pPIC.9. 13
Toate elementele de construcție au fost secvențate la ambele filamente, pentru a asigura 15
absența oricăror mutații generate de PCR. Clonele sunt transformate în *Pichia pastoris* (His'), 15
prin metoda sferoplast și selectate pe un mediu deficitar în histidină. Aproximativ 200 șoareci 17
și clone umane, au fost supuse unui screening pentru integrarea unui număr mare de copii, 17
prin analiza de hibridizare a coloniei. Clonele, în număr mare de copii, sunt apoi analizate 19
pentru exprimarea *ob*, inițial prin colorare Coomassie, arătând prezența unei noi proteine 16 19
kD, prezentă în mediul de cultură al drojdiei transformate. Banda 16kD a fost confirmată a 21
fi *ob*, utilizând anticorpii dezvoltati față de proteina *ob* bacteriană, exprimată. Proteinele 21
recombinante sunt purificate prin metoda de purificare în două faze, descrisă în continuare. 23
Spectrometria de masă și tratamentul cu bromură de cianogen, se realizează așa cum este 23
descriș de (Beavis și colab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6875-6877 (1990)). Întreaga 25
secvență codificată *ob* din genele *ob* umane și de șoarece, cu C-terminal la secvența 25
semnal, este subclonată în vectorul de exprimare pET15b (Nova-gen) și exprimată superior 27
în *Escherichia coli* (BL21(DE3) pLYsS), utilizând sistemul polimerazei T7 ARN (Studuer și 27
colab. *Meth. Enzymology*, 185 80-89(1990)). Celulele dezvoltate la temperatura de 30°C, la 29
o absorbantă de 0,7 la 595 nM și induse cu 0,5 mM izopropil-beta-D-tiogalacto-piranozidă, 29
până a doua zi, sunt colectate prin centrifugare la viteză scăzută. Liza este realizată prin trei 31
cicluri de congelare-decongelare și digestia de ADN este realizată cu Dnaza I. Extracția 31
membranei a fost realizată prin sonicarea și solubilizarea detergentului și peletele corpului 33
de incluziune final, sunt dizolvate în 6 M guanidină-HCl, 20 mM HEPES, pH 8,4. Proteinele 33
recombinante *ob* sunt purificate în condiții denaturate, prin IMAC, utilizând o coloană de 35
afinitate a ionilor de Ni și prin spălări cu cantități crescute de imidazol. Proteina *ob* 35
denaturată, purificată, a fost apoi depozitată în 6 M guanidină clorhidrică, 10 mM acetat de 37
sodiu (NaAc), la pH 5 și redusă prin utilizare de 1 mM DTT, la temperatura camerei timp de 37
o oră. Denaturarea este realizată, prin diluarea proteinei reduse în 20% glicerol, 5 mM CaCl₂, 39
5 mM NaAc la pH 5, prin omogenizare și incubare la temperatura camerei timp de 8-12 ore. 39
După denaturare, pH-ul este ajustat la 8,4 prin adădire de Tris, la 10 mM și hexa-histidina-tag 41
este îndepărtată prin clivajul trombinei. Proteina clivată, renaturată, este repurificată prin 41
IMG, pentru separarea produsului din trombină și proteina de fuziune, neclivată. Proteina 43
renaturată, clivată, este eluată de pe coloana de afinitate ionică, Ni la 40 mM imidazol, în 43
care trombina nu este reținută și proteina de fuziune neclivată este eluată la 0,2 mM imida- 45
zol. Produsul este apoi concentrat, tratat cu 100 mM EDTA și 10 mM fericianură de potasiu 45
și apoi este purificat prin gel filtrare, utilizând coloana superdex 75 16/60 de la Pharmacia. 47
Analiza Ellman este efectuată așa cum este descriș de Ellman, *Arch. Biochem.* 47
Biophys, 82: 70-77 (1959). Reactivul Ellman este preparat prin dizolvarea a 39,6 mg de 5,5'- 49
ditiobis (acid 2-nitro-benzoic) (DTNB) în 10 ml de 0,05 M fosfat, la pH 8. O curbă de calibrare

RO 121036 B1

a fost construită în ordinul de concentrație 10-120 mM sulfhidril liber (utilizând 1 mM soluție stoc de DTT redus) la 412 nm. Fiecare analiză a fost realizată, utilizând reactivul Ellman 0,02 ml și având un amestec de reacție total de 0,5 ml. Coeficientul de extincție măsurat, a fost de $12974 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pentru o grupare de sulfhidril liberă (coeficientul de corelare fiind de 0,99987), care este de 5% din valoarea reportată mai înainte, de $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se supun apoi analizei Ellman, cincizeci de ml din proteina gel filtrată, pură 2 mg/ml, corespunzător la o concentrație posibilă de sulfhidril liber, de aproximativ 24 mM în amestecul de reacție final. Soluția rezultată are o valoare pentru A_{412} de aproximativ 0,02, sugerând că cele două reziduuri de cisteină din proteină, sunt în stare oxidată formând cisteina și că grupările sulfhidrilice libere sunt complet introduse în nucleul inaccesibil al proteinei multiplicate. Rezultate identice au fost obținute prin efectuarea aceleași analize pe o proteină nemultiplicată, în prezență de 6 M guanidină clorhidrică. Șoarecii sunt aduși în cuști individuale în atmosferă liberă de patogeni și aclimatizați la o dietă conținând 35% (greutate/greutate). Dieta de laborator pentru rozătoare, 5001 (PMP Feeds, Inc.), 5,9% (greutate/greutate) amestec de pudring tapiocă (General Foods) și 59,1% apă, care are un conținut de energie de 1,30 kcal/gm. Dieta este sterilizată la autoclav și împachetată în discuri de material plastic de 60 mm, care sunt fixate la partea superioară a discurilor Petri de 100 mm. Tapioca este o dietă care se dă într-un material textil, ca o pastă, făcând-o astfel dificilă pentru animalul care împrăștie hrana în cușcă. Cu ajutorul capacelor de 100 mm, se recuperează micile cantități de hrană, împrăștiate de animal. Un disc proaspăt de hrană este adus în cușcă în fiecare dimineață și în ziua precedentă, discul este recuperat și cântărit. Diferența de greutate prevede o măsură a consumului de hrană, zilnic. Efectele proteinei recombinante asupra consumului de hrană și greutatei corporale, sunt măsurate la trei specii de șoareci: C57 B1/ 6j *ob/ob*, C57 B1/ Ks *db/db* și CBA/J+/+, care provin de la Laboratorul Jackson. Un număr de 30 de șoareci din fiecare specie se împarte în grupe de câte 10. O grupă din fiecare specie, primește zilnic injecții intraperitoneale (i.p.) cu proteina *ob* bacteriană multiplicată, la o doză de 5 mg/g zi, în 300 μl de PBS. O a doua grupă primește injecții intraperitoneale (i.p.) cu același volum de PBS. Acești șoareci martor, primesc injecții cu PBS dializat conținând proteina recombinantă. PBS se clarifică de endotoxină, utilizând o coloană ETOX Acticlean. Un al treilea grup de animale nu primește injecții. Consumul de hrană este înregistrat zilnic și măsurătorile greutatei corporale sunt înregistrate periodic, la intervale de peste 3,5 săptămâni. Pentru experimentul hranei la perechi de animale, consumul de hrană a fost estimat la o grupă separată de șoareci *ob* zilnic față de consumul la șoarecii *ob* care au primit proteină.

Rezultate

Proteina *ob* care circulă în plasma de șoarece, șobolan și în plasma umană. Proteina *ob* recombinantă de șoarece și umană se prepară utilizând pET 15 b vector de exprimare bacteriană (Novagen) și prin clonarea în *Pichia pastoris* a sistemului de exprimare la drojdii care secretă proteinele recombinante, direct în mediul de cultură. Proteina *ob* exprimat în drojdie, include 146 aminoacizi carboxi-terminali la secvența semnal. Iepurii sunt imunizați cu proteine bacteriene (HRP, Inc). Anticorpii sunt imunopurificați (*Research Genetics*) și utilizați pentru imunoprecipitări și analizele de absorbție Western pentru proteina din plasmă și țesutul adipos. Proteina *ob* din plasma de șoarece, migrează cu o greutate moleculară aparentă de 16 kD, prin SDS-PAGE. Mobilitatea electroforetică este identică cu cea a proteinei *ob* recombinante, secretată de drojdie, după îndepărtarea secvenței semnal (fig. 24 A). Proteina *ob* n-a fost detectată în plasma de șoarece C57 BL/6J *ob/ob*, care are o mutație nonsens la codonul 105. Prin diferitele feluri de antiser, se poate identifica catena polipeptidică cu reziduu 105 redus, prevăzut prin secvența ADNc. O creștere de zece ori a nivelului de circulație a proteinei, a fost observată la șoarecele *db/db* față de animalul martor

RO 121036 B1

(fig. 24 A). Imunoprecipitarea plasmei din tipul sălbatic și fa/fa de șobolan determină o creștere de 20 de ori a nivelului proteinei *ob* la șobolanul mutant, comparativ cu cel de tip sălbatic (fig. 24 B). Rezultatele mutației *db* la fenotipul obez, sunt identice cu cele observate la șoarecele *ob* (Bahary și colab., 1990, așa cum s-a prezenta mai sus), șobolanii grași fiind obezi ca rezultat al mutației recesive în gena omoloagă *db* (Truett și colab., 1991, așa cum s-a prezenta mai sus). În vederea determinării cantitative a nivelului de *ob* în plasma de șoarece, cantitățile crescute de proteină recombinantă sunt adăugate la ser și imunoprecipitate (fig. 24C). O creștere lineară a intensității semnalului observată prin absorbție Western, înseamnă cantități crescute de proteină recombinantă. Compararea intensității semnalului proteinei native în plasma de șoarece cu cea standard, înseamnă că nivelul de circulație al proteinei *ob* la șoarecele de tip sălbatic, este de aproximativ 20 ng/ml. Aceste date demonstrează că imunoprecipitarile și analizele de absorbție Western au fost efectuate în condiții de exces de anticorpi, nivelele crescute de proteină *ob* au fost așadar văzute în extractele proteice din țesutul adipos la șoarecele *db/db*, reportate la martor (fig. 24 D). Așa cum era de așteptat pentru o proteină secretată, proteina din țesutul adipos a fost fracționată cu fracțiunea de membrană (datele nu sunt prezentate). Probele de plasmă de la șase subiecți umani, slabi, având indicii de Masă Corporală mai mic decât 25 ($BMI = \text{greutate}/\text{lungime}^2$), au fost imunoprecipitate utilizând anticorpii imunopurificați la proteina umană. Materialul imunoprecipitat a migrat cu o mobilitate identică electroforetică cu cea văzută pentru 146 de aminoacizi ai proteinei umane exprimată în drojdie. Intensitatea semnalelor variază semnificativ între cele șase probe (fig. 25 A). Prin densitometrie autoradiografică se constată o diferență de aproximativ cinci ori în nivelele individuale HP1 și HP6, cu nivele intermediare la alți subiecți. O imunoanaliză pe bază enzimatică (ELISA) a fost dezvoltată utilizând anticorpurile imunopurificate și proteina bacteriană multiplicată ca standard (vezi în continuare). Curba standard rezultată este arătată în fig. 25 B. Utilizând această analiză, nivelele de plasmă ale proteinei *ob* la șase probe de plasmă umană, variază între 2 și 15 ng/ml (fig. 25 C). Nivelul de proteină *ob* din plasma de la HP6 a fost în afara gradului linear al imunoanalizei și ≥ 15 ng/ml. Aceste diferențe cantitative au fost corelate cu cele rezultate din analiza de absorbție Western.

Datele preliminare sugerează că leptina poate circula, cel puțin parțial, complexată cu o altă proteină sau alte proteine. Această concluzie este bazată pe heterogenitatea formei curbei de titrare pentru ser comparativ cu standardul recombinant. Analiza unei cantități mari de leptină imunopurificată pe coloană, anti *ob* la iepure, prin gel filtrare, HPLC în condiții de denaturare sau nedenaturare, cu monitorizare pe ELISA și SDS -PAGE, sugerează că polipeptida *ob* s-a comportat în mod asemănător cu complexul cu greutate moleculară superioară. Cu toate acestea, aceste date rămân preliminare; proteina de legătură *ob* rămâne a fi, încă, caracterizată.

Trăsăturile structurale ale proteinei ob

Deoarece proteina *ob* are două reziduuri de cisteină, aceasta ar putea forma legături intramoleculare sau intermoleculare cu bisulfura, în condiții de oxidare *-in vivo-*. Analiza de absorbție Western se repetă cu sau fără adăugare de agenți reducători, la tamponul simplu. În ambele condiții, proteina *ob* din serul uman, migrează ca monomer (datele nu sunt arătate). În condiții nereducătoare, proteina imunoprecipitată din serul de șoarece *db*, a fost detectată la pozițiile consistente cu cele ale ambilor monomeri 16 kD și dimeri de aproximativ 32 kD (fig. 26 A). Jumătatea de greutate moleculară ridicată care dispare în condițiile de reducere, sugerează că o fracțiune din *ob* la șoarece circulă ca o specie de greutate moleculară mult superioară, cu formarea unei legături de bisulfură, intermoleculară. Aproximativ 80% din *ob* de șoarece circulă ca proteină 16 kD și aproximativ 20% ca 32 kD formă de proteină. Aceleași forme moleculare s-au văzut când proteinele de șoarece și proteinele umane sunt

exprimate în *Pichia pastoris* (Abrams și colab. *Immunol. Rev.* 5-24 (1992)). În aceste studii, secvența ADN corespunzătoare la cei 146 de aminoacizi ai proteinei *ob* mature, a fost clonată la partea inferioară a secvenței semnal cu factor alfa de conjugare, în vectorul pPIC.9 (Invitrogen). Proteina *ob* a fost purificată din mediul de drojdie al speciilor care exprimă proteinele de șoarece și proteinele umane și se supune electroforezei în condiții reducătoare și în condiții nereducătoare (fig. 26 A). Proteina de șoarece a fost exprimată în principal în drojdie ca dimer în condiții nereducătoare și numai ca monomer în prezență de agenți reducători. Proteina umană recombinantă migrează la poziția monomerului, în ambele condiții (datele nu sunt prezentate). Proteina umană purificată, exprimată în *Pichia*, are o masă moleculară de $16,024 \pm 3$ Da, așa cum s-a determinat prin spectrometrie de masă (1990, Beavis, așa cum s-a prezentat mai sus). Această valoare este în consens cu masa calculată din secvența de aminoacizi ai proteinei conținând o singură punte de bisulfură, intramoleculară (16,024 Da). Analiza spectrometrică de masă, cu desorbție laser pe matriță, pentru produsele de clivaj ale proteinei, în mediu de bromură de cianogen, arată că cisteinele 117 și 167 sunt legate printr-o legătură de bisulfură, intramoleculară (fig. 26 B). Bromura de cianogen determină clivajul grupării carboxi terminal, la reziduurile de metionină.

Prepararea și caracterizarea proteinei recombinante bioactive

Proteina *ob* de șoarece s-a exprimat în *Escherichia coli*, din plasmida pET 15 b, ca o proteină de fuziune insolubilă, cu reziduul 20 hexa-histidina-tag H-terminal, conținând o porțiune de clivaj a trombinei. Corpurile bacteriene de incluziune, au fost solubilizate utilizând guanidină clorhidrică și au fost purificate în condiții de denaturare, utilizând cromatografia de afinitate ionică de metal imobilizat (IMAC) (fig. 27). Proteina de fuziune denaturată, purificată, a fost redusă, diluată și s-a permis astfel multiplicarea acesteia în soluție apoasă la temperatura camerei. După clivajul trombinei, proteina *ob* renaturată de șoarece conținând reziduuri cu N-terminal adiționale în număr de patru (Gly-Ser-His-Met; SEcv. ID Nr.58) a fost repurificată prin IMAC, la un grad de omogenitate >98%, așa cum s-a arătat prin spectrometrie de masă și prin sistemul SDS-PAGE. Spectrometria de masă, prin desorbția laser pe matriță, duce la o măsură a masei de $16,414 \pm 3$ Da (masa prevăzută = 16,415 Da). Ambele metode SDS-PAGE pe gel, de reducere și nereducere demonstrează o singură specie moleculară, cu greutate aparentă și moleculară de 16 kD (datele nu sunt prezentate). Dispersarea ușoară, dinamică utilizând Detectorul de Dimensionare moleculară DP 801 (Protein Solutions, Inc.) demonstrează că proteina *ob* renaturată de șoarece este mai mult monomerică cu câteva componente de ordin superior. Proteina este tratată cu EDTA și oxidată chimic. Speciile cu greutate moleculară ridicată sunt apoi separate prin gel filtrare. Prin dispersarea ușoară, dinamică, se confirmă apoi că proteina *ob* recombinantă, renaturată la șoarece este monodispersată. Urmărind dializa față de tamponul fosfat salin (PBS), endotoxina bacteriană este separată utilizând o coloană STOX Acticlean (Sterogene Bioseparations, Inc.). Randalmentul final de proteină a fost de 45 mg/l.

Analiza Ellman a fost efectuată pe proteina *ob* recombinantă, renaturată de șoarece, pentru a evalua stadiul de oxidare (Ellman, 1959, supra). Ambele proteine, cea renaturată și proteina prelucrată cu 6M guanidină clorhidrică, au prezentat un conținut de sulfhidril liber <0,5%, demonstrând astfel că produsul monomeric conține o legătură intramoleculară de bisulfură. Aceasta se confirmă prin spectrometrie de masă a produselor de clivaj în bromură de cianogen, pentru proteina bacteriană multiplicată (datele nu sunt prezentate).

Bioactivitatea proteinei *ob*

Proteina *ob* recombinantă, renaturată, purificată, de șoarece, s-a administrat sub formă de injecții zilnice intraperitoneale, cu 5 mg/kg/zi, la grupele de 10 C57B1/6J *ob/ob* (vârsta de 16 săptămâni), C57B1/Ks db/db (vârsta 12 săptămâni) și grupa de șoareci CBA/J

RO 121036 B1

+/- (vârsta de 8 săptămîni). Un număr egal de animale a primit PBS ca injecție zilnică. PBS 1
 utilizat pentru injecțiile de control, este derivat din dializatul obținut după echilibrarea protei- 3
 nei. Animalele adiționale din cele trei specii de șoareci n-au primit injecții. Hrana consumată 5
 de animalele individuale, a fost monitorizată zilnic și greutatea animalelor a fost înregistrată 7
 la intervale de trei sau patru zile. Rezultatele cumulative pentru consumul de hrană și pentru 9
 greutatea corporală, din fiecare din cele 9 grupe de șoareci, sunt prezentate în fig. 28 A până 11
 la F și semnificația statistică a datelor, este prezentată în tabelul 1. Consumul de hrană la 13
 șoarecii C57B16J *ob/ob* injectați cu proteină, a fost semnificativ scăzut după prima injectare 15
 și a continuat să scadă până în cea de-a 5-a zi, când acesta este stabilizat la un nivel egal 17
 cu aproximativ 40% din consumul animalelor care au primit injecții cu PBS ($p < 0,001$). Injecția 19
 falsă de *ob* la șoarece nu duce la pierderea greutății pe perioada de studiu de trei săptămîni. 21
 Șoarecii C57B16J *ob/ob* care au primit proteină, au pierdut aproximativ 10% din greutatea 23
 corporală, după 5 zile ($p < 0,001$). Aceste animale au continuat să piardă în greutate în 25
 perioada de tratament de peste trei săptămîni, iar la acest punct, greutatea animalelor *ob* 27
 care au primit proteina, a scăzut la o medie de 60% din greutatea inițială ($p < 0,0001$). O 29
 grupă separată de șoareci *ob* a fost hrănită, ca perechi, paralel cu șoarecii *ob* care au primit 31
 proteină. Datele din fig. 29B arată că această grupă de perechi, are o pierdere semnificativ 33
 mai mică în greutate, față de animalele care au primit proteina recombinantă ($p < 0,02$). O 35
 fotografie a doi șoareci care au primit injecții fie cu proteină, fie cu purtător, arată o mare dife- 37
 rență în apariție, care rezultă din tratamentul cu proteine (fig. 29 B). În vederea stabilirii în 39
 continuare a efectelor proteinei, s-au realizat autopsiile a doi șoareci din fiecare grupă. Ins- 41
 pecția globală a șoarecilor *ob* care au primit proteină arată o scădere dramatică a grăsimii 43
 corporale, ca și dimensiunile ficatului. Greutatea ficatului la șoarecele *db* și de tip sălbatic 45
 este neschimbată la tratament. Ficatul șoarecilor *ob* care au primit injecții cu PBS, au cântărit 5,04 și 5,02 g față de 2,23 și 2,03 g la animalele care au primit proteina recombinantă. În contrast cu caracteristica ficatului gras, pal, ficatul la șoarecele *ob* care a primit proteină dobândește caracteristica culorii închise de ficat normal (fig. 29 C). Secțiunile histologice ale ficatului arată că, animalele netratate au ficatul gras care a marcat o îmbunătățire la anima- lele tratate cu proteină (datele nu sunt prezentate). În contrast cu șoarecii *ob*, nu s-au găsit diferențe semnificative de greutate corporală sau consum de hrană la șoarecii (C57BL/Ks *db/db*, care primesc proteină, în raportul cu grupa martor care primește purtător (fig. 28A până la F, tabelul 1). Toate cele trei grupe de șoareci *db/db* au pierdut între 2 și 5 g în greutate, în perioada de tratament. Glucoza sanghină medie la șoarecii *db/db* a fost măsurată utilizând un glucometru și a fost de ≥ 500 mg/dl la toți șoarecii, indicând că aceste animale au dezvoltat diabetul secundar, până la obezitate. Injectarea șoarecilor *db* a fost terminată după două săptămîni.

La șoarecii de tip sălbatic, s-a observat o scădere ușoară, dar semnificativă a greu- tății corporale, după administrarea proteinei recombinante (fig. 28A-F, tabelul 1). După cinci zile de injectare a proteinei, șoarecii tratați au pierdut în medie 0,5 g în greutate, în timp ce șoarecii martori au câștigat 0,4 g ($p < 0,02$). La două intervale de timp următoare animalele care au primit proteină, au cântărit semnificativ mai puțin decât cele care au primit zilnic injecții cu PBS. O semnificativă schimbare de greutate la șoareci a fost observată la urmă- toarele perioade. La animalele care au pierdut în greutate, consumul de hrană n-a fost sem- nificativ diferit de cel al animalelor martor. Injecțiile cu PBS au avut un efect slab, dar semnifi- cativ asupra consumului de hrană și asupra greutății corporale la șoarecii *ob*, *db* și la tipul sălbatic, în comparație cu șoarecii care n-au primit injecții ($p < 0,05$).

Tabelul 1

Grupa de animale	Grupa de tratament	Zile	Modificarea greutatei			
			n	media eroare standard		p
ob/ob	proteină purtător	1-5	10 9	-6,38000000 -0,14444444	0,47628190 0,24444444	< 0,001
	proteină purtător	1-12	10 9	-14,45000000 -0,98888889	0,70793126 0,38058975	< 0,001
	proteină purtător	1-27	6 5	-24,28333333 -4,30000000	0,69924563 0,79874902	< 0,0001
db/db	proteină purtător	1-5	10 10	-1,47000000 -2,00000000	0,36939891 0,23142073	0,240
	proteină purtător	1-12	10 10	-3,75000000 -4,19000000	0,77348418 0,34655447	0,610
CBA/J	proteină purtător	1-5	10 10	-0,48000000 -0,38000000	0,17876117 0,21489015	0,006
	proteină purtător	1-12	10 10	-0,12000000 -1,29000000	0,45748103 0,24444444	0,015
	proteină purtător	1-27	5 6	-1,98000000 -2,23333333	0,48723711 0,20763215	< 0,651

Discuții

Funcția endocrină pentru produsul proteinei la poziția PB, a fost sugerată prima dată de Coleman, care a arătat că greutatea corporală la șoarecii *ob/ob* a fost redusă după unirea parabiotică la șoarecii normali sau șoarecii *db* (Coleman și colab., 1978, așa cum s.a prezentat mai sus). Rezultate indicate mai sus susțin această ipoteză, arătând că proteina *ob* circulează în circuitul sanghin și că injecțiile cu proteina recombinantă, reduc greutatea corporală. Greutatea moleculară a produsului genetic codificat prin gena *ob* este aproximativ 16 kD, care este egală cu secvența de 146 aminoacizi la secvența semnal de la capătul carboxi-terminal. Proteina *ob* recombinantă nu este modificată când este exprimată în *Pichia pastoris*. Exprimarea genelor de mamifere în *Pichia pastoris*, are în general ca rezultat, formarea unei structuri proteice corecte (Cregg și colab., *Bio/Technology*, 11: 905 -914(1993)). Acest fapt sugerează că, proteina *ob* nu este glicozilată și nu este prelucrată posttranslațional, *in vivo*. Aceste date nu exclud însă posibilitatea că proteina *ob* este legată noncovalent de ea însăși sau de alte proteine în plasmă sau țesutul adipos. Așadar, clivajul proteolitic al proteinei n-a fost exclus, formele de proteină *ob* cu greutate moleculară mică nefiind detectate prin orice antiser utilizat, incluzând patru anticorpi anti-peptide. Proteina *ob* are două reziduuri de cisteină și circulează ca monomer la om și ca monomer și dimer la șoareci. O legătură tipică de disulfură, intramoleculară a moleculelor secretate este găsită când proteina umană este exprimată în *Pichia pastoris*, sugerând că este asemănătoare cu cea prezentă *-in vivo-*. Acest fapt se sprijină pe bioactivitatea proteinei bacteriene recombinante, care are o legătură de disulfură intramoleculară. Proteina *ob* la șoarece poate fi găsită în plasmă, ca monomer sau ca dimer. Monomerul și dimerul sunt văzuți atunci când proteina *ob* la șoarece este exprimată în drojdie, arătând că predilecția proteinei de șoarece pentru a forma dimeri este

rezultatul diferențelor de secvențe primare, raportate la cele umane. În timp ce este clar că monomerul are bioactivitate, activitatea funcțională a dimerului este necunoscută. Efectul proteinei *ob* asupra consumului de hrană și greutatea corporală la șoarecii *ob* este dramatic. După trei săptămâni de tratament, șoarecele *ob* care primește zilnic injecții cu proteină recombinantă, are o pierdere de 40% din greutatea corporală și consumă cu 40% mai mult decât animalele martor. Mai mult decât atât, greutatea șoarecelui *ob* ratat nu este încă echilibrată la timpul la care experimentul este terminat. Rezultatele experimentului pe perechi arată că pierderea în greutate este rezultatul efectelor asupra consumului de hrană și a energiei cheltuite. Astfel, o grupă separată de șoareci *ob*, pentru care consumul caloric a fost restricționat la cel al șoarecelui care a primit proteina, are o pierdere semnificativă în greutate, în raport cu animalele care au primit proteină. Reducerea consumului de hrană la șoarecele *ob/ob* la un nivel mai scăzut decât la șoarecele de tip sălbatic, în ziua în care primește proteina *ob*, arată că acesta este în special sensibil la efectele acesteia. Într-adevăr, receptorul *ob* poate fi superior reglat la aceste animale. Consumul de hrană la șoarecii *ob* tratați, devine relativ constant, după cinci zile de tratament. Dacă acesta este rezultatul proteinei având nivelele ridicate, stabile, aceasta ar sugera că proteina are un timp de înjumătățire relativ lung (*The Pharmacological Basis of Therapeutics*, pp. 19-45. Goodman and Gilman, eds., Pergamon Press New York, (1990)). Această concluzie este consistentă cu datele din experimentele de parabioză (Codeman și colab. 1978, așa cum s-a prezatnat mai sus; Weigle, *Int. J. Obesity*, 12: 567-578 (1988)). Efectele proteinei recombinante asupra greutateii corporale la tipul sălbatic de șoarece au fost mici, dar semnificative statistic, în timpul primelor două săptămâni de studiu. Deoarece diferența de greutate între șoarecele de tip sălbatic care a primit proteină față de PBS a fost susținută pe perioadele din urmă, o semnificație statistică a acestor date este mult diminuată după trei săptămâni. Pierderea timpurie în greutate n-a putut fi luată în considerație prin diferența de consum de hrană. Probabil, măsurarea consumului de hrană n-a fost suficientă pentru a detecta o scădere care rezultă dintr-un gram diferență în greutatea corporală, în timpul tratamentului. Aceste observații diferă de rezultatele experimentelor precedente, în care rozătoarele de tipul sălbatic au fost legate prin uniunea parabiotică la șoarecele *db*, șobolanii *fa*, șobolanii cu leziuni hipotalamice și șobolanii obezi, printr-o dietă bogată în calorii (Coleman și colab. 1978, așa cum s-a prezatnat mai sus; Harris și colab. 1987, așa cum s-a prezentat mai sus; Harris și colab. "Physiological and metabolic changes in parabiotic partners of obese rats", in *Hormones, Thermogenesis and Obesity*, Lardy and Stratman, eds, Elsevier Science Publishing Co, New York (1989); Hervey, *J. Physiol.* 145: 336-352 (1959)). În fiecare caz, animalele de tipul sălbatic devin anoreice și pierd în greutate cantități însemnate. Când nivelele de proteină *ob* sunt crescute la șoarecele *db* și la șobolanii *fa*, precum și nivelele de *ob* ARN crescute la șoarecele cu leziuni hipotalamice, se pare că tipul de șoarece sălbatic poate răspunde la *ob* când aceasta circulă în plasmă la un nivel suficient de ridicat. Faptele reportate aici sunt consistente pentru ca posibilitatea ca nivelele de proteină administrate să fie sub nivelele endogene, ceea ce duce la echilibrarea greutateii corporale ușor scăzută. Prin determinarea cantitativă a nivelelor de proteină *ob* care circulă în plasma șoarecilor tratați va rezolva această problemă. Deoarece imunoanaliza proteinei la șoarece, nu este disponibilă prin imunoprecipitări, s-a sugerat că nivelele de circulație ale proteinei *ob* n-au fost substanțial ridicate la șoarecii de tip sălbatic care au primit proteină. Un efect mai slab al proteinei la șoarecele sălbatic și absența răspunsului la șoarecele *db*, fac ca acest tratament să aibă efecte nespecifice sau efecte adverse. Toți șoarecii *db* care pierd cantități mici în greutate în timpul perioadei de tratament, dacă primesc sau nu proteina *ob*. Animalele *db* sunt marcant hiperglicemice și pierderea în greutate în acest caz pare să fie rezultatul diabetului și nu al protocolului de experimentare. Șoarecele

db/db C57BL/Ks, dezvoltă adesea diabet și începe să piardă în greutate cantități mici, la vârsta la care animalul este utilizat în acest studiu (Coleman și colab. 1978, așa cum s-a prezentat mai sus). C57B1/6J db/db șoareci de aceeași vârstă, nu dezvoltă o hiperglicemie semnificativă. Aceste diferențe fenotipice se cred a fi rezultatul diferențelor genetice la aceste specii (C57B/6J vs. C57BL/Ks) care poartă mutații (Coleman și colab. 1978 așa cum s-a prezentat mai sus). Absența detectării celor 105 de amino acizi delețați ai proteinei, prezenți în secvența ADNc în genele *ob* la șoarecele *ob/ob* C57B1/ 6J, sugerează că proteina mutantă este fie degradată, fie netransferată. Cu toate acestea, posibilitatea ca antiserul utilizat să nu detecteze această proteină redusă, nu poate fi exclusă. Creșterea de zece ori observată pentru nivelele de proteină *ob* la șoarecele db, comparativ cu șoarecele de tip sălbatic, sugerează că proteina *ob* este supraprodusă când există o rezistență la efectele acesteia. Aceste date se corelează cu studiile ObmARN. Așa cum s-a menționat, experimentele precedente au arătat că mutațiile de șoarece db și genele de șobolan fa care sunt aplicate în regiunile cromozomale omologe, au ca rezultat supraproducția factorului plasmatic care susține greutatea corporală (Truett și colab., 1991; așa cum s-a prezentat mai sus; Coleman, 1978, așa cum s-a prezentat mai sus; Hervey, 1959, așa cum s-a prezentat mai sus). În ambele cazuri, s-a sugerat că animalele mutante sunt rezistente la efectele proteinei *ob*. Această posibilitate este confirmată prin observarea că proteina *ob* nu are niciun efect asupra greutatei corporale sau asupra consumului de hrană, când este administrat la șoarecele db. Obezitatea la oameni poate fi asociată cu nivelele crescute de proteină *ob* din plasmă, la indivizii care sunt insensibili la hormoni. Pe de altă parte, exprimarea redusă a *ob* ar putea așadar să conducă la obezitate în cazul în care pot fi găsite nivele "normale" (cu scădere necorespunzătoare) de proteină. Astfel, nivelele de proteină *ob* din plasma umană pot constitui un marker pentru diferitele forme de obezitate. Într-o grupă mică cu subiecți slabi cu valoarea BM1 < 25, se pot detecta prin analiza ELISA, nivele scăzute, de nanograme, ale proteinei *ob* de circulație. Semnificativ, concentrațiile variabile sunt notate ca sugerând că, nivelul de exprimare și/sau sensibilitate la proteină, poate juca un rol în determinarea greutatei corporale. Partea de acțiune a proteinei *ob* este necunoscută. Proteina afectează consumul de hrană și energie cheltuită, acest fapt fiind consistent cu studiile clinice care indică modificările ambelor sisteme care acționează pentru reglarea greutatei corporale (Leibel și colab. *N.Engl. J.Med.* 332: 621-628 (1995); Keesey și colab. "*Metabolic defense of the body weight set-point*", in Association for Research in Nervous and Mental Disease, pp.87-96, Stunkard and Stellar, eds. Raven Press, New York (1984)). Hipotalamusul este implicat, în mod similar, în partea inferioară a circuitului polipeptidei *ob*, în metoda de control al greutatei corporale, așadar are efecte directe asupra unei variații de organe, posibile.

Exemplul 9. *Exprimarea crescută în adipocitele ob ARN la șoarecii cu leziuni ale hipotalamusului și cu mutații specifice db*

Produsul genetic al genei (*ob*) obeze de șoarece, recent clonată, joacă un important rol în reglarea masei cu țesut adipos. ARN al *ob* se exprimă specific prin adipocitele de șoarece -*in vivo*-, în fiecare dintre depozitele celulare, cu celule grase diferite, incluzând grăsimea brună. Aceasta se exprimă, de asemenea, în celulele de cultură preadipocite 3T3-442A, care au fost induse pentru diferențiere. Șoarecii cu leziuni ale hipotalamusului, ca și șoarecii mutanți la poziția specifică db, exprimă un nivel ridicat de 20 de ori de ARN de *ob* în țesutul adipos. Aceste date sugerează că ambele gene db și hipotalamusul sunt la partea inferioară a circuitului genei *ob* în ceea ce privește reglarea masei de țesut adipos și sunt consistente cu experimentele precedente care sugerează că poziția specifică a db cuprinde receptorul *ob*. La șoarecii db/db și la cei cu leziuni, diferențiale cantitative în nivelul de exprimare al ARN de *ob* este corelat cu conținutul de lipide al adipocitelor. Moleculele care reglează

RO 121036 B1

nivelul de exprimare al genei <i>ob</i> în adipocite joacă, în mod asemănător, un rol important în determinarea greutateii corporale, ca și moleculele care mediază efectele <i>ob</i> la partea de acțiune a acesteia.	1
<i>Materiale și Metode. Hibridizarea in situ.</i>	3
Țesuturile cu grăsime albă din regiuni abdominale identice, de la șoarecii de tip sălbatic (wt) și de la șoarecii db au fost prelucrate simultan, conform metodei modificate, descrisă de Richardson și colab. <i>Growth. Development & Aging</i> , 56: 149-157 (1992). Pe scurt, țesuturile sunt fixate în soluție Bouin, timp de 2 h la temperatura de 4°C. Acestea sunt apoi deshidratate printr-un tratament în serie de creștere a concentrațiilor de etanol din 10% până la 100%, fiecare, timp de 5 min, la temperatura de 4°C. O incubare a acestor țesuturi cu xilen, timp de 1 h și cu parafină timp de 2 h, se realizează la temperatura de 65°C. Greutatea fiind inserată, țesuturile grase db/db sunt secționate și montate apoi în aceleași condiții. Secțiunile sunt uscate la temperatura de 65°C timp de 1 h și tratate cu xilen și diluții în serie cu etanol, de la 100% până la 50%, fiecare timp de 3 min, la temperatura camerei. O probă deARN antisens a genei <i>ob</i> este sintetizată prin transcrierea <i>-in vitro</i> - a genei <i>ob</i> linearizate, din secvența codificată la partea superioară a promotorului polimerazei Sp6 din ARN. Hibridizarea <i>-in situ</i> - s-a efectuat exact conform descrierii lui Schaeren - Wiemers și colab. <i>Histochemistry</i> , 100: 431-440 (1993).	5
<i>Prepararea de ARN și cultura celulară</i>	11
ARN-ul total și absorbția Northern s-au preparat așa cum s-a descris. Celulele vasculare stromale și adipocitele s-au preparat conform descrierii lui Rodbell și ARN din ambele fracțiuni s-a preparat conform lui Dani și colab. <i>Mol. Cell. Endocrinol.</i> 63:199 -298(1989); Rodbell, <i>J. Biol. Chem.</i> 239:375-380(19). După subclonare, celulele 3T3-F442 s-au dezvoltat în mediul Dulbecco-Eagle modificat, conținând 10% ser fetal de bovine (definit ca mediu standard) (Dani și colab. "Molecular biology techniques in the study of adipocyte differentiation", in Obesity in Europe vol. 88, pp.371-376, Bjorntorp and Rossner, Eds, John Libbey Company Ltd.London, England (1989)). La confluență, celulele au fost tratate în mediu standard suplimentat cu 2 nM triiodotironină (T3) și 17 nM insulină. După douăsprezece zile s-a preparat ARN ca mai sus.	13
<i>Tratamentul cu tioglucoza de aur (GTG).</i>	15
Șoarecii femele CBA/J în vârstă de 2 luni, sunt tratate cu o singură injecție intraperitoneală de aurotioglucoză (Catalogul Sigma Nr.A 0632) la o doză de 0,2 mg/g, în soluție salină normală. Animalele de control sunt injectate cu o soluție salină normală. Șoarecii se cântăresc, după o lună de la tratament. Țesutul adipos ARN este izolat de la animalele tratate, a căror greutate a crescut cu mai mult de douăzeci de g după tratamentul cu GTG.	17
<i>Rezultate</i>	19
Gena <i>ob</i> a fost găsită recent ca fiind exprimată în țesutul adipos (Zhang și colab., <i>Nature</i> , 372 : 425-432 (1994)). Deoarece țesutul adipos este compus din multe tipuri de celule incluzând adipocitele, preadipociteie, fibroblaștii și celulele vasculare, <i>in situ</i> , hibridizarea a fost realizată pe secțiuni din țesutul gras epididimal din laba animalelor normale, utilizând riboprobe de <i>ob</i> sens și antisens (Richardson și colab.1992, așa cum s-a prezentat mai sus; Wasserman, "The concept of the fat organ", in Rodahl, Issekutz, fat as a tissue", pp.22 -92, McGraw Hill, New York(1964)). Când se utilizează o probă antisens, semnalele pozitive sunt detectabile în toate adipocitele din această secțiune (fig. 30-marcat-Wt). Semnalele n-au fost notate când proba antisens s-a hibridizat la secțiunile de creier (datele nu sunt prezentate). Hibridizarea probei antisens la secțiuni a țesutului adipos de la șoarecele C57B1/Ks db/db, a fost mult crescută, confirmând exprimarea ARN-ului <i>ob</i> de adipocitele specifice și demonstrând creșterea înaltă a nivelului de ARN <i>ob</i> per adipocit, la aceste	21

animale (fig. 30 marcat db/db). Șoarecele mutant la poziție DB este masiv obez, ca parte a sindromului care este indentic fenotipic față de cel văzut în C57B1/6J *ob/ob* la șoarece (Bahary și colab., 1990, așa cum s-a prezentat mai sus). ARN *ob* nu s-a sintetizat din celulele stromale ale țesutului adipos separat din adipocite. Așa cum s-a așteptat, celulele fracțiunii adipocitei exprimate ARN *ob* utilizează analiza de absorbție Northern (fig. 31). Același rezultat a fost obținut utilizând RT-PCR (datele nu sunt prezentate). Pe aceste date se bazează concluzia că, numai adipocitele exprimă gena *ob*. Datele din adipocitele în cultură, confirmă această concluzie. În aceste studii, celulele 3T3 -F442A sunt cultivate, utilizând condițiile care duc la acumularea de lipide, ca parte a programului celular care conduce la diferențiere în adipocite. ARN *ob* n-a fost exprimat în celule de dezvoltare exponențială, nici confluent celulelor preadipocitare 3T3-F442A, care exprimă markerii timpurii, în timp ce diferențierea acestor celule în adipocite, duce la exprimarea unor nivele detectabile de ARN *ob* (fig. 31) (Dani și colab., *J. Biol. Chim.* 264: 10119-10125 (1989)). Nivelul de ARN *ob* este extrem de sensibil la condițiile de cultură, încât n-a mai fost observat nici un mesaj post-confluent celulelor care n-au fost expuse insulinei. Studiile de hibridizare arată că ARN *ob* este exprimată *-in vivo* - în diferite depozite de țesuturi grase, incluzând țesuturile epididimale, parametricale, abdominale, perirenale și inghinale la bebi de animal (fig. 32A). Nivelul precis de exprimare în fiecare depozit a fost într-o câțiva variabil cu nivele de exprimare a ARN *ob* mai scăzute pentru țesutul gras parametrial și inghinal. ARN *ob* este așadar exprimată în țesutul adipos brun, nivelul de exprimare fiind de aproximativ 50 de ori mai scăzut pentru țesutul gras, brun, raportat la alte depozite tisulare adipoase. Aceste diferențe cantitative sunt liber corelate cu diferențele menționate mai înainte, în dimensiunea celulară, între depozitele de celule grase diferite (Johnson și colab., *J. Lipid Res.* 13: 2-11 (1972)). Cantitatea de ARN *ob* în țesutul gras brun este neafectată prin expunere la rece (fig. 32 B). În acest experiment, nivelul de proteină necuplată ARN (UGP) este crescut la țesutul gras brun, după expunere la rece, în timp ce nivelul de ARN *ob* nu este schimbat (Jacobson și colab., *J. Biol. Chem.* 260: 16250-16254 (1985)). În general, aceste date confirmă că toate adipocitele sunt capabile de a produce ARN *ob* și demonstrează un nivel variabil de exprimare la diferite depozite de țesuturi grase. Aceste date sprijină posibilitatea ca nivelul de proteine codificate să se coreleze cu masa totală de țesut adipos. Nivelele de ARN *ob* la șoarecele db/db și șoarecele cu leziuni ale hipotalamusului au fost măsurate. Leziunile hipotalamusului ventromedial (VMH) au ca rezultat obezitatea, ca parte a sindromului care seamănă cu cel văzut la șoarecii *ob/ob* și db/db (Bray și colab., *Metabolism*, 24 :99-117 (1975)). Experimentele parabiozei sugerează că, astfel de leziuni au ca rezultat o supraexprimare a factorului blood-borne care sprijină consumul de hrană și greutatea corporală (Hervey, 1959, așa cum s-a prezentat mai sus). Rezultate similare sunt notate atunci când șoarecele mutant la poziția db este parabiozat la șoarecele normal, sugerând că receptorul *ob* poate fi codificat prin poziția db (Coleman, și colab. 1978, așa cum s-a prezentat mai sus). Astfel, obezitatea care rezultă din leziunile VMH și mutația db, pot fi așadar rezultatul rezistenței la efectele proteinei *ob*. În acest caz o creștere secundară a nivelelor de ARN *ob* în țesutul adipos poate fi prevăzută. Leziunile hipotalamice sunt induse la șoarece la femelă CBA, utilizând tioglucoză de aur, chimică (GTG) (Debons și colab., *Fed.Proc.* 36: 143-147 (1977)). Acest tratament are ca rezultat, leziunile hipotalamice specifice, în principal în hipotalamusul ventromedial (VMH), cu o dezvoltare ulterioară a obezității în câteva săptămâni. Uzual, o singură injecție intraperitoneală a CTG de 0,2 mg/g greutate corporală, este rezultatul dezvoltării obezității în patru săptămâni. Șoarecii femele de o lună CBA/J (20-25 g) sunt tratați cu GTG și apoi greutatea câștigată a animalelor tratate în raport cu martorii, este prezentată în tabelul 2. ARN-ul în țesutul adipos, este preparat de la șoarecele db/db și de la animalele tratate cu GTG, care

RO 121036 B1

au câștigat >20 g. Prin analiza de absorbție Northern se arată o creștere de douăzeci de ori a nivelului de ARN *ob* la șoarecii de două luni, de tip db/db tratați cu GTG, comparativ cu animalele normale (fig. 33).

Tabelul 2

Câștigul în greutate, la șoarecii tratați cu tioglucoză de aur

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

Șoarecii femele de două luni, sunt tratate cu tioglucoză de aur GTG. Se utilizează șoareci CBA/J. Tioglucoza de aur (A0632 Sigma) este administrată intraperitoneal, într-o soluție salină, normală, la un dozaj de 2,0 mg/g. Greutatea corporală pentru animalele martor și pentru cele injectate, a fost înregistrată înainte de injectare și după o lună de la injectare. Animalele sunt menținute câte cinci într-o cușcă și sunt hrănite, până la saturație. Greutate câștigată la o lună după injectare, este prezentată în tabelul 2. Animalele cu greutate corporală câștigată mai mare decât 20 g, la o lună după injectare, sunt selectate pentru studiul următor.

Discuții

Produsul genetic conținând gena *ob* de șoarece circulă în plasma de șoarece și plasma umană, în care acesta acționează pentru reglarea masei de țesut adipos. Alte studii privind reglarea exprimării și a mecanismului de acțiune al *ob* vor constitui implicații importante pentru înțelegerea modului fiziologic de reglare a greutății corporale.

Prezentul exemplu arată că produsul genetic *ob* este exprimat exclusiv prin adipocite din depozitele tisulare adipoase. Acest rezultat este consistent cu posibilitatea ca produsul de proteină al genei *ob* să coreleze depozitele de lipide din organism. Mai mult decât atât, ARN *ob* este multiplicată de douăzeci de ori la șoarecele db și la cel cu leziuni hipotalamice. La aceste animale, creșterea actuală a nivelului ARN *ob* pe celulă poate fi chiar mai mare decât de douăzeci de ori, deoarece dimensiunea celulei adipocitului, este crescută cu aproximativ cinci ori la aceste animale (vezi fig. 30) (Debons și colab. 1977, așa cum s-a prezentat mai sus). Aceste date așază gena db și hipotamusul la partea inferioară a curentului *ob*, în ceea ce privește modul de control al greutății corporale și sunt în consens cu ipoteza că receptorul *ob* este codificat în poziția db (Coleman și colab., *Diabetologia* 14 : 141-148 (1978). Clonarea moleculară a receptorului și/sau genei db va rezolva această problemă. Creșterea nivelului de *ob* ARN la db/db și la șoarecii tratați cu GTG, sugerează că celulele nonautonome funcționează ca genă *ob* produs în celulele grase (Ashwell și colab., *Proc.R.Soc.Lond.* 195:343-353 (1977); Ashell și colab. *Diabetologia*, 15: 65-470). Astfel, dacă proteina codificată acționează direct asupra celulelor grase pentru a inhiba dezvoltarea sau diferențierea față de exprimarea genei *ob* la șoarecele de tip sălbatic tratat cu GTG duce la un fenotip slab. Explicația cea mai probabilă a acestor date este că proteina *ob* funcționează ca o endocrină, ca moleculă de semnalizare care este secretată de adipocite și acționează direct sau indirect asupra hipotamusului. Efectele directe asupra hipotamusului vor necesita ca mecanismele să existe pentru a permite trecerea produsului genetic *ob* prin bariera sanghină a creierului. Mecanismele cuprinzând organul circumventricular și/sau transportorii specifici ar permite accesul la creier a moleculei de dimensiunea care este codificată de gena *ob* (Johnson și colab., *FASEB J*, 7: 678-686 (1983); Baura și colab., *J. Clin. Invest.*, 92: 1824-1830(1993); Pardridge, *Endocrine Reviews*, 7:314-330 (1986)). Cu toate

acestea, ipoteza trebuie să fie considerată cu prudență până la identificarea mijloacelor prin care proteina ar putea traversa bariera sanghină din creier. Mai mult decât atât, este necesar să se facă evaluarea efectelor posibile asupra altor organe țintă. Celulele grase de semnal care sunt responsabile de o variație cantitativă în nivelul de exprimare al genei *ob* nu sunt încă cunoscute, dar se corelează cu diferențele în dimensiunile celulelor adipocite. Adipocitele de la șoarecele db/db, sunt de cinci ori mai mari decât cele de la șoarecele normal, având dimensiune celulară de aproximativ 1,0 μ g lipide/celulă (Johnson și colab., 1972, așa cum s-a prezentat mai sus). O evidență precedentă, a indicat că, conținutul lipidelor celulare și/sau dimensiunea acestora, reprezintă un parametru important în determinarea greutateii corporale (Faust și colab., *Am. J. Physiol.*, 235: 279-286 (1978); Faust și colab., *Science*, 197: 393-396 (1977)). Aceasta ar fi că, fiecare celulă grasă este exprimată la un nivel scăzut de ARN *ob* care crește mai departe în proporție dependentă de dimensiunea celulei. De asemenea, este posibil ca dimensiunea celulară să nu fie parametrul acceptat, dar mai mult, acesta se corelează cu semnalul intracelular, care crește exprimarea genei *ob* în adipocitele din șoarecele db/db și cel lezat VMH. În orice caz, componentele modului transducției de semnal, care reglează sinteza de ARN *ob*, sunt la fel de importante în determinarea greutateii corporale. Influențele genetice și cele de mediu care reduc nivelul de exprimare al *ob*, pot acționa pentru creșterea greutateii corporale, pe măsura influențării scăderii sensibilității la proteina codificată. Moleculele specifice care reglează nivelul de exprimare al genei *ob*, sunt încă necunoscute și se așteaptă determinarea nivelelor genei de control care duce la o variație cantitativă în nivelul de ARN *ob* și la examinarea elementelor de reglare a genei *ob*. Identificarea moleculelor care reglează exprimarea genei *ob* în adipocite și a celor care mediază efectele proteinei codificate la porțiunile de acțiune ale acesteia va duce la o mai bună înțelegere a mecanismelor fiziologice care reglează greutatea corporală.

Exemplul 10. Modelul de exprimare și cartarea ARN, privind aplicațiile fizice, citogenetice și genetice ale cromozomului 7

ARN *ob* se exprimă la nivele ridicate în țesutul adipos uman și la nivele substanțial scăzute în placentă și inimă. Aplicația genei *ob* umane la mai mulți cromozomi artificiali din drojdie, adiacenți YAC, începe cu cromozomul 7 q 31,3. În plus, pentru confirmarea poziției relative a genei pe baza cartării genetice comparative la șoarece și la om, acest studiu a identificat 8 markeri microsateliți stabiliți în imediata apropiere fizică a genei umane *ob*. Deoarece mutațiile la *ob* de șoarece pot avea ca rezultat sindromul care pare apropiat de obezitatea morbidă la om, acești markeri genetici reprezintă instrumentele importante pentru studierea rolului posibil al genei *ob* în formele ereditare ale obezității umane.

Materiale și metode

Analiza absorbției Northern

ARN total este preparat din țesutul adipos utilizând metoda Chirgwin și colab., *Biochem.* 18: 5294-5299(1979). Metodele de analiză prin absorbție Northern, radiomarcare și hibridizare, se efectuează așa cum s-a descris (Zhang și colab., 1994, așa cum s-a prezentat mai sus). Absorbția Northern a poliA+ARN (MTN uman, MTN II uman și MTN II fetal uman) s-a obținut din CLONETECH (Palo Alto, GA), ca primeri PCR utilizați pentru generarea probei de actină umană radiomarcată.

Dezvoltarea STS

Analizele PCR specifice (STS) la porțiunea anexată a secvenței se realizează și se optimizează, în esență așa cum s-a descris ((Green și colab. *PCR Methods Applic.*, 1991; Green și colab., *Genomics*, 11:548-564 (1991); Green, "Physical mapping of human chromosomes: generation of chromosome-specific sequence-tagged site", in *Methods in molecular Genetics*, vol.1, *Gene and Chromosome Analysis* (Part A) pp.192-210, Adolph,

RO 121036 B1

ed. Academic Press. Inc. San Diego (1993); Green și colab., <i>Hum. Mol. Genet.</i> , 3:489-501 (1994)). Fiecare STS este denumit utilizând prefixul 'sWSS' urmat de un număr unic. Detaliile despre STS 19 menționat aici, sunt prezentate în tabelul 3, cu o informație adițională (de exemplu condițiile de reacție PCR, secvența completă ADN), care este disponibilă de la GenBank and/sau the Genome Data Base (GDB). Pentru microsatelitul specific STS, primerii de oligonucleotide utilizați în analiza PCR (tabelul 3) au corespuns fie celor utilizați pentru analiza de genotip (tabelul 4), fie celor desemnați (adesea cu programul de computer OSP) (Hiller și colab., <i>PCR Methods Applic.</i> 1:124-128 (1991)), utilizând secvența ADN disponibilă de la GenBank. Tabelul 3 ilustrează STSs în YAC adiacent, conținând gena <i>ob</i> umană.	1
Conform fig. 35, se prezintă al 19-lea STS specific cromozomului 7, cartat la YAC adiacent, conținând gena <i>ob</i> umană. În fiecare caz, denumirea de 'sWSS' desemnată, relevantă alias, denumirea poziției însemnată GDB, sursa STS, secvențele primerului PCR, dimensiunea STS și numărul de identificare al GDB, sunt indicate. Sursele STS-urile sunt următoarele: 'YAC End' (terminație inserată izolată de YAC)(Green, 1993, supra), 'Lambda Clone ¹ ' (clona lambda specifică cromozomului 7 randomizat) (Green și colab. 1991, așa cum s-a prezentat mai sus; Green, 1993, așa cum s-a prezentat mai sus), 'Genetic Marker' (markerul microsatelit, vezi tabelul 2) (Green și colab. 1994, așa cum s-a prezentat mai sus), 'Insertia YAC' (segmentul randomizat din insertia YAC) și 'gene' (STS specific genei). De notat că pentru câțiva STS-uri specifici markerului genetic, primerii PCR utilizați pentru identificarea YAC (se prezintă în acest tabel) sunt diferiți de cei utilizați pentru analiza genotipului de performanță (tabelul 4), deoarece detectarea YAC conținând markerul genetic, nu necesită amplificarea însăși a regiunii polimorfice. Toate analizele PCR indicate, au utilizat o temperatură de susținere de 55°C, exceptând cele pentru sWSS494, sWSS883, sWSS1529 și sWSS2619 (care au utilizat 50°C), sWSS999 și sWSSII74 (utilizând 60°C) și sWSS8o8 (65°C). Detaliile adiționale privind analizele PCR specifice STS, sunt disponibile GDB.	3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25

RO 121036 B1

Tabelul 3

Denumire STS	Alias	Poziție	Sursă	Primerii PCR	Dimensiune (bp)	Secv.ID Nr.	GDB ID Nr.
sWSS1734		D7S2185	Terminație YAC	CAAGACAAATGAGATAAGG AGAGTTACAGCTTTACAG	117	39 40	GOO-455-235
sWSS494		D7S2016	Clona lambda	CTAAACACCTTTTCCATTC TTATATTCACCTTTTCCCCTCTC	153	41 42	GOO-334-404
sWSS883	UT528	D7S1498	Marker genetic	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG GTCCAGCTTTAATTGTGAGC	75	43 44	GOO-455-262
sWSS2359	AFMa065zg9	D7S1873	Marker genetic	AGTGTTGTGTTTCTCCTG AAAGGGGATGTGATAAGTG	60	45 46	GOO-455-247
sWSS2336	AFMa125whl	D7S1874	Marker genetic	GGTGTTACGTTTAGTTAC GGAATAATGAGAGAAGATTG	116	47 48	GOO-455-244
sWSS1218	AFM309yfl	D7S680	Marker genetic	GCTAACTGACAGAAAC GACTATGTAAAAGAAATGCC	106	49 50	GOO-307-733
sWSS1402		D7S1916	Terminație YAC	AAAGGGCTTCTAATCTAC CCTTCCAACTTCTTTGAC	122	51 52	GOO-344-044
sWSS999		D7S1674	Terminație Inserție YAC	TAAACCCCTTTTCTGTTC TTGCATAATAGTCACACCC	81	53 54	GOO-455-238

RO 121036 B1

Tabelul 3 (continuare)

Denumire STS	Alias	Poziție	Sursă	Primerii PCR	Dimensiune (bp)	Secv. ID Nr.	GDB ID Nr.
sWSS2588		D7S2187	Terminație YAC	ATCACTACACACCTAATC CCATTCTACATTTCCACC	117	61 62	GOO55-253
sWSS808	PAX4	Pax4	Gena	GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA TTGCCAGGCCAAAGAGGGCTGGAC	153	63 64	GOO-455-259
sWSS1392	AFM206 XCL	D7S1635	Marker genetic	CTCAGGTATGTCTTTATC TGTCTCTGCATTCTTTC	75	65 66	GOO-307-815
sWSS1148	AFM199XH12	D7S504	Marker genetic	GACACATACAAACACAAAG ATTGAGTTGAGTGATAGTAG	60	67 68	GOO-307-652
sWSS1529		D7S1943	Terminație YAC	CAGGGATTTCTAATTGTC AAAAGATGGAGGCTTTTG	116	69 70	GOO-334-119
sWSS2619	ob	ob	Gena	CGTTAAGGGGAAGGAACCTCTGG TGGCTTAGAGGAGTCAGGGA	106	71 72	GOO-455-256
sWSS404		D7S1956	Clona lambda	ACCAAGGTCAATACAAAG TAATGTGTCTTCTTGCC	122	73 74	GOO-334-251
sWSS2367	AFMa345wC9	D7S1875	Marker genetic	CAATCCTGGCTTCATTG AAGGTGGGTAGGATGCTA	81	75 76	GOO-455-250

RO 121036 B1

Tabelul 4

MARKERII MICROSATELITULUI ÎN CONTIGUL YAC, CONȚINÂND GENA ob UMANĂ

Denumire marker	Tipul	Poziție	Primeri	Secvența ID Nr.	GDB ID Nr.
UT 528	Tetra.	D7S1498	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG GTCCAGCTTTAATTGTGAGC	77 78	GOO-312-446
AFMa065zg9	(CA) _n	D7S1873	AGCTTCAAGACTTTNAGCCT GGTCAGCAGCAGCTGTGATT	79	GOO-437-253
AFMa125whl	(CA) _n	D7S1874	TCACCTTGAGATTCCATCC AACACCGTGGTCTTATCAAA	81 82	GOO-437-263
AFM309yflo	(CA) _n	D7S680	CATCCAAGTTGGCAGTTTT AGATGCTGAATCCCAGACA	83 84	GOO-200-283
AFM218xflo	(CA) _n	D7S514	TGGGCAACACAGCAAA TGCAGTTAGTGCCAAATGTCA	85 86	GOO-188-404
AFM206xcl	(CA) _n	D7S635	CCAGGCCATGTGGAAC AGTTCTTGGCTTGGTCAGT	87	GOO-199-240
AFM199xh12	(CA) _n	D7S504	TCTGATTGCTGGCTGC GCGCGTGTATGTGAG	89 90	GOO-188-280
AFM345wc9	(CA) _n	D7S1875	AGCTCTTGGCAAACTCACAT GCCTAAGGGAATGAGACACA	91 92	GOO-437-259

Un număr de opt markeri de microsateți cartajați la YAC adiacent conțin gene umane *ob* (fig. 35), așa cum sunt prezentați în tabel. În fiecare caz, denumirea de marker (indicată ca alias în tabelul 3) tipul de motiv de satelit (se repetă tetranucleotida 'Tetra' sau $(CA)_n$), denumirea, poziția însemnată GDB, secvențele primer utilizate pentru analiza genotipului pe bază de PCR și numărul de identificare GDB, sunt indicate. Detalii adiționale privind analizele PCR și polimorfismele, sunt disponibile la GDB. SIS specific *ob* umane (sWSS 2619) este desemnat utilizând secvența ADN obținută din regiunea 3' netransferată, a ADNc. STS specific Pax4 uman (sWSS808) este dezvoltat utilizând următoarea strategie. Primerii de oligonucleotide specifici pentru gena Pax4 la șoarece (GGCTGTGTGAGCAAGATCCTA GGA) (SECV. 1D Nr.63) și (GGGAGCCTTGTCCTGGGTACAAAG) (SECV. ID Nr.93) (Walther și colab., 1991, Genomics 11: 424-434) (1991)) se utilizează pentru amplificarea unui fragment 204 bp din ADN genomic uman (care este un produs de aceeași dimensiune ca și cel generat de ADN genomic la șoarece). Această analiză PCR n-a fost convenabilă pentru identificarea YAC-urilor corespunzătoare, deoarece un produs cu dimensiuni similare (200 bp) a fost de asemenea amplificat din ADN în drojdie. Cu toate acestea, analiza secvenței ADN a produsului PCR generat din ADN uman relevă substituiri la pozițiile 20, între cele 156 baze analizate (datele nu sunt prezentate). Utilizând această secvență specific umană, un nou primer (TTGCCAGGCAAAGAGGGCTGGAC) (SECV. ID Nr.64) a fost desemnat și utilizat cu primii primeri specifici Pax4 de șoarece, de mai sus (vezi tabelul 3). Rezultatele analizei PCP specifice Pax4 umane n-au amplificat produsul, semnificativ, ADN de drojdie astfel a fost utilizat pentru identificarea YAG-urilor corespunzătoare.

Identificarea YAC-urilor prin screeningul pe bază de PCR

Majoritatea YAG-urilor prezentate în fig. 35 au derivat din colecția de clone mult îmbogățită pentru cromozomul uman 7 ADN (resursa YAC a cromozomului 7) (Green și colab., 1995, așa cum s-a prezentat mai sus) utilizând strategia de screening pe bază de PCR (Green și colab. 1995, așa cum s-a prezentat mai sus; Green și colab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1213-1217 (1990)). În câteva cazuri, clonele au fost izolate prin screeningul pe bază de PCR (Green și colab. 1990, așa cum s-a prezentat mai sus) al colecțiilor YAC genomice umane total disponibile, construite la CEPH (Dausset și colab., *Behring Inst. Mitt.* 91:13-20 (1992); Albertsen și colab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4256-4260 (1990)) sau ICI (Anand și colab. *Natl. Acids Res.* 17: 3425-3433 (1989); Anand și colab. *Natl. Acids Res.* 18: 1951-1956 (1990)). Fiecare YAG este denumit, utilizând prefixul 'yWSS' urmat de un număr unic.

Rezultate și discuții

Examinarea exprimării tisulare a genei *ob* prin analiza de absorbție Northern, arată că ARN *ob* este exprimat la un nivel ridicat în țesutul adipos uman și nivele mult mai scăzute în placentă și inimă (fig. 54). Dimensiunea ARN (aproximativ 4,5 kb) a fost echivalentă la oameni și șoareci ca și în fiecare dintre țesuturile exprimate. În aceste studii, semnale mai înalte de cinci ori, au fost văzute în 10 μg ARN din țesutul adipos ca și în 2 μg de poli A⁺ de ARN din placentă. Un semnal de cinci ori mai scăzut, a fost văzut în poli A⁺ ARN din inimă în comparație cu cel din placentă. Se estimează că, nivelul de ARN *ob* este de aproximativ 250 ori mai mic în placentă decât în țesutul adipos. În acest experiment, ARN *ob* n-a fost detectat în nici unul din celelalte țesuturi analizate, incluzând, creierul, plămânul, ficatul, mușchii scheletici, rinichii și pancreasul. Experimentele adiționale n-au prezentat ARN *ob* în splină, timus, prostată, testicul, ovar, intestin subțire, colon, leucocitele din circulația periferică sau creierul fetal, ficat sau rinichi (datele nu sunt prezentate). Este posibil, de asemenea, ca *ob* să fie exprimată la un nivel nedetectabil (prin analiza de absorbție Northern), în aceste țesuturi din urmă sau în alte țesuturi care n-au fost studiate. Modelele de exprimare umane observate diferă întrucâtva de cele de la șoareci, în care ARN *ob* este detectat aproape exclusiv în țesutul adipos.

Cartarea comparativă a regiunii genetice *ob* în genomul de șoarece și genomul uman

Gena *ob* la șoarece este localizată la cromozomul 6 proximal, într-o regiune omoloagă cu porțiunea de cromozom uman 7q. Genele în care se include acest segment (de la proximal la distal): Met protooncogenă, regulatorul conductanței transmembranare fibroase cistice (Cftr), perechea de 4 gene conținută de cutie (Pax4), *ob* și carboxipeptidaza A (Cpa) (Zhang și colab., 1994, așa cum s-a prezentat mai sus; Friedman și colab., 1991, așa cum s-a prezentat mai sus). La șoareci, cartarea genetică a fost utilizată pentru a demonstra că Pax4 este legat puternic la *ob* (Walther și colab., 1991, așa cum s-a prezentat mai sus; Zhang și colab., 1994, așa cum s-a prezentat mai sus). Distanța fizică între *ob* și Pax4 a fost găsită a fi de aproximativ o pereche megabază (Mb) (Zhang și colab., 1994, așa cum s-a prezentat mai sus a). Pe baza acestor studii comparative de cartare se așteaptă ca gena *ob* umană este între Pax4 și CPA, pe cromozomul 7q. Mai mult decât atât, deoarece CFTR umană (Heng și colab. De L Genet. 62:108-109 (1993)) și Pax4 (Tamura și colab., *Cytogenet. Cell Genet.* 66: 132-134 (1994)) sunt cartate prin fluorescență *-in situ*- hibridizarea (FISH) la 7q31,3 și respectiv 7q32, cea mai probabilă poziție citogenetică a genei *ob* umane, ar fi în vecinătatea limitei 7q31,3-q32.

Cartarea genei *ob* pe cromozomul 7 uman

STS-ul (SWSS2619) de amplificare a unui segment mic din regiunea 3' netransferată a genei umane *ob*, a fost utilizată pentru screeningul colecției de clone YAC care este mult îmbogățită pentru ADN cromozomul 7 uman (Green și colab. 1995a., *Genomics* 25:170-183) și 9 YAC se identifică ca (yWSS691), yWSS1332, yWSS1998, yWSS2087, yWSS3319, yWSS3512, yWSS4875, yWSS4970 și yWSS5004). Pentru a verifica dacă acești YAC-uri conțin o genă *ob* umană autentică, s-au efectuat două experimente adiționale. Mai întâi, fiecare YAC a fost testat printr-o a doua analiză PCR specifică *ob* umană și toate au fost găsite pozitive (datele n-au fost prezentate). În al doilea rând, ADN din drojdie din fiecare clonă, a fost digerat cu EcoR1 și analizat prin hibridizare în gel-transfer, utilizând o probă derivată de la *ob* ADNc uman. În toate aceste exemple a fost văzută o singură bandă de hibridizare și această bandă a fost aceeași ca dimensiune în YAC-uri și clona P1 este cunoscută că ar conține gena *ob* umană (datele nu sunt prezentate).

Utilizând programul computerului SEGMAP (Green and Green, 1991, așa cum s-a prezentat mai sus) și alte date conținute de STS pe baza YAC care au fost generate pentru cromozomul 7 (Green și colab., 1991, așa cum s-a prezentat mai sus; Green și colab., 1994, așa cum s-a prezentat mai sus; Green și colab., 1995, așa cum s-a prezentat mai sus;) gena *ob* umană a fost găsită că constă din YAC adiacent prezentat în fig. 35. În mod specific, acest numărator constă din 43 YAC-uri suprapuși și 19 STS-uri cu ordonare unică. Detaliile despre fiecare din cele 19 STS-uri sunt prevăzute în tabelul 3. În plus față de *ob*-specific STS, acest numărator conține așadar un STS (sWSS808) specific pentru gena Pax4 umană (Tamura și colab. 1994, așa cum s-a prezentat mai sus; Stapleton și colab., 1993, *Nature Genet.* 3: 292-298), 7 STS-uri derivați din cromozomul 7 specific YAC-uri, 2 STS-uri derivate de la cromozomul 7, clonele lambda specifice și mai important, cei 8 microsateliți specifici STS. Detalii suplimentare despre acești 8 markeri genetici, incluzând secvențele primerilor utilizați pentru analiza genotipului, sunt prevăzute în tabelul 2. De notat că există YAC redundanți pe bază de conectivitatea contigului în general (de exemplu, există doi sau mai mulți YAC-uri conectați la fiecare pereche adiacentă de STS), care formează un suport puternic pentru ordonarea relativă a STS, arătată în fig. 35.

Așa cum se prezintă în fig. 35, orientarea prevăzută pentru *ob* umană conținând YAC contig, este aceea că, SWSS1734 este centrometrică, mult STS (de exemplu, mai aproape de CFTR), în care sWSS2367 este telomeră, mai mult STS (de exemplu mai aproape de CPA). Această orientare este predominant bazată pe datele de cartare comparativă care

RO 121036 B1

plasează Pax4 proximal și *ob* distal în blocul sintenic prezent în ADN la șoarece și ADN uman (Zhang și colab.1994, așa cum s-a prezentat mai sus). Gena *ob* se cartează aproape de terminația telomeră a contigului, pe baza plasamentului *ob* specifice STS (sWSS2619).

În timp ce contigul prezentat în fig. 35 este dedus prin SEGMAP, fără a se considera dimensiunile pentru YAC (în care STS-urile sunt etalate echidistant una de alta), o analiză similară a datelor SEGMAP care se numără pentru dimensiunile YAG indică faptul că dimensiunea totală a regiunii acoperite de contig este chiar peste 2Mb (datele nu sunt prezentate). Astfel, în timp ce toți cei 8 microsateliți specifici STS (tabelul 4) sunt conținuți în intervalul genomic care cuprinde 2Mb în stare brută, cel de-al treilea, cel mai apropiat de terminația telomeră a contigului (sWSSI392, sWSS1148 și sWSS2367) este în special mai apropiat chiar de gena *ob* (poate în intervalul cel mai mic, de aproximativ 500 kb). De fapt, toate cele trei STS-uri din urmă, sunt prezente în cel puțin o *ob* umană conținând YAC-uri. De notat că intervalul între Pax4 uman (sWSS808) și *ob* (sWSS2619) este estimat a fi de aproximativ 400 kb, din care această regiune este prevăzută să cuprindă aproximativ 1 Mb la șoarece (Zhang și colab.1994, așa cum s-a prezentat mai sus). În final, 3 din YAC-urile în contig (yWSS691, yWSS999 și yWSS2935) au fost analizați prin FISH și fiecare a fost găsit că hibridizează exclusiv la 7q31,3. Unul din acești YAC-uri (yWSS691) conține STS specific-*ob*, în timp ce alte 2 clone conțin STS specific Pax4. Ultimele rezultate sunt, în general, consistente cu distribuția citogenetică precedentă la Pax4 uman până la 7q32 uman (Tamura și colab.1994, așa cum s-a prezentat mai sus). Pe baza acestor date, gena *ob* umană, poate fi distribuită în banda citogenetică 7q31,3.

Exemplul 11. Polipeptida *ob* umană este biologic activă la șoarece

Grupele formate din câte 10 șoareci *ob/ob*, sunt tratate prin injectare intraperitoneală (i.p.), cu câte 10 μg/g/zi de polipeptidă *ob* murină sau umană (bacteriană) sau soluție salină. După patru zile, grupul care primește soluția salină câștigă 0,3 g. Grupa care primește *ob* murinică pierde 3,2 g. Grupul care primește *ob* umană, pierde 2 g ($p < 0,01$ comparativ cu matorul care primește soluție salină). Aceste grupuri au fost așadar testate pentru consumul de hrană. Datele pentru consumul de hrană sunt prezentate în tabelul 5; datele pentru masa corporală, sunt prezentate în tabelul 6.

Tabelul 5

Consumul de hrană/zi (g) la șoarecele *ob/ob* tratat prin injecții intraperitoneale (valoarea $\pm$ S.Dev)

Tratament	Ziua 0	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 3	Ziua 4	Ziua 5	Ziua 6	Ziua 7
Soluție salină	13,4 $\pm$ 2,6	12,8	12,8	13,1	14,0	12,3	12,4	8,3
<i>ob</i> murină	14,9	3,7	4,4	5,1	8,9	8,1	8,7	3,5
<i>ob</i> umană	14,3	10,3	8,7	7,0	8,9	5,3	3,8	13,0

Tabelul 6

Greutatea corporală și modificarea greutateii la șoarecele *ob/ob* tratat (valoarea $\pm$ S.Dev.)

Tratament	Gr.corp. (Ziua 0)	Greut.corp (Ziua 4)	Modif.% (Ziua 0-4)	Greut.corp (Ziua 6)	Modif.% (Ziua 0-6)
Soluție salină	39,9 $\pm$ 1,8	40,7 $\pm$ 1,6	0,8 $\pm$ 0,5	41,1 $\pm$ 2,2	1,2 $\pm$ 1,1
<i>ob</i> murinică	39,5 $\pm$ 2,1	36,2 $\pm$ 2,0	-3,3 $\pm$ 1,2	36,3 $\pm$ 2,2	-3,1 $\pm$ 1,2
<i>ob</i> umană	39,5 $\pm$ 2,0	37,6 $\pm$ 1,7	-2,0 $\pm$ 1,0	36,1 $\pm$ 1,3	-3,5 $\pm$ 1,3

RO 121036 B1

Aceste date demonstrează că *ob* umană este activă biologic la șoarece.

Exemplul 12. O doză ridicată de *ob* influențează șoarecele de tip sălbatic

Șoarecele de tip sălbatic (C57B16J +/-) este tratat intraperitoneal cu 10 $\mu\text{g/g/zi}$ cu *ob* murinic recombinat și masa corporală este măsurată la fiecare 4 zile. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 7.

Tabelul 7

Masa corporală (g) la șoarecele normal care a primit *ob*

Tratament	Ziua 0	Ziua 4	Ziua 8	Ziua 12	Ziua 16
Soluție salină	22,6 $\pm$ 1,4	22,2 $\pm$ 1,2	22,5 $\pm$ 1,3	23	22,5
<i>ob</i> murină	22,4 $\pm$ 1,5	20,6 $\pm$ 1,5	20,8 $\pm$ 1,3	20,8	21,8

Aceste date demonstrează că *ob* afectează masa corporală atât la tipul sălbatic, cât și la tipul obez (*ob/ob*) de șoarece, dar într-un grad mult mai mic.

Exemplul 13. Polipeptida *ob* administrată prin infuzie continuă cu pompa

Acest exemplu demonstrează că infuzarea continuă a polipeptidei *ob* are ca rezultat pierderea greutatei la șoarecele normal. Șoarecele normal (neobez) este tratat cu polipeptida *ob* murină, cu ajutorul unei pompe osmotice de infuzie. O dozare de 0,5 mg de proteină/kg corp/zi are ca rezultat o pierdere de 4,62% (+/-1,34%) din greutatea de referință, prin infuzie în a 6-a zi.

Materiale și metode

Animale. În acest exemplu este utilizat șoarecele C57B16 (+/+) de tip sălbatic. Șoarecii sunt menținuți în cuști individuale în condiții umane. Vârsta șoarecelui la punctul inițial a fost de 8 săptămâni și aceste animale au avut greutate stabilizată. În fiecare grup s-au utilizat zece șoareci (purător față de proteină).

Măsurarea hranei și greutatei. Animalelor li s-a dat mâncarea măcinată, (PMI Feeds, Inc.) ca hrană pulbere grosieră (Allentown Caging and Equipment) permițându-se astfel o măsurare mai sensibilă și mai exactă decât în cazul utilizării blocurilor de hrană obișnuite. Greutatea a fost măsurată la aceeași oră, în fiecare zi (2.00 pm) o perioadă de 6 zile. Greutatea corporală din ziua precedentă, înainte de infuzie, a fost definită ca greutate de referință.

Clonarea de ADN ob murin. Clonarea ADN *ob* murin pentru exprimare în *Escherichia coli* s-a realizat după cum urmează. Secvența ADN, așa cum s-a dedus din secvența peptidului publicat, care apare în (Zhang și colab., 1994, așa cum s-a prezentat mai sus, adică exemplul 1, așa cum s-a prezentat mai sus), au fost supuse translației reverse, utilizând codoni optimi de *Escherichia coli*. Porțiunile de clonare terminale sunt XbaI până la BamHI. Agentul de creștere a legăturii ribozomale și porțiune puternică a legăturii ribozomale au fost incluse în fața regiunii de codificare. Secvența ADN duplex a fost sintetizată utilizând tehnici standard. Clonele corecte au fost confirmate prin exprimarea proteinei recombinante și prezența secvenței ADN *ob* corecte în modul rezident. Secvența de aminoacid (și secvența ADN) este următoarea:

Secvența ADN *ob* (dublu răsucit) recombinantă Met murină și secvența de aminoacid (SECV. ID. Nr. 94 și 95):

RO 121036 B1

[illegible]

Vectorul de exprimare și specia organismului gazdă. Vectorul de exprimare a plasmidei care s-a utilizat pentru producerea proteinei a fost pGFM1656, American Culture Collection (ATCC) Accession Nr. 69576. ADN-ul de mai sus este legat la vectorul de exprimare pCFM1656, care a fost linearizat cu XhaI și BamHI și transformat în tulpina celulelor gazdă de *Escherichia coli* FM5. Celulele de *Escherichia coli* FW5, au fost derivate la Amgen Inc. Thousand Oaks, CA, de la *Escherichia coli*, specia K-12 (Bachraann și colab. *Bacteriol. Rev.* 40:116-167 (1976)) și conține gena represoare a fagului lambda integrat, cl₈₅₇ (Sussman și colab. *C. E. Acad. Sci.* 254: 1517-1579 (1962)). Producerea vectorului, transformarea celulară și selectarea coloniei s-au realizat prin metode standard, de exemplu, Sambrook și colab., 1989, așa cum s-a prezentat mai sus, celulele gazda fiind dezvoltate în mediu LB.

RO 121036 B1

1 *Administrarea proteinei sau vehiculului.* Polipeptida obținută din murină, recombinantă, a fost
utilizată, pentru experimentele prezente, în general, la o concentrație de aproximativ 0,9
3 mg/ml, soluție salină fosfat tampon, la pK 7,4. Secvența de aminoacid (și secvența ADN)
utilizată a fost descrisă mai sus. Proteina sau vehiculul, au fost administrate prin infuzie
5 osmotică, cu ajutorul unei pompe de infuziune (soluția salină tamponată cu fosfat pH 7,4).
Minipompele osmotice Alzet, (Alza, Paslo Alto, JA, model nr. 1007D) au fost plasate chirurgical
7 la fiecare șoarece în cavitatea subcutanată a zonei subscapulare. Pompele sunt calibrate
pentru a se administra 0,5 ml de proteină în soluție, per oră, pentru o dozare de 0,5 mg
9 proteină/kg corp/zi. Animalele martor au fost infuzate cu o soluție salină de fosfat tampon (la
pH 7,4) cu minipompa osmotică Alzet.

11 *Procedeul de fermentație.* Pentru prepararea proteinei a fost utilizat protocolul de fer-
mentație în trei faze cunoscut sub denumirea de procedeul fed-batch. Compozițiile mediilor
13 sunt prezentate mai jos .

15 *Seria.* Sursa de azot și de fosfat se sterilizează (prin spălare la temperatura de
122°C, timp de 35 de minute, la psi 18-20) într-un vas de fermentație (Biolafitte de 12 l capa-
17 citate). După răcire, se adaugă aseptice carbonul, magneziul, vitaminele și urina din sursa de
metal. După ce cultura de bacterii producătoare de proteină recombinantă murină de 500 ml
(dezvoltată în suspensie LB) se lasă până a doua zi (16 h sau mai mult) se adaugă în
19 fermentator.

21 *Rația I.* După îmbogățire cu 4,0 până la 6,0 O.D.₆₀₀ rația I se adaugă la mediul de
cultură. Se adaugă apoi glucoza la acest amestec într-un grad limitat pentru controlul gra-
23 dului de dezvoltare (μ). Un sistem automat (denumit Distributive Control System) a fost pro-
gramat pentru controlul gradului de dezvoltare la 0,15 generații oră⁻¹.

25 *Rația II.* Când O.D. se îmbogățește la valoarea 30, temperatura este lăsată să
crească încet până la 42°C și rația este schimbată în rația II, așa cum se descrie mai
27 departe. Fermentația este lăsată apoi să continue timp de 10 h, cu luarea probelor la fiecare
2 h. După 10 h, conținutul fermentorului se răcește sub 20°C și se separă prin centrifugare.

29 Compoziția mediului:

Seria: 10 g/l extract de drojdie

31	5,85 g/l sulfat de amoniu (NH ₄) ₂ SO ₄
	3,5 g/l fosfat monoacid de potasiu K ₂ HPO ₄
33	4,0 g/l fosfat biacid de potasiu KH ₂ PO ₄
	5,0 g/l glucoză
35	1,0 g/l sulfat de magneziu hidratat MgSO ₄ •7H ₂ O
Rația I:	50 g/l bacto-triptonă
37	50 g/l extract de drojdie
	450 g/l glucoză
39	8,75 g/l MgSO ₄ •7H ₂ O
	10 ml /l soluție de vitamină
41	10 ml /l soluție cu urme de metal
Rația II:	200 g/l bacto-triptonă
43	100 g/l extract de drojdie
	110 g/l glucoză

45 Soluția de vitamine (seria, rația I): 0,5 g de biotină, 0,4 g de acid folic și 4,2 g de ribo-
flavină, se dizolvă în 450 ml de apă și 3 ml de hidroxid de sodiu NaOH 10 N și amestecul se
47 aduce la 500 ml , cu apă. 14 g de piridoxină clorhidrică și 61 g de niacină, se dizolvă în
150 ml de apă și 50 ml de hidroxid/de sodiu NaOH 10 N și se aduc la 250 ml , cu apă. 54 g
49 de acid pantotenic se dizolvă în 200 ml de apă și se aduc la 250 ml . Cele 3 soluții se com-
bină și se aduc la un volum total de 10 l.

RO 121036 B1

Soluția cu urme de metal (seria, rația I):	1
Clorură ferică ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 27 g/l	
Clorura de zinc ($\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$): 2 g/l	3
Clorură de cobalt ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 2 g/l	
Molibdat de sodiu ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 2 g/l	5
Clorură de calciu ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 1 g/l	
Sulfatul de cupru ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 1,9 g/l	7
Acid boric (H_3BO_3): 0,5 g/l	
Clorură de mangan ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$): 1,6 g/l	9
Citrat de sodiu dihidrat: 73,5 g/l	11
<i>Procedeul de purificare pentru polipeptida ob murină</i>	
Purificarea este însoțită de următoarele faze (numai dacă nu se notează altfel, fazele următoare sunt efectuate la 4°C):	13
1. Pasta celulară. Pasta celulară de <i>Escherichia coli</i> se suspendă de 5 ori în volume de 7 mM EDTA, la pH 7,0. Celulele în EDTA sunt apoi distruse prin cele două faze, cu microfluidizatorul. Celulele obținute sunt centrifugate la 4,2 rot/min, timp de o oră, într-o centrifugă Beckman JB-6, cu un rotor J5- 4,2.	15
2. Spălarea corpului de incluziune # 1. Supernatantul de mai sus, este separat și peletele se resuspendă de 5 ori cu volume de 7 mM EDTA, la pH 7,0 și se omogenizează. Amestecul este centrifugat ca în faza 1.	17
3. Spălarea corpului de incluziune # 2. Supernatantul de mai sus, se îndepărtează și peletele se aduc pentru resuspendare în zece volume de 20 mM Tris, la pH 8,5, 10 mM DTT și 1% dezoxicolat și apoi se omogenizează. Acest amestec se centrifughează ca în faza 1.	19
4. Spălarea corpului de incluziune # 3. Supernatantul de mai sus, se îndepărtează și peletele sunt resuspendate în zece volume de apă distilată și se omogenizează. Acest amestec se centrifughează ca în faza 1.	21
5. <i>Înmulțirea</i> . Peletele sunt înmulțite cu 15 volume de 10 mM HEPES, la pH 8,5, cu 1% sarcosină de sodiu (N-laurii sarcosină), la temperatura camerei. După 60 min, soluția se completează cu 60 mM sulfat de cupru și apoi se aduce sub agitare până a doua zi.	23
6. <i>Îndepărtarea sarcosinei</i> . Amestecul obținut mai sus este diluat apoi cu 5 volume de 10 mM Tris amestec tampon, la pH 7,5 și apoi este centrifugat ca în faza 1. Supernatantul se colectează și se amestecă sub agitare, timp de o oră, cu rezina Dowex 1-X4, la 20-50 mesh, sub formă de clorură (la 0,066% volum total de amestec înmulțit, diluat). Acest amestec se toarnă apoi pe coloană și se colectează eluantul. Îndepărtarea sarcosinei este stabilită prin HPLC.	25
7. <i>Precipitarea acidă</i> . Eluantul din faza precedentă se colectează și pH-ul este ajustat la valoarea 5,5 și se incubează timp de 30 min la temperatura camerei. Acest amestec se centrifughează ca în faza 1.	29
8. <i>Cromatografia pe schimbători cationici</i> . Valoarea pH-ului supernatantului din faza precedentă, se ajustează la 4,2 și supernatantul se aduce pe Sepharoză CM cu flux rapid (CM Sepharose Fast Flow). Se utilizează gradient de douăzeci de volume, pe coloană, la 20 mM NaOAc, la pH 4,2 și Na Cl de la 0 M la 1,0 M.	31
9. <i>Cromatografia HIC</i> . Frațiunile de vârf unite de pe Sepharoza CM (stabilite prin analiza în radiații ultraviolete) din faza anterioară, se ajustează cu 0,2 M sulfat de amoniu. Gradientul de 20 volume sare al coloanei în fază inversă obținut la 5 mM NaOAc, la pH 4,2 cu 0,4 și până la 0 M sulfat de amoniu. Acest material este apoi concentrat și diafiltrat în PBS.	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

RO 121036 B1

Rezultate. În tabelul 8 de mai jos, sunt prezentate diferențele procentuale (%) de greutate de referință, la șoarecii C57B16J (în vârstă de 8 săptămâni).

Tabelul 8

Pierdere în greutate după infuzie continuă

Timp (zile)	Vehicul (PBS)	Polipectida ob recombinantă
Zilele 1-2	3,24±1,13	1,68±1,4
Zilele 3-4	4,3±97	-2,12±79
Zilele 5-6	4,64±96	-4,62±1,3

Așa cum se observă, la finalul regimului de infuzare continuă timp de 6 zile, animalele care au primit polipectida ob au pierdut peste 4% din greutatea corporală, comparativ cu greutatea de referință. Aceasta este o pierdere substanțială în greutate, mult mai rapidă decât în cazul utilizării injectării intraperitoneale (i.p.). Pierdere în greutate de numai 2,6-3,0%, a fost observată la finalul perioadei de injectare în cea de-a 32-a zi, la șoarecele de tip salbatic (normal), cu injectarea zilnică intraperitoneală (i.p.) a polipectidei ob murine recombinante la 10 mg/kg doză și această pierdere în greutate n-a fost mai mare decât 4% în oricare timp de dozare, conform schemei (datele nu sunt prezentate). Datele prezente au indicat că prin infuzarea continuă, la un dozaj mai mic de 20 de ori (0,5 mg/kg față de 10 mg/kg) se obține o pierdere în greutate mai mare, într-un timp mai scurt. Rezultatele obținute sunt prezentate cu o semnificație statistică de exemplu -4,62% cu $p < 0,0001$.

Exemplul 14. Clonarea și exprimarea analogului polipectidei ob umane, recombinante

Acest exemplu prevede compozițiile și metodele pentru prepararea unui analog al polipectidei ob în versiune umană recombinantă.

Versiunea umana ADN ob a fost construită din ADN ob murin, ca în exemplul 13 de mai sus, prin înlocuirea regiunii între porțiunile MluI și BamHI, cu duplexul ADN (format din oligonucleotide sintetice), în care au fost desemnate 20 de codoni substituiți. Codonul pentru arginină din poziția 35 la șoarecele matur și leucina din poziția 74 la șoarecele matur, au fost neschimbate. Porțiunea MluI este arătată sub linia solidă în secvența următoare. Acest ADN a fost așezat în vectorul pCFM1656 (ATCC Accession Nr.69576) în același mod ca pentru proteina murinică recombinantă, așa cum s-a descris mai sus.

Secvența DNA (dublu răsucit) ob met umana recombinantă și secvența de aminoacid (SEQ ID Nr.96 și 97)

RO 121036 B1

	CATATGGTACCGATCCAGAAAGTTTCAGGACGACACC	AAAACCTTAATTAAACGATCGTT	1
1	-----+-----+-----+-----+-----+	60	
	GTATACCATGGCTAGGCTCTTCAAGTCTCTGCTGTGGTTTTGGAATTAATTTTGCTAGCAA		
	M V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V -		
	ACGCGTATCAACGACATCAGTTCACACCCAGTCGGTGAGCTCTAAACAGCGTGTTACAGGC		
61	-----+-----+-----+-----+-----+	120	
	TGCGCATAGTTGCTGTAGTCAGTGTGGGTGAGCACTCGAGATTTGTGCGACAATGTCCG		
	T R I N D I S H T Q S V S S K Q R V T G -		
	CTGGACTTCATCCGGGTCTGACCCGATCCTGACCTTGTCCTCAAAATGGACCAGACCCTG		
121	-----+-----+-----+-----+-----+	180	
	GACCTGAAGTAGGGCCAGACGTGGGCTAGGACTGGAACAGGTTTTACCTGGTCTGGGAC		
	L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L -		
	GCTGTATACCAGCAGATCTTAACCTCCATGCCGTCCTGTAACGTTCTTCAGATCTCTAAC		
181	-----+-----+-----+-----+-----+	240	
	CGACATATGGTCTGTAGAATTGGAGGTACGGCAGGGCATTGCAAGAAGTCTAGAGATTG		
	A V Y Q Q I L T S M P S R N V L Q I S N -		
	GACCTCGAAGACCTTCGCGACCTGCTGCACGTGCTGGCATTCTCCAATCCTGCCACCTG		
241	-----+-----+-----+-----+-----+	300	
	CTGGAGCTCTTGGGAAGCGCTGGACGACGTGCACGACCGTAAGAGGTTTTAGGACGGTGGAC		
	D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L -		
	CCATGGGCTTCAGGCTCTGAGACTCTGGACTCTCTGGGCGGGGTCTTGGGAAGCATCCGGT		
301	-----+-----+-----+-----+-----+	360	
	GGTACCCGAAGTCCAGAAGTCTGAGACCTGAGAGACCGCCCCAGGACCTTCGTAGGCCA		
	P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G -		
	TACAGCACCGAAGTTGTTGCTCTGTCCCGTCTGCAGGGTTCCCTTCAGGACATGCTTTGG		
361	-----+-----+-----+-----+-----+	420	
	ATGTCGTGGCTTCAACAACGAGACAGGGCAGACGTCCCAAGGGAAGTCTGTACGAAACC		
	Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D N L W -		
	CAGCTGGACCTGTCTCCGGGTTGTTAATGGATCC		
421	-----+-----+-----+-----+	454	
	GTCGACCTGGACAGAGGCCCAACAATTACCTAGG		
	Q L D L S P G C *		

Fermentația. Fermentația celulelor gazdă de mai sus pentru a produce polipeptida 33
ob umană recombinantă s-a realizat utilizând condițiile și compozițiile descrise mai sus,
 pentru materialul murinic recombinant. Aceste rezultate au fost analizate pentru randament 35
 (grame/litru), pre-purificarea materiei *ob* umane recombinante (și cantități minore de proteina
 bacteriană) și au fost corelate cu analiza de exprimare bacteriană: 37

Analiza exprimării polipeptidei ob umane

Timp	OD (@ 600 nm)	Randoment (gram/litru)	Exprimare (mg/CD-L)
Ind. + 2 ore	47	1,91	41
Ind. + 4 ore	79	9,48	120
Ind. + 6 ore	95	13,01	137
Ind. + 8 ore	94	13,24	141
Ind. + 10 ore	98	14,65	149

abrevieri: Ind. + - ore, reprezintă orele după inducția exprimării proteinei, așa cum s-a descris în exemplul 13, pentru materialul murinic recombinant, utilizând pCFM 1656.

O.D.: densitate optică, care s-a măsurat prin spectrofotometrie, ca miligrame per O.D. unități pe litru.

mg/ O.D.-L : exprimarea în termeni de miligrame proteină per unitate O.D., per litru.

Purificarea polipeptidei ob umane, recombinante. Proteina umană recombinantă, poate fi purificată utilizând metode similare cu cele utilizate pentru purificarea proteinei murinice combinate, ca în exemplul 13 de mai sus. Pentru prepararea polipeptidei ob umane recombinante, faza 8 s-a efectuat prin ajustarea pH-ului în supernatantul din faza 7, la valoarea de 5,0 și încărcarea acestui supernatant pe o coloană de Sepharoză cu debit rapid CM. Gradientul de sare în 20 de volume pe coloană, s-a realizat la 20 mM NaOAc, la pH 5,5, 0M la 0,5 M NaCl. Faza 9 a fost realizată prin diluarea cu apă de patru ori a fracțiunilor comasate pe CM Sepharoză și ajustarea la pH 7,5. Acest amestec a fost adus la 0,7 M sulfat de amoniu. Gradientul de sare, ca 20 de volume pe coloana în fază inversă, s-a adus la 5 mM NaOAc, la pH 5,5, 0,2 M până la 0 M sulfat de amoniu. De altfel, fazele de mai sus sunt identice.

Exemplul 15. Studiile de răspuns la doză

Un studiu adițional a demonstrat că răspunsul la doză există în cazul administrării continue a proteinei ob. În acest studiu, s-au utilizat șoareci de tip sălbatic (neobezi, de tip CD-1, cântărind de la 35, la 40 g), cărora li s-a administrat proteina ob murină recombinantă, utilizând metode similare cu cele din exemplul 12 și exemplul 13. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul mai jos (cu procente de pierdere în greutate, comparative cu greutatea de referință, măsurată mai sus):

Tabelul 10

Răspunsul la doză cu administrare continuă

Doza	Timpul	Reducere în greutate corporală
0,03 mg/kg/zi	Ziua 2	3,5%
1 mg/kg/zi	Ziua 2	7,5%
1 mg/kg/zi	Ziua 4	14%

Așa cum se poate vedea, creșterea dozei de la 0,03 mg/kg/zi până la 1 mg/kg/zi, duce la pierderea în greutate de la 3,5 % până la 7,5%. Este, de asemenea, important de notat că, la ziua 14, la o doză de 1 mg/kg/zi are ca rezultat o reducere a greutatei corporale cu 14%.

Exemplul 16. Efectele leptinei asupra compoziției organismului la șoarecele ob/ob

Șoarecii de tip C57B1/6 J ob/ob de 16 săptămâni se tratează cu 5 μg/g/zi de leptină și purtător, sau nu primesc nici un tratament, timp de 33 de zile. În al doilea experiment, șoarecii ob/ob în vârstă de 7 săptămâni, sunt tratați cu 10 μg/g/zi de leptină umană, leptina

RO 121036 B1

murinică sau purtător, timp de 12 zile. Șoarecii sunt sacrificați și se evaluează apoi greutatea corporală totală, compoziția organismului, nivelele de insulină și nivelele de glucoză. Datele obținute în aceste experimente, sunt prezentate în tabelul 11.

Compozițiile organismului din aceste date, demonstrează efectul leptinei asupra celor trei compartimente ale organismului: masa de țesut gras, masa organismului slab și masa de apă. Aceste date arată ca leptina scade semnificativ masa grasă a organismului și are un efect marginal asupra masei corporale slabe. Cu toate acestea, efectele asupra masei corporale slabe n-au fost statistic, semnificative. Compararea insulinei și a nivelului de glucoză la șoarecii tratați cu leptină și a celor martori (netratați) arată că leptina reduce zahărul din sânge și nivelul insulinei și astfel ameliorează aceste indicii ale diabetului.

Exemplul 17. *Efectele dozelor ridicate de Leptină asupra șoarecelui de tip sălbatic*

Șoarecii slabi martor pentru cei *ob/ob* (C57 Bl/6J +/?) care sunt injectați o dată pe zi intraperitoneal (i.p.) cu 10 μg/g de leptină murinică sau vehicul (PBS) și greutatea corporală, precum și consumul de hrană se măsoară peste două săptămâni. Se observă o scădere semnificativă a greutății corporale începând cu ziua a 4-a și o scădere semnificativă a consumului de hrană, pentru prima săptămână.

RO 121036 B1

Tabelul 11

1

Greutatea corporală, compoziția, nivelele de insulină și glucoza la șoarecii tratați

Grupa de tratament	Șoareci de 16 săpt. Leptină 5μg/g/zi				Șoareci de 7 săptămâni Leptină 10 μg/g/zi		
	Leptină murinică	Purtător	Martor		Leptină umană	Leptină murină	Purtător
Tratament							
Gr. corp. totală	31,90±2,8	64,10±4,5	67,50±6,2		31,00±1,3	33,40±2,4	42,70±1,5
Grăsimi	9,10 ± 1,7	38,30 ± 4,0	40,87 ± 6,1				
Total (g)%	28,40 ± 3,4	59,70 ± 2,1	60,34 ± 3,7				
Masa slabă	5,80 ± 1,0	7,60 ± 0,4	7,73 ± 0,5				
Total (g)%	21,30 ± 1,7	11,90 ± 1,2	11,57 ± 1,6				
Apă	16,00 ± 0,8	18,20 ± 0,7	18,90 ± 1,0				
Total 8g)%	50,30 ± 4,2	28,40 ± 1,0	28,10 ± 2,2				
Insulină (UIU/ml)	< 2,0	< 2,0	< 2,0		< 2,0	< 2,0	21,4
Glucoză (mg/dl)	170,0 ± 20,9	337 ± 30,3	317,5 ± 51,0		258,3 ± 26,8	320,0 ± 44,0	789,0 ± 152,1

3

5

7

9

11

13

15

RO 121036 B1

Cu toate acestea, după o săptămână, nivelele de consum de hrană devin apropiate pentru ambele grupe de șoareci. Animalele au fost sacrificate la sfârșitul celei de a doua săptămâni și apoi s-a determinat compoziția organismului. Rezultatele analizei compoziției organismului sunt prezentate în tabelul 12. Datele arată scăderea grăsimilor organismului la animalele care au primit leptină față de cele care au primit PBS.	1 3 5
Un al doilea experiment arată efectele injecțiilor administrate intraperitoneal i.p. de două ori pe zi, cu câte 12,5 μg/g de leptină murinică, la șoarecii de tip sălbatic C57B1/6 J. Se observă o scădere semnificativă a greutății corporale și consumului de hrană asociate cu injectarea de două ori pe zi a polipeptidei. Pentru acest experiment, animalele sunt plasate în camere metabolice. Hrana constă în dieta de hrană sub formă de pulvere Purina * 5001. Această dietă din experimentele precedente a utilizat hrana formată din tapioca și apă. Astfel, hrana utilizată în camerele metabolice are un conținut caloric mai ridicat, care explică de ce cantitatea de hrană consumată diferă de cea a altor animale cu dietă conținând apă.	7 9 11 13
Lista de mai jos prezintă referințele din discuțiile menționate mai înainte și în special referințele privind procedeele experimentale și discuțiile.	15
Bahary și colab., <i>Genomics</i> , 11: 33 - 47 (1991).	
Bahary și colab., <i>Genomics</i> , 13 : 761- 769 (1992).	17
Bahary și colab. <i>Molecular mapping of mouse chromosomes 4 and 6: Use of a flow-sorted Robertsonian chromosome</i> (1991).	19
Blank și colab., <i>Mammalian Genome</i> , 1: s51-s78 (1991).	
Bogardus și colab., <i>Annals of the New York Academy of Sciences</i> , 630: 100-115 (1991).	21
Friedman și colab., <i>Mammalian Genome</i> , 1: 130-144 (1991). Harris, Harris, <i>FASEBJ</i> .4: 3310-3318(1990). Jacobowitz și colab. <i>N. Engl. J. Med.</i> 315:96 -100 (1986). Kessey, in <i>Obesity</i> , pp. 144-166, Stunkard ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co. (1980) .	23
Kessey și colab., <i>Ann. Rev. Psychol.</i> 37 :109-133.22 (1986).	25
Liebel și colab., "Genetic variation and nutrition in obesity", "Approaches to the molecular genetics of obesity", in <i>Genetic Variation and Nutrition</i> , pp.90-101.1, Simopoulos and Childs eds. S.Karger, Basel (1990). Siegel și colab., <i>Cytogenet. Cell Genet.</i> , 61(3): 184 -185 (1992).	27 29

RO 121036 B1

Tabelul 12

Compoziția și greutatea corporală a șoarecelui de tip sălabatic (+/?)

Grupa	C57B1/6J	Gr. corp.	Grăsime	Totală %	Masa totală a org. slb. %		Apă Total %	
Proteina	1	17,3	0,30	1,71%	5,00	28,93%	12,00	69,36%
	2	20,5	2,39	11,65%	5,41	26,40%	12,70	61,95%
	3	16,9	0,34	1,99%	4,76	28,19%	11,80	69,82%
	4	18,3	0,84	4,62%	5,16	28,17%	12,30	67,21%
	5	17,7	0,44	2,51%	4,96	28,00%	12,30	69,49%
	6	18,7	2,56	13,72%	4,84	25,86%	11,30	60,43%
	7	15,7	0,37	2,38%	4,53	28,83%	10,80	68,79%
	8	16,4	0,29	1,79%	4,51	27,48%	11,60	70,73%
	9	16,5	0,83	5,05%	4,67	28,29%	11,00	66,67%
	10	14,9					10,40	69,80%
Vehicul	Medie Standard-Dev.	17,3 1,6	0,93 0,90	5,04% 4,52%	4,87 0,30	27,79% 1,05%	11,62 0,74	67,43% 3,52%
	11	18,8	1,30	6,93%	5,00	26,58%	12,50	66,49%
	12	17,6	2,17	12,34%	4,53	25,73%	10,90	61,93%
	13	18,0	2,29	12,74%	4,61	25,59%	11,10	61,67%
	14	19,6	3,79	19,34%	4,61	23,52%	11,20	57,14%
	15	18,6	2,35	12,65%	4,75	25,52%	11,50	61,83%
	16	17,3	1,96	11,32%	4,54	26,25%	10,80	62,43%
	17	19,3	1,38	7,12%	5,02	26,04%	12,90	66,84%
	18	20,6	4,16	20,19%	4,94	23,98%	11,50	55,83%
	19	17,7	1,08	6,13%	4,72	26,64%	11,90	67,23%
	20	19,5					12,30	63,08%
	Medie Standard Dev.	18,7 1,1	2,28 1,07	12,09% 5,08%	4,75 0,20	25,54% 1,10%	11,66 0,72	62,45% 3,83%

RO 121036 B1

Prezenta invenție poate fi alcătuită din alte forme sau realizată prin alte metode, fără a se îndepărta de la scopul sau caracteristicile ei esențiale. De aceea, prezenta descriere este considerată în toate aspectele ilustrative și nerestrictive, scopul invenției fiind indicat prin revendicările anexate și toate modificările care se referă la semnificația și gradul de echivalența sunt cuprinse în prezenta invenție.

Diferitele referințe sunt citate în tot cuprinsul descrierii, fiecare dintre acestea fiind încorporate aici în totalitate. Așa cum se arată în revendicări, invenția este în conformitate cu descrierea, referințele și materialele inițiale. Cu toate acestea, solicitanții au făcut în 9 august 1995, următoarele depozite la American Type Culture Collection 12301, Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852-1178, U.S.A., în conformitate cu tratatul de la Budapesta privind Recunoașterea Internațională a Depozitelor de Microorganisme pentru brevetarea microorganismelor și al procedeeleor: *Escherichia coli* H14 harboring plasmid pETH14, accession Nr. 69880 și *Escherichia coli* M9 harboring plasmid pETM9, accession Nr. 69879.

RO 121036 B1

LISTA SECVENȚELOR

(1) INFORMAȚIE GENERALĂ :

(i) Aplicant: Universitatea Rockefeller

(ii) Titlul invenției: polipeptidă ob și derivați imunogeni ai acesteia, molecule adn, procedeu de preparare, compoziție farmaceutică și utilizarea acesteia .

(iii) Numărul secvențelor: 99

(iv) Adresa pentru corespondență:

(A) Adresant : Klauber & Jackson

(B) Strada : 411 Kackensack Avenue

(C) Orașul: Hackensack

(D) Statul : New Jersey

(E) Țara : USA

(F) Cod: 07601

(v) Forma citibilă a computerului:

(A) Tip mediu: disc moale

(B) Computer: PC compatibil IBM

(C) Sistem de operare : PC-DOS/MS -DOS

(D) Software: patent in release # versiunea 1,0, # 1,25

(vii) Datele ale cererii curente:

(A) Numărul cererii:

(B) Data completării:

(C) Calsificare:

(vii) Datele ale cererii precedente:

(A) Numărul cererii: 08/483.211

(B) Data completării: 7 iunie 1995

(C) Calsificare:

(vii) Datele ale cererii precedente:

(A) Numărul cererii: 08/483.431

(B) Data completării: 10 mai 1995

(C) Calsificare:

(vii) Datele ale cererii precedente:

(A) Numărul cererii: 08/347.563

(B) Data completării: 30 noiembrie 1994

(C) Calsificare:

(vii) Datele ale cererii precedente:

(A) Numărul cererii: 08/292.345

(B) Data completării: 17 august 1994

(C) Calsificare:

(viii) Informație de împuternicire/agent:

(A) Numele: Jackson Esq., David A.

(B) Numărul de înregistrare: 26,742

(C) Numărul de referință/evidență: 600-1-+87 PCT

(ix) Informație de telecomunicație:

(A) Telefon: 201 487-5800

(B) Telefax: 201 343-1684

(C) Telex: 133521

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 1:

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 2793 perechi de baze

(B) Tipul: acid nucleic

(C) Tip de răsucire: dublă

RO 121036 B1

(ii) Tipul de moleculă: ADN (genomic)	1
(A) Descriere: ADNc ob murinic	
(iii) Ipotetic: nu	3
(iv) Antisens: nu	
(vi) Sursa originală:	5
(A) Organismul: murine	
(xi) Caracteristica:	7
(A) Nume/cheie: CDS	
(B) Localizare: 57...560	9
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 1	
GGATCCCTGC TCCAGCAGCT GCAAGGTGCA AGAAGAAGAA GATCCCAGGG AGGAAA	56
ATG TGC TGG AGA CCC CTG TGT CGG TTC CTG TGG CTT TGG TCC TAT CTG	104
Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu	15
1 5 10 15	15
TCT TAT GTT CAA GCA GTG CCT ATC CAG AAA GTC CAG GAT GAC ACC AAA	152
Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys	17
20 25 30	17
ACC CTC ATC AAG ACC ATT GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG	200
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr	21
35 40 45	21
CAG TCG GTA TCC GCC AAG CAG AGG GTC ACT GGC TTG GAC TTC ATT CCT	248
Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro	23
50 55 60	23
GGG CTT CAC CCC ATT CTG AGT TTG TCC AAG ATG GAC CAG ACT CTG GCA	296
Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala	27
65 70 75 80	27
GTC TAT CAA CAG GTC CTC ACC AGC CTG CCT TCC CAA AAT GTG CTG CAG	344
Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln	31
85 90 95	31
ATA GCC AAT GAC CTG GAG AAT CTC CGA GAC CTC CTC CAT CTG CTG GCC	392
Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala	33
100 105 110	33
TTC TCC AAG AGC TGC TCC CTG CCT CAG ACC AGT GGC CTG CAG AAG CCA	440
Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro	37
115 120 125	37
GAG AGC CTG GAT GGC GTC CTG GAA GCC TCA CTC TAC TCC ACA GAG GTG	488
Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val	39
130 135 140	39
GTG GCT TTG AGC AGG CTG CAG GGC TCT CTG CAG GAC ATT CTT CAA CAG	536
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln	43
145 150 155 160	43
TTG GAT GTT AGC CCT GAA TGC TGA AGTTTCAAAG GCCACCAGGC TCCCAAGA	588
Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys *	45
165	47

RO 121036 B1

1	ATCATGTAGA GGAAGAAAC CTGGCTTCC AGGGGTCTTC AGGAGAAGAG AGCCATGTGC	648
3	ACACATCCAT CATTCAATTC TCTCCCTCCT GTAGACCACC CATCCAAAGG CATGACTCCA	708
5	CAATGCTTGA CTCAAGTTAT CCACACAAC TCAATGAGCAC AAGGAGGGGC CAGCCTGCAG	768
7	AGGGGACTCT CACCTAGTTC TTCAGCAAGT AGAGATAAGA GCCATCCCAT CCCCTCCATG	828
9	TCCCACCTGC TCCGGGTACA TGTTCCTCCG TGGGTACACG CTTGCTGCG GCCCAGGAGA	888
11	GGTGAGGTAG GGATGGGTAG AGCCTTTGGG CTGTCTCAGA GTCTTTGGGA GCACCGTGAA	948
13	GGCTGCATCC ACACACAGCT GGAAACTCCC AAGCAGCACA CGATGGAAGC ACTTATTTAT	1008
15	TTATTCTGCA TTCTATTTTG GATGGATCTG AAGCAAGGCA TCAGCTTTTT CAGGCTTTGG	1068
17	GGGTCAGCCA GGATGAGGAA GGCTCCTGGG GTGCTGCTTT CAATCCTATT GATGGGTCTG	1128
19	CCCGAGGCAA ACCTAATTTT TGAGTGACTG GAAGGAAGGT TGGGATCTTC CAAACAAGAG	1188
21	TCTATGCAGG TAGCGCTCAA GATTGACCTC TGGTGACTGG TTTTGTCTCT ATTGTGACTG	1248
23	ACTCTATCCA AACACGTTTG CAGCGGCATT GCCGGGAGCA TAGGCTAGGT TATTATCAAA	1308
25	AGCAGATGAA TTTTGTCAAG TGTAAATATG ATCTATGTGC ACCTGAGGGT AGAGGATGTG	1368
27	TTAGAGGGAG GGTGAAGGAT CCGGAAGTGT TCTCTGAATT ACATATGTGT GGTAGGCTTT	1428
29	TCTGAAAGGG TGAGGCATTT TCTTACCTCT GTGCCACAT AGTGTGGCTT TGTGAAAAGG	1488
31	ACAAAGGAGT TGAATCTTTC CGGAACATTT GGAGTGTACC AGGCACCCTT GGAGGGGCTA	1548
33	AAGCTACAGG CCTTTTGTG GCATATTGCT GAGCTCAGGG AGTGAGGGCC CCACATTTGA	1608
35	GACAGTGAGC CCCAAGAAAA GGGTCCCTGG TGTAGATCTC CAAGGTTGTC CAGGGTTGAT	1668
37	CTCACAATGC GTTCTTAAG CAGGTAGACG TTTGCATGCC AATATGTGGT TCTCATCTGA	1728
39	TTGGTTCATC CAAAGTAGAA CCCTGTCTCC CACCCATTCT GTGGGGAGTT TTGTTCCAGT	1788
41	GGGAATGAGA AATCACTTAG CAGATGGTCC TGAGCCCTGG GCCAGCACTG CTGAGGAAGT	1848
43	GCCAGGGCCC CAGGCCAGGC TGCCAGAAAT GCCCTTCGGG CTGGAGGATG AACAAAGGGG	1908
45	CTTGGGTTTT TCCATCACCC CTGCACCCTA TGTCACCATC AAAGTGGGGG GCAGATCAGT	1968
47	GAGAGGACAC TTGATGGAAA GCAATACACT TTAAGACTGA GCACAGTTTC GTGCTCAGCT	2028

RO 121036 B1

CTGTCTGGTG CTGTGAGCTA GAGAAGCTCA CCACATACAT ATAAAAATCA GAGGCTCATG	2088	1
TCCCTGTGGT TAGACCCCTAC TCGCGGCGGT GTACTCCACC ACAGCAGCAC CGCACCCTG	2148	3
GAAGTACAGT GCTGTCTTCA ACAGGTGTGA AAGAACCTGA GCTGAGGGTG ACAGTGCCCA	2208	5
GGGGAACCCCT GCTTGCAGTC TATTGCATTT ACATACCGCA TTTCAGGGCA CATTAGCATC	2268	7
CACTCCTATG GTAGCACACT GTTGACAATA GGACAAGGGA TAGGGGTGA CTATCCCTTA	2328	9
TCCAAAATGC TTGGGACTAG AAGAGTTTTG GATTTTAGAG TCTTTTCAGG CATAGGTATA	2388	11
TTTGAGTATA TATAAAATGA GATATCTTGG GGATGGGGCC CAAGTATAAA CATGAAGTTC	2448	13
ATTTATATTT CATAATACCG TATAGACACT GCTTGAAGTG TAGTTTTATA CAGTGTITTA	2508	15
AATAACGTTG TATGCATGAA AGACGTTTTT ACAGCATGAA CCTGTCTACT CATGCCAGCA	2568	17
CTCAAAAACC TTGGGGTTTTT GGAGCAGTTT GGATCTTGGG TTTTCTGTTA AGAGATGGTT	2628	19
AGCTTATACC TAAAACCATA ATGGCAAACA GGCTGCAGGA CCAGACTGGA TCCTCAGCCC	2688	21
TGAAGTGTGC CCTTCCAGCC AGGTCATACC CTGTGGAGGT GAGCGGGATC AGGTTTTGTG	2748	23
GTGCTAAGAG AGGAGTTGGA GGTAGATTTT GGAGGATCTG AGGGC	2793	25
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 2:		27
(i) Caracteristicile secvenței:		29
(A) Lungime: 168 aminoacizi		31
(B) Tipul: amino acid		33
(C) Topologie: lineară		35
(ii) Tipul de moleculă: proteină		37
(A) Descriere: polipeptidă ob murinică		39
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 2		41
Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala		43
65 70 75 80		45
Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln		47
85 90 95		49
Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala		51
100 105 110		53
Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro		55
115 120 125		57
Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val		59
130 135 140		61
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln		63
145 150 155 160		65
Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys *		67
165		69

RO 121036 B1

1	(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 3:	
	(i) Caracteristicile secvenței:	
3	(A) Lungime: 700 perechi de baze	
	(B) Tipul: acid nucleic	
5	(C) Tip de răsucire: dublă	
	(ii) Tipul de moleculă: ADNc	
7	(A) Descriere: ADNc ob uman, în care N reprezintă orice nucleotidă	
	(iii) Ipotetic: Nu	
9	(iv) Antisens: Nu	
	(vi) Sursa originală:	
11	(A) Organismul: uman	
	(xi) Caracteristica:	
13	(A) Nume/cheie: CDS	
	(B) Localizare: 46...546	
15	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 3	
17	NNNGNNGTG CAAGGCCCAA GAAGCCCAAN NTCCTGGGAA GGAAA ATG CAT TGG	54
	Met His Trp	
19	1	
21	GGA ACC CTG TGC GGA TTC TTG TGG CTT TGG CCC TAT CTT TTC TAT GTC	102
	Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu Phe Tyr Val	
23	5 10 15	
25	CAA GCT GTG CCC ATC CAA AAA GTC CAA GAT GAC ACC AAA ACC CTC ATC	150
	Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile	
27	20 25 30 35	
29	AAG ACA ATT GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG CAG TCA GTC	198
	Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val	
31	40 45 50	
33	TCC TCC AAA CAG AAA GTC ACC GGT TTG GAC TTC ATT CCT GGG CTC CAC	246
	Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His	
	55 60 65	
35	CCC ATC CTG ACC TTA TCC AAG ATG GAC CAG ACA CTG GCA GTC TAC CAA	294
	Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln	
37	70 75 80	
39	CAG ATC CTC ACC AGT ATG CCT TCC AGA AAC GTG ATC CAA ATA TCC AAC	342
	Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn	
41	85 90 95	
43	GAC CTG GAG AAC CTC CGG GAT CTT CTT CAC GTG CTG GCC TTC TCT AAG	390
	Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys	
	100 105 110 115	
45	AGC TGC CAC TTG CCC TGG GCC AGT GGC CTG GAG ACC TTG GAC AGC CTG	438
	Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu	
47	120 125 130	
49	GGG GGT GTC CTG GAA GCT TCA GGC TAC TCC ACA GAG GTG GTG GCC CTG	486
	Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu	
51	135 140 145	
53	AGC AGG CTG CAG GGG TCT CTG CAG GAC ATG CTG TGG CAG CTG GAC CTC	534
	Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu	
55	150 155 160	
57	AGC CCT GGG TGC TGAGGCCTT GAAGGTCACCT CTTCTGCAA GGACTNACGT	585
	Ser Pro Gly Cys	
	165	

RO 121036 B1

TAAGGGAAGG AACTCTGGTT TCCAGGTATC TCCAGGATTG AAGAGCATTG CATGGACACC 645 1
CCTTATCCAG GACTCTGTCA ATTTCCCTGA CTCCTCTAAG CCACTCTTCC AAAGG 700 3

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 4: 5

(i) Caracteristicile secvenței: 7

(A) Lungime: 167 aminoacizi 7

(B) Tipul: amino acid 9

(C) Topologie: lineară 9

(ii) Tipul de moleculă: proteină 11

(A) Descriere: polipeptidă ob umană 11

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 4 13

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu 13
1 5 10 15 15

Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys 17
20 25 30 17

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr 19
35 40 45 19

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro 21
50 55 60 21

Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala 23
65 70 75 80 23

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln 25
85 90 95 25

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala 27
100 105 110 27

Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu 29
115 120 125 29

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val 31
130 135 140 31

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln 33
145 150 155 160 33

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys 35
165 35

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 5: 43

(i) Caracteristicile secvenței: 45

(A) Lungime: 166 aminoacizi 45

(B) Tipul: amino acid 47

(C) Topologie: lineară 47

RO 121036 B1

1 (ii) Tipul de moleculă: proteină
 (A) Descriere: polipeptidă *ob* umană, din care lipsește Gln la poziția 49

3 (vi) Sursa originară:
 (A) Organismul: murină

5 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

27 Asp Leu Ser Pro Gly Cys
 165

35 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 6:

37 (i) Caracteristicile secvenței:
 (A) Lungime: 167 aminoacizi
 (B) Tipul: amino acid
 (C) Topologie: lineară

39 (ii) Tipul de moleculă: proteină

41 (A) Descriere: polipeptidă *ob* umană, din care lipsește Gln la poziția 49

43 (vi) Sursa originară:
 (A) Organismul: murină

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 6

RO 121036 B1

Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu	1
1 5 10 15	3
Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys	5
20 25 30	7
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr	9
35 40 45	11
Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly	13
50 55 60	15
Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val	17
65 70 75 80	19
Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile	21
85 90 95	23
Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe	25
100 105 110	27
Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu	29
115 120 125	31
Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val	33
130 135 140	35
Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu	37
145 150 155 160	39
Asp Val Ser Pro Glu Cys	41
165	43

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 7:

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 175 perechi de baze

(B) Tipul: acid nucleic

(C) Tip de răsucire: dublă

(D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: ADN (genomic)

(A) Descriere: exonul 2G7

(iii) Ipoteză: Nu

(iv) Antisens: Nu

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 7:

GTGCAAGAAG AAGAAGATCC CAGGGCAGGA AAATGTGCTG GAGACCCCTG TGTCGGGTCC	60	41
NGTGGNTTTG GTCCTATCTG TCTTATGTTC AAGCAGTGCC TATCCAGAAA GTCCAGGATG	120	43
ACACCAAAAG CCTCATCAAG ACCATTGTCA NCAGGATCAC TGANATTTCA CACACG	175	45

RO 121036 B1

- 1 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 8:
(i) Caracteristicile secvenței:
3 (A) Lungime: 18 perechi de baze
(B) Tipul: acid nucleic
5 (C) Tip de răsucire: simplă
(D) Topologie: lineară
7 (ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
(A) Primerul PCR 5' pentru exonul 2G7
9 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
11 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 8:

CCAGGGCAGG AAAATGTG

18

- 13 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 9:
(i) Caracteristicile secvenței:
15 (A) Lungime: 22 perechi de baze
17 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
19 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
21 (A) Primerul PCR 3' pentru exonul 2G7
(iii) Ipotetic: Nu
23 (iv) Antisens: Nu
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 9:

CATCCTGGAC TTTCCTGGATA GG

22

- 27 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 10:
(i) Caracteristicile secvenței:
29 (A) Lungime: 23 aminoacizi
(B) Tipul: amino acid
31 (C) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: proteină
33 (A) Descriere: peptidă semnal, putative, cu N terminal
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 10

Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu

1

5

10

15

Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro

20

- 41 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 11
(i) Caracteristicile secvenței:
43 (A) Lungime: 287 perechi de baze
(B) Tipul: acid nucleic
45 (C) Tip de răsucire: dublă
(D) Topologie: circulară
47 (ii) Tipul de moleculă: ADN (plasmid)
(A) Descriere: vector de exprimare pET-15b

RO 121036 B1

(iii) Ipotetic: Nu	1	
(iv) Antisens: Nu		
(ix) Caracteristică:	3	
(A) Nume/cheie: promotor T7		
(B) Localizare: 20...37	5	
(ix) Caracteristică:		
(A) Nume/cheie: operon lac	7	
(B) Localizare: 39...64		
(ix) Caracteristică:	9	
(A) Nume/cheie: CDS		
(B) Localizare: 108...243	11	
(ix) Caracteristică:		
(A) Nume/cheie: His-Tag	13	
(B) Localizare: 123...137		
(ix) Caracteristică:	15	
(A) Nume/cheie: porțiunea de clivaj a trombinei		
(B) Localizare: 184...196	17	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 11:		
AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG CGGATAACAA	60	19
TTCCCTCTA CAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACC ATG GGC AGC	116	21
Met Gly Ser		
1		23
AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC	164	
Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser		25
5 10 15		
CAT ATG CTC GAG GAT CCC GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG	212	27
His Met Leu Glu Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys Glu Ala Glu		
20 25 30 35		29
TTG GCT GCT GCC ACC GCT GAG CAA TAA CTA G CATAACCCCT TGGGGCCTCT	263	
Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln *		31
40		
AAACGGGTCT TGAGGGGTTT TTG	287	33
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 12:	35	
(i) Caracteristicile secvenței:		
(A) Lungime: 45 aminoacizi	37	
(B) Tipul: amino acid		
(C) Topologie: lineară	39	
(ii) Tipul de moleculă: proteină		
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 12	41	

RO 121036 B1

1	TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC	32
3		
5	Arg Gly Ser His Met Leu Glu Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys	
7	20 30	
9	Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln	
11	35 40	
13	(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 13	
15	(i) Caracteristicile secvenței:	
17	(A) Lungime: 32 perechi de baze	
19	(B) Tipul: acid nucleic	
21	(C) Tip de răsucire: simplă	
23	(D) Topologie: lineară	
25	(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
27	(A) Descriere: primer 5' murinic	
29	(iii) Ipotetic: Nu	
31	(iv) Antisens: Nu	
33	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 13	
35	CTTATGTTC A TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC	32
37	(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 14	
39	(i) Caracteristicile secvenței:	
41	(A) Lungime: 32 perechi de baze	
43	(B) Tipul: acid nucleic	
45	(C) Tip de răsucire: simplă	
47	(D) Topologie: lineară	
49	(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
51	(A) Descriere: primer 3' murinic	
53	(iii) Ipotetic: Nu	
55	(iv) Antisens: Nu	
57	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 14	
59	TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC	32
61	(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 15	
63	(i) Caracteristicile secvenței:	
65	(A) Lungime: 32 perechi de baze	
67	(B) Tipul: acid nucleic	
69	(C) Tip de răsucire: simplă	
71	(D) Topologie: lineară	
73	(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
75	(A) Descriere: primer 3' murinic	
77	(iii) Ipotetic: Nu	
79	(iv) Antisens: Nu	
81	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 15	
83	TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC	32

RO 121036 B1

[illegible]

RO 121036 B1

1 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 19:

(i) Caracteristicile secvenței:

3 (A) Lungime: 16 aminoacizi

(B) Tipul: amino acid

5 (C) Topologie: necunoscută

(ii) Tipul de moleculă: peptidă

7 (A) Descriere: fragmentul peptidei ob

(v) Tipul de fragment: intern

9 (vi) Sursa de origine:

(A) Organism: murină

11 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 19

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

15

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 20:

17 (i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 19 aminoacizi

19 (B) Tipul: amino acid

(C) Topologie: necunoscută

21 (ii) Tipul de moleculă: peptidă

(A) Descriere: fragmentul peptidei ob

23 (v) Tipul de fragment: intern

(vi) Sursa de origine:

25 (A) Organism: murină

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 20

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

29

Ser Pro Glu Cys
20

31

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 21:

33 (i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 20 aminoacizi

35 (B) Tipul: amino acid

(C) Topologie: necunoscută

37 (ii) Tipul de moleculă: peptidă

(A) Descriere: fragmentul peptidei ob

39 (v) Tipul de fragment: carboxi terminal

(vi) Sursa de origine:

41 (A) Organism: murină

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 21

43

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

45

Ser Leu Asp

RO 121036 B1

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 22	1
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 414 perechi de baze	3
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: dublă	5
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (genomic)	7
(A) Descriere: porțiunea genei <i>ob</i> umane, incluzând secvența superioară necodificată a primului exon, secvența codificată a primului exon și regiunea 5' a primului exon.	9
(iii) Ipoteză: Nu	11
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	13
(A) Organism: uman	
(ix) Caracteristică:	15
(A) Nume/cheie: CDS	
(B) Localizare: 38...181	17
(ix) Caracteristică:	
(A) Nume/cheie: regiunea 5' a primului intron	19
(B) Localizare: 182...414	
(ix) Caracteristică:	21
(A) Nume/cheie: secvența 5' necodificată a genei umane <i>ob</i> , de la care este generat primerul ADN 1gF HOB	23
(B) Localizare: 11...28	
(ix) Caracteristică:	25
(A) Nume/cheie: secvența intronică a genei <i>ob</i> umane, din care este generat primerul 1gR HOB	27
(B) Localizare: 241...260	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 22	29
GGTTGCAAGG CCAAGAAGC CCATCCTGGG AAGGAAA ATG CAT TGG GGA ACC CTG	55
Met His Trp Gly Thr Leu	31
1 5	
TGC GGA TTC TTG TGG CTT TGG CCC TAT CTT TTC TAT GTC CAA GCT GTG	103
Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu Phe Tyr Val Gln Ala Val	33
10 15 20	35
CCC ATC CAA AAA GTC CAA GAT GAC ACC AAA ACC CTC ATC AAG ACA ATT	151
Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile	37
25 30 35	
GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG GTAAGGAGAG TATGCGGGGA	201
Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr	39
40 45	41
CAAAGTAGAA CTGCAGCCAG CCCAGCACTG GCTCCTAGTG GCACTGGACC CAGATAGTCC	261
AAGAACATT TATTGAACGC CTCCTGAATG CCAGGCACCT ACTGGAAGCT GAGAAGGATT	321
TTGGATAGCA CAGGGCTCCA CTCTTTCTGG TTGTTTCTTN TGGCCCCCTC TGCTTGCTGA	381
GATNCCAGGG GTTAGNGGTT CTTAATTCCT AAA	414
	47

RO 121036 B1

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 23:

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 48 aminoacizi

(B) Tipul: amino acid

(C) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: proteină

(A) Descriere: porțiunea N-terminală a proteinei ob umane, codificată prin primul exon.

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 23

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

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

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

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 24

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 801 perechi de baze

(B) Tipul: acid nucleic

(C) Tip de răsucire: dublă

(D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: ADN (genomic)

(A) Descriere: porțiunea genei ob umane, incluzând regiunea 3' a primului intron, secvența codificată a exonului secundar și secvența necodificată 3'.

(iii) Ipotetic: Nu

(iv) Antisens: Nu

(vi) Sursa de origine:

(A) Organism: uman

(ix) Caracteristică:

(A) Nume/cheie: CDS

(B) Localizare: 291...648

(ix) Caracteristică:

(A) Nume/cheie: 3' a primului intron

(B) Localizare: 1...290

(ix) Caracteristică:

(A) Nume/cheie: secvența intronică a genei umane HOB din care este generat primerul HOB 2gF

(B) Localizare: 250...269

(ix) Caracteristică:

(A) Nume/cheie: secvența necodificată 3' a genei murine, din care este generat primerul HOB 2gR ADN

(B) Localizare: 707...728

RO 121036 B1

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 24

CTGGTTCTTT CAGGAAGAGG CCATGTAAGA GAAAGGAATT GACCTAGGGA AAATTGGCCT	60	1
GGGAAGTGGG GGGAACGGAT GGTGTGGGAA AAGCAGGAAT CTCGGAGACC AGCTTAGAGG	120	3
CTTGGCAGTC ACCTGGGTGC AGGANACAAG GGCCTGAGCC AAAGTGGTGA GGGAGGGTGG	180	5
AAGGAGACAG CCCAGAGAAT GACCCTCCAT GCCCACGGGG AAGGCAGAGG GCTCTGAGAG	240	7
CGATTCTCTC CACATGCTGA GCACCTGTTT TCCCTCTTCC TCCTNCATAG CAG TCA	296	9
		Gln Ser
		1
GTC TCC TCC AAA CAG AAA GTC ACC GGT TTG GAC TTC ATT CCT GGG CTC	344	11
Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu		
5 10 15		13
CAC CCC ATC CTG ACC TTA TCC AAG ATG GAC CAG ACA CTG GCA GTC TAC	392	15
His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr		
20 25 30		17
CAA CAG ATC CTC ACC AGT ATG CCT TCC AGA AAC GTG ATC CAA ATA TCC	440	
Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser		
35 40 45 50		19
AAC GAC CTG GAG AAC CTC CGG GAT CTT CTT CAC GTG CTG GCC TTC TCT	488	21
Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser		
55 60 65		23
AAG AGC TGC CAC TTG CCC TGG GCC AGT GGC CTG GAG ACC TTG GAC AGC	536	
Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser		
70 75 80		25
CTG GGG GGT GTC CTG GAA GCT TCA GGC TAC TCC ACA GAG GTG GTG GCC	584	27
Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala		
85 90 95		29
CTG AGC AGG CTG CAG GGG TCT CTG CAG GAC ATG CTG TGG CAG CTG GAC	632	
Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp		
100 105 110		31
CTC AGC CCT GGG TGC T GAGGCCTTGA AGGTCACTCT TCCTGCAAGG ACTACGTTAA	688	33
Leu Ser Pro Gly Cys		
115		35
GGGAAGGAAC TCTGGCTTTC CAGGTATCTC CAGGATTGAA GAGCATTGCA TGGACACCCC	748	
TTATCCAGGA CTCTGTCAAT TTCCCTGACT CCTCTAAGCC ACTCTTCCAA AGG	801	37

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 25:

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 119 aminoacizi

(B) Tipul: amino acid

(C) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: proteină

(A) Descriere: porțiunea C-terminală a proteinei ob umane, codificată prin primul exon.

RO 121036 B1

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 25

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

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 26:

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 8 aminoacizi

(B) Tipul: amino acid

(C) Topologie: necunoscută

(ii) Tipul de moleculă: peptidă

(v) Tipul de fragment: intern

(vi) Sursa de origine:

(A) Organism: drojdia Pichia.

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 26

Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala
1				5			

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 27:

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 4 aminoacizi

(B) Tipul: amino acid

(C) Topologie: necunoscută

(ii) Tipul de moleculă: peptidă

(v) Tipul de fragment: intern

(vi) Sursa de origine:

(A) Organism: drojdia Pichia.

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 27

Glu	Ala	Glu	Ala
1			

RO 121036 B1

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 28:	1
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 4 aminoacizi	3
(B) Tipul: amino acid	
(C) Topologie: necunoscută	5
(ii) Tipul de moleculă: peptidă	
(v) Tipul de fragment: intern	7
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: drojdia Pichia.	9
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 28	
Leu Glu Lys Arg	11
1	
	13
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 29	
(i) Caracteristicile secvenței:	15
(A) Lungime: 18 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	17
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	19
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: Primerul HOB 1gF ADN generat din secvența necodificată 5'	21
a genei <i>ob</i> umane.	
(iii) Ipotetic: Nu	23
(iv) Antisens: Nu	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 29	25
CCCAAGAAGC CCATCCTG	
	18 27
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 30	29
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 20 perechi de baze	31
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	33
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	35
(A) Descriere: Primerul HOB 1gF ADN generat în prima secvență intronică a	
genei <i>ob</i> umane.	37
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Da	39
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 30	
GACTATCTGG GTCCAGTGCC	
	20 41
	43
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 31	
(i) Caracteristicile secvenței:	45
(A) Lungime: 20 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	47
(C) Tip de răsucire: simplă	

RO 121036 B1

- 1 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
3 (A) Descriere: Primerul HOB 2gF ADN generat în prima secvență intronică a
genei *ob* umane.
5 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
7 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 31
CCACATGCTG AGCACTTGTT 20
9
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 32
11 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 22 perechi de baze
13 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
15 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
17 (A) Descriere: Primerul HOB 2gR ADN generat de secvența 3' necodificată
a genei *ob* umane.
19 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Da
21 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 32
CTTCAATCCT GGAGATACCT GG 22
23
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 33
25 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 51 perechi de baze
27 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: dublă
29 (D) Topologie: circulară
(ii) Tipul de moleculă: ADN
31 (A) Descriere: porțiunea de clonare pPIC.9
(iii) Ipotetic: Nu
33 (iv) Antisens: Nu
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 33
35
CTCGAGAAAA GAGAGGCTGA AGCTTACGTA GAATTCCTTA GGCGGGCCGG G 51
37
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 34
39 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 40 perechi de baze
41 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
43 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
45 (A) Primerul 5' PCR pentru amplificarea secvenței ADNc a genei *ob* umane.
(iii) Ipotetic: Nu
47 (iv) Antisens: Nu

RO 121036 B1

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 34	1
GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCTATCCAG AAAGTCCAGG	40
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 35	3
(i) Caracteristicile secvenței:	5
(A) Lungime: 31 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	7
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	9
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Primerul 3' PCR pentru amplificarea secvenței ADNc a genei <i>ob</i> umane.	11
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Da	13
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 35	
GCGCGAATTC TCAGCACCCA GGGCTGAAGT C	31
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 36	17
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 40 perechi de baze	19
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	21
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	23
(A) Primerul 5' PCR pentru amplificarea secvenței ADNc a genei <i>ob</i> umane.	
(iii) Ipotetic: Nu	25
(iv) Antisens: Nu	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 36	27
GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCCATCCAA AAAGTCCAG	40
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 37	29
(i) Caracteristicile secvenței:	31
(A) Lungime: 31 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	33
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	35
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Primerul 3' PCR pentru amplificarea secvenței ADNc a genei <i>ob</i> murinice.	37
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	39
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 37	
GCGCGAATTC TCAGCATTCA GGGCTAACAT C	31
2) Informații pentru Secvența ID Nr. 38:	43
(i) Caracteristicile secvenței:	45
(A) Lungime: 4 aminoacizi	
(B) Tipul: amino acid	47
(C) Topologie: lineară	

RO 121036 B1

- 1 (ii) Tipul de moleculă: peptidă
(A) Descriere: tetrapeptidă la capătul N-terminal al proteinei *ob* murine
3 renaturată, după clivajul trombinei.

(vi) Sursa de origine:

- 5 (A) Organism: murină

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 38

7
Gly Ser His Met
1

- 9
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 39

11 (i) Caracteristicile secvenței:

- (A) Lungime: 19 perechi de baze
13 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
15 (D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)

- 17 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS1734

19 (iii) Ipotetic: Nu

(iv) Antisens: Nu

21 (vi) Sursa de origine:

(A) Organism: uman

23 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 39

AGAGTTACAG CTTTACAG

18

- 25
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 40

27 (i) Caracteristicile secvenței:

- (A) Lungime: 18 perechi de baze
29 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
31 (D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)

- 33 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS1734

35 (iii) Ipotetic: Nu

(iv) Antisens: Nu

37 (vi) Sursa de origine:

(A) Organism: uman

39 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 40

AGAGTTACAG CTTTACAG

18

- 41
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 41

43 (i) Caracteristicile secvenței:

- (A) Lungime: 19 perechi de baze
45 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
47 (D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)

RO 121036 B1

(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	1
sWSS494	
(iii) Ipotetic: Nu	3
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	5
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 41	7
CTAAACACCT TTCCATTCC	19
	9
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 42	
(i) Caracteristicile secvenței:	11
(A) Lungime: 22 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	13
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	15
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	17
sWSS494	
(iii) Ipotetic: Nu	19
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	21
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 42	23
TTATATTAC TTTTCCCCTC TC	22
	25
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 43	
(i) Caracteristicile secvenței:	27
(A) Lungime: 20 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	29
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	31
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	33
sWSS883	
(iii) Ipotetic: Nu	35
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	37
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 43	39
GTGCAGCTTT AATTGTGAGC	20
	41
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 44	
(i) Caracteristicile secvenței:	43
(A) Lungime: 20 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	45
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	47
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	

RO 121036 B1

1 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS883

3 (iii) Ipotetic: Nu

(iv) Antisens: Nu

5 (vi) Sursa de origine:

(A) Organism: uman

7 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 44

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG

20

9

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 45

11 (i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 18 perechi de baze

13 (B) Tipul: acid nucleic

(C) Tip de răsucire: simplă

15 (D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)

17 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS2359

19 (iii) Ipotetic: Nu

(iv) Antisens: Nu

21 (vi) Sursa de origine:

(A) Organism: uman

23 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 45

AGTGTGTGTGT TTCTCCTG

18

25

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 46

27 (i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 19 perechi de baze

29 (B) Tipul: acid nucleic

(C) Tip de răsucire: simplă

31 (D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)

33 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS2359

35 (iii) Ipotetic: Nu

(iv) Antisens: Nu

37 (vi) Sursa de origine:

(A) Organism: uman

39 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 46

AAAGGGGATG TGATAAGTG

19

41

43 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 47

(i) Caracteristicile secvenței:

45 (A) Lungime: 18 perechi de baze

(B) Tipul: acid nucleic

47 (C) Tip de răsucire: simplă

(D) Topologie: lineară

RO 121036 B1

(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	1
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	
sWSS2336	3
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	5
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	7
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 47	
GCTCAACTGA CAGAAAAC	9
	18
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 48	11
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 20 perechi de baze	13
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	15
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	17
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	
sWSS2336	19
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	21
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	23
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 48	
GGAATAATGA GAGAAGATTG	25
	20
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 49	27
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 18 perechi de baze	29
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	31
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	33
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	
sWSS1218	35
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	37
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	39
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 49	
GGTGTTACGT TTAGTTAC	41
	18
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 50	43
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 20 perechi de baze	45
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	47
(D) Topologie: lineară	

RO 121036 B1

- 1 (ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR
- 3 sWSS1218
(iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
(vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 50
- 9 **GACTATGTAA AAGAAATGCC** **20**
- 11 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 51
(i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
(B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
(D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR
- 19 sWSS1402
(iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
(vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 51
- 25 **CCTTCCTCAACT TCTTTGAC** **18**
- 27 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 52
(i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
(B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
(D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR
- 35 sWSS1402
(iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
(vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 52
- 41 **AAAGGGCTTC TAATCTAC** **18**
- 43 (2) Informații pentru Secvența ID Nr. 53
(i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
(B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
(D) Topologie: lineară

RO 121036 B1

(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	1
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	
sWSS999	3
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	5
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	7
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 53	
TAAACCCCTT TCTGTTC	9
	18
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 54	11
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 19 perechi de baze	13
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	15
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	17
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	
sWSS999	19
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	21
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	23
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 54	
TTGCATAATA GTCACACC	25
	19
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 55	27
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 22 perechi de baze	29
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	31
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	33
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	
sWSS1751	35
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	37
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	39
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 55	
CCAAAATCAG AATTGTCAGA AG	41
	21
	43
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 56	
(i) Caracteristicile secvenței:	45
(A) Lungime: 20 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	47
(C) Tip de răsucire: simplă	

RO 121036 B1

- 1 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
3 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS1751

- 5 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
7 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
9 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 56

AAACCGAAGT TCAGATACAG

20

11

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 57

- 13 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
15 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
17 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
19 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS1174

- 21 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
23 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
25 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 57

AATATCTGAC ATTGGCAC

18

27

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 58

- 29 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
31 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
33 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
35 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS1174

- 37 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
39 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
41 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 58

TTAGACCTGA GAAAAGAG

18

43

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 59

- 45 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 19 perechi de baze
47 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă

RO 121036 B1

(D) Topologie: lineară	1
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	3
sWSS2061	
(iii) Ipotetic: Nu	5
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	7
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 59	9
GTTGCACAAAT ACAAATCC	19
	11
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 60	
(i) Caracteristicile secvenței:	13
(A) Lungime: 20 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	15
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	17
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	19
sWSS2061	
(iii) Ipotetic: Nu	21
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	23
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr.60	25
CTTCCATTAG TGTCTTATAG	20
	27
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 61	
(i) Caracteristicile secvenței:	29
(A) Lungime: 18 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	31
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	33
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	35
sWSS2588	
(iii) Ipotetic: Nu	37
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	39
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 61	41
ATCACTACAC ACCTAATC	18
	43
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 62	
(i) Caracteristicile secvenței:	45
(A) Lungime: 18 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	47
(C) Tip de răsucire: simplă	

RO 121036 B1

- 1 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
3 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR
sWSS2588
5 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
7 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
9 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 62
CCATTCTACA TTTCACCC 18
11
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 63
13 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 24 perechi de baze
15 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
17 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
19 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR
sWSS808
21 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
23 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
25 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 63
GGCTGTGTGA GCAAGATCCT AGGA 24
27
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 64
29 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 23 perechi de baze
31 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
33 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
35 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR
sWSS808
37 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
39 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
41 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 64
TTGCCAGGCA AAGAGGGCTG GAC 23
43
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 65
45 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
47 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă

RO 121036 B1

(D) Topologie: lineară	1
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	3
sWSS1392	
(iii) Ipotetic: Nu	5
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	7
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 65	9
CTCAGGTATG TCTTTATC	18
	11
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 66	
(i) Caracteristicile secvenței:	13
(A) Lungime: 18 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	15
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	17
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	19
sWSS1392	
(iii) Ipotetic: Nu	21
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	23
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 66	25
TGTCTCTGCA TTCTTTTC	18
	27
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 67	
(i) Caracteristicile secvenței:	29
(A) Lungime: 18 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	31
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	33
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	35
sWSS1148	
(iii) Ipotetic: Nu	37
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	39
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 67	41
GACACATACA AACACAAG	18
	43
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 68	
(i) Caracteristicile secvenței:	45
(A) Lungime: 19 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	47
(C) Tip de răsucire: simplă	

RO 121036 B1

- 1 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
3 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR
sWSS1148
5 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
7 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
9 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 68

ATTGAGTTGA GTGTAGTAG

19

11

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 69

- 13 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
15 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
17 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
19 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS1529

- 21 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
23 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
25 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 69

CAGGGATTTC TAATTGTC

18

27

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 70

- 29 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
31 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
33 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
35 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS1529

- 37 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
39 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
41 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 70

AAAAGATOGA GGCTTTTG

18

43

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 71

- 45 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 21 perechi de baze
47 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă

RO 121036 B1

(D) Topologie: lineară	1
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	3
sWSS2619	
(iii) Ipotetic: Nu	5
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	7
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 71	9
CGTTAAGGGA AGGAACTCTG G	21
	11
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 72	
(i) Caracteristicile secvenței:	13
(A) Lungime: 20 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	15
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	17
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	19
sWSS2619	
(iii) Ipotetic: Nu	21
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	23
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 72	25
TGGCTTAGAG GAGTCAGGGA	20
	27
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 73	
(i) Caracteristicile secvenței:	29
(A) Lungime: 18 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	31
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	33
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR	35
sWSS404	
(iii) Ipotetic: Nu	37
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	39
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 73	41
TAATGTGTCC TTCTTGCC	18
	43
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 74	
(i) Caracteristicile secvenței:	45
(A) Lungime: 18 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	47
(C) Tip de răsucire: simplă	

RO 121036 B1

- 1 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
3 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS404

- 5 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
7 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
9 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 74

ACCAGGGTCA ATACAAAG

18

11

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 75

- 13 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
15 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
17 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
19 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS2367

- 21 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
23 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
25 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 75

AAGGTGGGTA GGATGCTA

18

27

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 76

- 29 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 18 perechi de baze
31 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
33 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
35 (A) Descriere: porțiunea marcată de secvență specifică primerului PCR

sWSS2367

- 37 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
39 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
41 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 76

CAATCCTGGC TTCATTG

18

43

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 77

- 45 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 20 perechi de baze
47 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă

RO 121036 B1

(D) Topologie: lineară	1
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: Marker UT528	3
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	5
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	7
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 77	
GTGCAGCTTT AATTGTGAGC	20 9
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 78	11
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 20 perechi de baze	13
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	15
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	17
(A) Descriere: Marker UT528	
(iii) Ipotetic: Nu	19
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	21
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 78	23
TGCAGTAAGC TGTGATTGAG	20 25
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 79	
(i) Caracteristicile secvenței:	27
(A) Lungime: 20 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	29
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	31
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: Marker AFMa65zg9	33
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	35
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	37
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 79	
AGCTTCAAGA CTTTNAGCCT	20 39
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 80	41
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 19 perechi de baze	43
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	45
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	47
(A) Descriere: Marker AFMao65zg9	

RO 121036 B1

- 1 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
3 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
5 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 80

GGTCAGCAGC ACTGTGATT

19

7

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 81

- 9 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 19 perechi de baze
11 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
13 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
15 (A) Descriere: Marker AFMa125wh1
(iii) Ipotetic: Nu
17 (iv) Antisens: Nu
(vi) Sursa de origine:
19 (A) Organism: uman
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 81

21

TCACCTTGAG ATTCCATCC

19

23

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 82

- (i) Caracteristicile secvenței:
25 (A) Lungime: 20 perechi de baze
(B) Tipul: acid nucleic
27 (C) Tip de răsucire: simplă
(D) Topologie: lineară
29 (ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
(A) Descriere: Marker AFMa125wh1
31 (iii) Ipotetic: Nu
(iv) Antisens: Nu
33 (vi) Sursa de origine:
(A) Organism: uman
35 (xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 82

37

AACACCGTGG TCTTATCAAA

20

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 83

- 39 (i) Caracteristicile secvenței:
(A) Lungime: 20 perechi de baze
41 (B) Tipul: acid nucleic
(C) Tip de răsucire: simplă
43 (D) Topologie: lineară
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)
45 (A) Descriere: Marker AFM30yf10
(iii) Ipotetic: Nu
47 (iv) Antisens: Nu
(vi) Sursa de origine:

RO 121036 B1

(A) Organism: uman	1
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 83	
AGATGCTGAA TTCCAGACA	20
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 84	5
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 20 perechi de baze	7
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	9
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	11
(A) Descriere: Marker AFM309yf10	
(iii) Ipotetic: Nu	13
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	15
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 84	17
AGATGCTGAA TTCCAGACA	20
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 85	19
(i) Caracteristicile secvenței:	21
(A) Lungime: 16 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	23
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	25
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: Marker AFM218xf10	27
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	29
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	31
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 85	
TGGGCAACAC AGCAAA	16
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 86	35
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 20 perechi de baze	37
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	39
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	41
(A) Descriere: Marker AFM218xf10	
(iii) Ipotetic: Nu	43
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	45
(A) Organism: uman	

RO 121036 B1

1	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 86	
3	TGCAGTTAGT GCCAATGTCA	20
5	(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 87	
7	(i) Caracteristicile secvenței:	
9	(A) Lungime: 16 perechi de baze	
11	(B) Tipul: acid nucleic	
13	(C) Tip de răsucire: simplă	
15	(D) Topologie: lineară	
17	(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
19	(A) Descriere: Marker AFM206xc1	
21	(iii) Ipotetic: Nu	
23	(iv) Antisens: Nu	
25	(vi) Sursa de origine:	
27	(A) Organism: uman	
29	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 87	
31	CCAGGCCATG TGGAAAC	16
33	(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 88	
35	(i) Caracteristicile secvenței:	
37	(A) Lungime: 20 perechi de baze	
39	(B) Tipul: acid nucleic	
41	(C) Tip de răsucire: simplă	
43	(D) Topologie: lineară	
45	(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
47	(A) Descriere: Marker AFM206xc1	
49	(iii) Ipotetic: Nu	
51	(iv) Antisens: Nu	
53	(vi) Sursa de origine:	
55	(A) Organism: uman	
57	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 88	
59	AGTTCTTGGC TTGCGTCAGT	20
61	(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 89	
63	(i) Caracteristicile secvenței:	
65	(A) Lungime: 16 perechi de baze	
67	(B) Tipul: acid nucleic	
69	(C) Tip de răsucire: simplă	
71	(D) Topologie: lineară	
73	(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
75	(A) Descriere: Marker AFM199xh12	
77	(iii) Ipotetic: Nu	
79	(iv) Antisens: Nu	
81	(vi) Sursa de origine:	
83	(A) Organism: uman	

RO 121036 B1

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 89	1
TCTGATTGCT GGCTGC	16
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 90	3
(i) Caracteristicile secvenței:	5
(A) Lungime: 17 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	7
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	9
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: Marker AFM199xc1h12	11
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	13
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	15
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 90	
GCGCGTGTGT ATGTGAG	17
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 91	19
(i) Caracteristicile secvenței:	
(A) Lungime: 20 perechi de baze	21
(B) Tipul: acid nucleic	
(C) Tip de răsucire: simplă	23
(D) Topologie: lineară	
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	25
(A) Descriere: Marker AFMa345wc9	
(iii) Ipotetic: Nu	27
(iv) Antisens: Nu	
(vi) Sursa de origine:	29
(A) Organism: uman	
(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 91	31
AGCTCTTGGC AAACTCACAT	20
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 92	33
(i) Caracteristicile secvenței:	35
(A) Lungime: 20 perechi de baze	
(B) Tipul: acid nucleic	37
(C) Tip de răsucire: simplă	
(D) Topologie: lineară	39
(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
(A) Descriere: Marker AFM345wc9	41
(iii) Ipotetic: Nu	
(iv) Antisens: Nu	43
(vi) Sursa de origine:	
(A) Organism: uman	45

RO 121036 B1

1	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 92	
3	GCCTAAGGGA ATGAGACACA	20
	(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 93	
5	(i) Caracteristicile secvenței:	
	(A) Lungime: 24 perechi de baze	
7	(B) Tipul: acid nucleic	
	(C) Tip de răsucire: simplă	
9	(D) Topologie: lineară	
	(ii) Tipul de moleculă: ADN (primer)	
11	(A) Descriere: primer pentru gena Pax4 de șoarece	
	(iii) Ipotetic: Nu	
13	(iv) Antisens: Nu	
	(vi) Sursa de origine:	
15	(A) Organism: murină	
	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 93	
17	GGGAGCCTTG TCCTGGGTAC AAAG	24
	(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 94	
	(i) Caracteristicile secvenței:	
21	(A) Lungime: 491 perechi de baze	
	(B) Tipul: acid nucleic	
23	(C) Tip de răsucire: dublă	
	(D) Topologie: lineară	
25	(ii) Tipul de moleculă: ADNc	
	(A) Descriere: <i>ob</i> Met recombinantă murinică	
27	(iii) Ipotetic: Nu	
	(iv) Antisens: Nu	
29	(vi) Sursa de origine:	
	(A) Organism: murină	
31	(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 94	
33	TCTAGATTTG AGTTTTACT TTTAGAAGGA GGAATAACAT ATG GTA CCG ATC CAG	55
	Met Val Pro Ile Gln	
	1 5	
35	AAA GTT CAG GAC GAC ACC AAA ACC TTA ATT AAA ACG ATC GTT ACG CGT	103
	Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg	
37	10 15 20	
39	ATC AAC GAC ATC AGT CAC ACC CAG TCG GTC TCC GCT AAA CAG CGT GTT	151
	Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val	
	25 30 35	

RO 121036 B1

ACC GGT CTG GAC TTC ATC CCG GGT CTG CAC CCG ATC CTA AGC TTG TCC Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser 40 45 50	199	1
AAA ATG GAC CAG ACC CTG GCT GTA TAC CAG CAG GTG TTA ACC TCC CTG Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu 55 60 65	247	3
CCG TCC CAG AAC GTT CTT CAG ATC GCT AAC GAC CTC GAG AAC CTT CGC Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg 70 75 80 85	295	5
GAC CTG CTG CAC CTG CTG GCA TTC TCC AAA TCC TGC TCC CTG CCG CAG Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln 90 95 100	343	7
ACC TCA GGT CTT CAG AAA CCG GAA TCC CTG GAC GGG GTC CTG GAA GCA Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala 105 110 115	391	9
TCC CTG TAC AGC ACC GAA GTT GTT GCT CTG TCC CGT CTG CAG GGT TCC Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser 120 125 130	439	11
CTT CAG GAC ATC CTT CAG CAG CTG GAC GTT TCT CCG GAA TGT TAATGGA Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys 135 140 145	488	13
TCC	491	15
		17
		19
		21
		23
(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 95		25
(i) Caracteristicile secvenței:		27
(A) Lungime: 146 aminoacizi		
(B) Tipul: amino acid		
(D) Topologie: lineară		
(ii) Tipul de moleculă: proteină		29
(A) Descriere: proteină ob Met recombinantă murinică		

RO 121036 B1

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 95

```

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

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
      20           25           30

Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
      35           40           45

Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50           55           60

Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp
 65           70           75           80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser
      85           90           95

Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp
      100           105           110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
      115           120           125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser
      130           135           140

Pro Glu Cys
145

Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp
 65           70           75           80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser
      85           90           95

Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp
      100           105           110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
      115           120           125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser
      130           135           140

Pro Glu Cys
145

```

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 96

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 454 perechi de baze

(B) Tipul: acid nucleic

(C) Tip de răsucire: dublă

(D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: ADN

RO 121036 B1

(A) Descriere: ob Met recombinantă murinică

(iii) Ipotetic: Nu

(iv) Antisens: Nu

(vi) Sursa de origine:

(A) Organism: murină

(ix) Caracteristica:

(A) Nume/cheie: CDS

(B) Localizare: 4...444

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 96

CAT ATG GTA CCG ATC CAG AAA GTT CAG GAC GAC ACC AAA ACC TTA ATT 48
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile 11
1 5 10 15

AAA ACG ATC GTT ACG CGT ATC AAC GAC ATC AGT CAC ACC CAG TCG GTG 96
Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val 13
20 25 30 15

AGC TCT AAA CAG CGT GTT ACA GGC CTG GAC TTC ATC CCG GGT CTG CAC 144
Ser Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His 17
35 40 45 19

CCG ATC CTG ACC TTG TCC AAA ATG GAC CAG ACC CTG GCT GTA TAC CAG 192
Pro I Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser 21
85 90 95

CAG A Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly 240
Gln I 100 105 110 23

Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser 25
GAC C 115 120 125 288
Asp L 27

80 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140 29

TCC T 336
Ser C Pro Gly Cys 145 31

GGC GGC GTC CTG GAA GCA TCC GGT TAC AGC ACC GAA GTT GTT GCT CTG 384
Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu 33
115 120 125

TCC CGT CTG CAG GGT TCC CTT CAG GAC ATG CTT TGG CAG CTG GAC CTG 432
Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu 35
130 135 140 37

TCT CCG GGT TGT TAATGGATCC 454
Ser Pro Gly Cys 145 39

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 97

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 147 aminoacizi

(B) Tipul: amino acid

(D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: proteină

(A) Descriere: proteină ob Met recombinantă murinică

RO 121036 B1

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 97

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

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Gly Cys
145

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 98

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 21 aminoacizi

(B) Tipul: amino acid

(D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: peptidă

(v) Tipul de fragment: His-tag, N-terminal

(A) Descriere: proteină ob Met recombinantă murinică

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 98

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

Arg Gly Ser Pro
20

(2) Informații pentru Secvența ID Nr. 99

(i) Caracteristicile secvenței:

(A) Lungime: 20 aminoacizi

(B) Tipul: amino acid

(D) Topologie: lineară

(ii) Tipul de moleculă: peptidă

(v) Tipul de fragment: His-tag, N-terminal

(A) Descriere: proteină ob Met recombinantă murinică

RO 121036 B1

(xi) Descrierea secvenței: Secvența ID Nr. 99	1
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro 1 5 10 15	3
Arg Gly Ser His Met 20	5
	7
Revendicări	
	9
1. Polipeptidă OB aleasă din grupul format din:	
a) o polipeptidă care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID. NR.: 2, 4, 5 sau 6,	11
b) o polipeptidă activă biologic care este o alelă al unei polipeptide cu SECV. ID NR.: 2, 4, 5 sau 6, în care respectiva alelă activă biologic modulează greutatea corporală a unui animal;	13
c) un analog activ biologic al unei polipeptide cu SECV. ID NR. 2, 4, 5 sau 6, în care numitul analog activ biologic modulează greutatea corporală a unui animal; și	15
d) un fragment activ biologic al oricărei polipeptide (a), (b) sau (c) în care numitul fragment activ biologic modulează greutatea corporală a unui animal.	17
2. Fragment imunogenic al unei polipeptide definite în revendicarea 1, în care numitul fragment imunogenic este un fragment al unei polipeptide OB definite în revendicarea 1 pentru modularea greutății corporale.	19
3. Fragment imunogen al unei polipeptide definite în revendicarea 1, ales din grupul format din:	21
Val-Pro-Ile-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr (SECV. ID NR:18);	23
Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala (SECV. ID NR:19);	25
Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp	27
(SECV. ID NR: 20); și	
Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys	29
(SECV. ID NR: 21)	
4. Analog al polipeptidei definite în revendicarea 1, care este un analog al polipeptidei OB umane cu SECV. ID NR.:4, în care unul sau mai mulți amino acizi aleși din grupul format din amino acizii 53, 71, 85, 89, 92, 98, 110, 118, 121, 122, 126, 127, 128, 129, 132, 139, 157, 159, 163 și 166 este substituit cu un alt aminoacid.	31
5. Analog conform revendicării 4, în care substituția este cu aminoacidul divergent al polipeptidei OB de șoarece, așa cum este în SECV. ID. NR.: 2.	33
6. Analog conform revendicării 4, în care substituția este cu o alanină.	35
7. Analog conform revendicării 4, ales din grupul format din polipeptide în care:	37
a) restul de serină din poziția 53 este substituit cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină;	39
b) restul de serină din poziția 98 este substituit cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină și	41
c) restul de arginină la poziția 92 este substituit cu asparagină, lizină, histidină, glutamină, acid glutamic, acid aspartic, serină, treonină, metionină sau cisteină.	43
8. Analog conform revendicării 4, în care substituția este cu un aminoacid adecvat.	45
9. Analog conform revendicării 1, în care numita polipeptidă este un analog al polipeptidei OB umane cu SECV. ID. NR.:6, în care unul sau mai mulți aminoacizi aleși din grupul format din aminoacizii 52, 55, 70, 84, 88, 91, 94, 97, 109, 117, 120, 121, 125, 126, 127, 128, 131, 138, 156, 158, 162 și 165 este înlocuit cu un alt aminoacid.	47
	49

RO 121036 B1

10. Analog conform revendicării 9, în care substituția este cu aminoacid divergent al polipeptidei OB de șoarece, așa cum este în SECV. ID. NR.: 5.

11. Analog conform revendicării 9, în care substituția este cu o alanină.

12. Analog conform revendicării 9, ales din grupul format din polipeptide în care:

a) restul de serină din poziția 52 este substituit cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină;

b) restul de serină din poziția 97 este substituit cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină și

c) restul de arginină din poziția 91 este substituit cu asparagină, lizină, histidină, glutamină, acid glutamic, acid aspartic, serină, treonină, metionină sau cisteină.

13. Analog conform revendicării 9, în care substituția este cu un aminoacid adecvat.

14. Analog conform revendicării 1, având omologie de 84% sau mai mult cu secvența de aminoacizi a polipeptidei OB umană din SECV. ID NR.: 2, 4, 5 sau 6.

15. Analog conform revendicării 1, ales din grupul format din polipeptide în care:

a) unul sau mai multe resturi de acid aspartic este înlocuit cu acid glutamic;

b) unul sau mai multe resturi de izoleucină este substituit cu leucină;

c) unul sau mai multe resturi de glicină sau valină este substituit cu alanină;

d) unul sau mai multe resturi de arginină este înlocuit cu histidină;

e) unul sau mai multe resturi de tirozină sau fenilalanină este înlocuit cu triptofan;

f) unul sau mai multe resturi de la pozițiile 121 la 128 din SECV. ID NR.:4, este substituit cu glicină sau alanină; și

g) unul sau mai multe resturi din pozițiile 54 la 60 sau 118 la 166 din SECV. ID NR: 4, este substituit cu lizină, acid glutamic, cisteină sau prolină.

16. Analog conform cu oricare dintre revendicările 1, 2, 4, 5, 9 sau 10, ales din grupul format din polipeptide:

a) având resturile 1 la 21 eliminate; și

b) polipeptide din subgrupa (a) având o metionină în poziția 21 sau având o secvență glicină-serină-histidină-metionină SECV. ID NR.: 38 în pozițiile 18 la 21 sau având o secvență metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SECV. ID. NR.:98) la pozițiile 1 la 21.

17. Analog conform cu oricare dintre revendicările 1, 2, 4, 5, 9 sau 10 ales din grupul format din polipeptidele:

a) având resturile 1 la 21 eliminate; și

b) polipeptidele subgrupeii a) având o secvență leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SECV. ID. NR.:27) la pozițiile 14 la 21 sau având o secvență de acid glutamic-alanină- acid glutamic-alanină (SECV. ID. NR.: 27) la pozițiile 18 la 21 sau având o secvență leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SECV. ID NR.: 28) la pozițiile 18 la 21 sau având o secvență metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SECV. ID. NR.: 99) la pozițiile 2 la 21 sau având o secvență glicină-serină-prolină la pozițiile 18 la 21.

18. Analog conform cu oricare dintre revendicările 6, 7, 8, 11, 12, 13 sau 14, ales din grupul format din polipeptidele:

a) având resturile 1 la 21 eliminate; și

b) polipeptidele subgrupeii a) având o metionină în poziția 21 sau având o secvență glicină-serină-histidină-metionină (SECV. ID. NR.:38) la pozițiile 18 la 21 sau având o

RO 121036 B1

secvență de metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SECV. ID. NR.: 98) la pozițiile 1 la 21 sau având o secvență leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SECV. ID. NR.:26) la pozițiile 14 la 21 sau având o secvență acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SECV. ID NR.:27) la pozițiile 18 la 21 sau având o secvență leucină- acid glutamic-lizină-arginină (SECV. ID NR.:28) la pozițiile 18 la 21 sau având o secvență metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SECV. ID NR.:99) la pozițiile 2 la 21 sau având o secvență glicină-serină-prolină la pozițiile 18 la 21.	1
19. Analog trunchiat al polipeptidei OB umane definit în revendicarea 1, ales din grupul din SECV. ID NR.: 4) format din polipeptide în care:	11
a) unul sau mai multe resturi de la pozițiile 121 la 128 sunt eliminate;	13
b) resturile 1-116 sunt eliminate;	
c) resturile 1-21 și 54 la 167 sunt eliminate;	15
d) resturile 1-60 și 117 la 167 sunt eliminate;	
e) resturile 1-60 sunt eliminate;	17
f) resturile 1-53 sunt eliminate;	
g) un analog al subgrupeii (a) în care resturile 1-21 sunt eliminate; și	19
h) un analog al subgrupeii (a) la (g) având un amino acid N-terminal sau secvență de aminoacizi N-terminală ales din grupul format din:	21
1) metionină,	
2) o secvență glicină-serină-histidină-metionină (SECV. ID NR.:38),	23
3) o secvență de metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SECV. ID. NR.: 98);	25
4) o secvență leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SECV. ID NR.: 26),	27
5) o secvență acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SECV. ID NR.:27), o secvență leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SECV. ID NR.: 28), o secvență metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SECV. ID NR.:99), și	29
6) o secvență glicină-serină-prolină.	31
20. Derivat al unei polipeptide OB, definită în oricare dintre revendicările 1 la 19, având unul sau mai multe fragmente chimice atașate acesteia.	33
21. Derivat conform revendicării 20, în care fragmentul chimic este un polimer solubil în apă.	35
22. Derivat conform revendicării 21, în care polimerul solubil în apă este polietilen glicol.	37
23. Derivat conform revendicării 22, care este <i>mono-</i> , <i>di-</i> , <i>tri-</i> sau tetrapegilat.	39
24. Derivat conform revendicării 20, care este N-terminal monopegilat.	41
25. Derivat conform revendicării 24, care este o polipeptidă OB care conține resturile de aminoacizi 22 la 167 ale SECV. ID NR:4 sau resturile 22 la 166 ale SECV. ID NR:6.	43
26. Derivat conform revendicării 25, care este o polipeptidă OB care conține secvența de aminoacizi a resturilor 22 la 167 ale SECV. ID NR:4 sau resturile 22 la 166 ale SECV. ID NR.: 6 și având o metionină în poziția 21.	45
27. O moleculă izolată de acid nucleic, care codifică polipeptida OB definită în oricare dintre revendicările 1 la 19.	47

RO 121036 B1

28. Moleculă de ADN pentru utilizare în exprimarea sigură a unei polipeptide OB având activitatea biologică de modulare a greutatea corporale a unui mamifer, ADN-ul fiind ales din grupul format din:

- a) molecule ADN din SECV. ID NR.:1 și 3 sau fragmente ale acestora;
- b) molecule ADN care hibridizează în condiții stricte la molecule ADN definite în (a) sau fragmente hibridizabile ale acestora, care hibridizează în condiții stricte; și
- c) molecule ADN care codifică o exprimare pentru secvența de aminoacizi codificată de oricare dintre moleculele ADN anterioare.

29. Moleculă ADN conform revendicării 28, care este molecula ADN genomică umană cu SECV. ID NR.:22 și 24.

30. Moleculă ADN conform revendicării 29, care codifică o polipeptidă având o secvență de aminoacizi aleasă din grupul format din secvențele de aminoacizi din:

- a) SECV. ID NR.: 2;
- b) aminoacizii 22 până la 167 ai secvenței SECV. ID. NR.:2;
- c) SECV. ID NR.:4;
- d) aminoacizii 22 până la 167 ai SECV. ID NR: 4;
- e) SECV. ID NR.: 5;
- f) aminoacizii 22 până la 167 ai SECV. ID NR.: 5;
- g) SECV. ID NR.: 6;
- h) aminoacizii 22 la 166 ai SEQ ID No:6; și
- (i) secvențele de aminoacizi ai subgrupelor (b), (d), (f) sau (h) având un amino acid N-terminal sau secvență de aminoacizi N-terminală ales din grupul format din:

- (1) metionină,
- (2) o secvență glicină-serină-histidină-metionină (SECV. ID NR.: 38), și
- (3) o secvență de metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SECV. ID NR.: 98).

31. Moleculă ADN conform revendicării 32, care codifică o secvență de aminoacid din subgrupele (b), (d), (f) sau (h) având o secvență de aminoacizi de la capătul N-terminal aleasă din grupul format din:

- (1) o secvență leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SECV. ID NR.: 26),
- (2) o secvență acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SECV. ID NR.: 27), o secvență leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SECV. ID NR.:28), o secvență metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SECV. ID NR.:99), și
- (3) o secvență glicină-serină-prolină.

32. Moleculă ADN conform revendicării 27, care conține secvența stabilită ca secvență care codifică proteina SECV. ID NR.:3.

33. Moleculă ADN conform revendicării 27, care conține secvența stabilită ca secvență care codifică aminoacizii 22 până la 167 ai SECV. ID NR.:3.

34. Moleculă de acid nucleic marcată în vederea detectării hibridizabile în condiții stricte la o moleculă ADN conform cu oricare dintre revendicările 27 la 33.

35. Oligonucleotidă primer cu o lungime de cel puțin 20 de nucleotide pentru amplificarea ADN genomic uman care codifică o polipeptidă OB definită în oricare dintre revendicările 1 la 19.

RO 121036 B1

36. Oligonucleotidă primer conform revendicării 35, ales din grupul format din: HOB 1 gF 5'-CCCAAGAAGCCCATCCTG-3' (SECV. ID NR.: 29); HOB 1gR 5'-GACTATCTGGGTCCAGTGCC-3' (SECV. ID NR.: 30); HOB 2gF 5'-CCACATGCTGAGCACTTGTT-3' (SECV. ID NR.: 31); și HOB 2gF 5'-CTTCAATCCTGGAGATACCTGG-3' (SECV. ID NR.: 32).	1 3 5
37. Vector care conține o moleculă ADN conform cu oricare dintre revendicările 27 la 33.	7
38. Vector de exprimare care conține o moleculă ADN conform cu oricare dintre revendicările 27, 28, 29, 31, 32 sau 33, asociat operativ cu o secvență de control al exprimării.	9
39. Procedeu de preparare a unei polipeptide OB, definită în oricare dintre revendicările 1 până la 26, care cuprinde:	11
(a) cultivarea unei celule transfectate sau transformate cu o moleculă de ADN, definită în revendicarea 29 în condiții care asigură exprimarea polipeptidei OB;	13
(b) recuperarea polipeptidei OB exprimate;	15
(c) izolarea selectivă a polipeptidei OB prin purificare de afinitate sau schimb ionic;	17
(d) purificarea poliproteinei OB prin filtrare pe gel.	17
40. Procedeu conform revendicării 39, care cuprinde o etapă suplimentară de cromatografie pe o coloană puternic schimbătoare de cationi după etapa de cromatografie pe o coloană de chelatare a Ni.	19
41. Anticorp specific pentru o polipeptidă OB, definită în oricare dintre revendicările 1 la 19, sau obținut printr-un procedeu conform revendicărilor 39 și 40.	21
42. Anticorp conform revendicării 41, care este un anticorp monoclonal sau policlonal.	23
43. Anticorp conform revendicării 42, marcat cu un marker detectabil.	25
44. Compoziție farmaceutică care conține o polipeptidă OB, definită în oricare dintre revendicările 1 până la 19, și un purtător acceptabil farmaceutic.	27
45. Compoziție farmaceutică conform revendicării 44, pentru reducerea greutateii corporale a unui animal.	27
46. Compoziție farmaceutică conform revendicării 44, pentru creșterea greutateii corporale a unui animal, în care polipeptida este un antagonist ales din grupul format din:	29
- un anticorp care se leagă la polipeptida OB definită în revendicările 1 până la 19 sau	31
- un analog de polipeptidă OB definită în revendicările 1 la 19 și	33
- un fragment al unei polipeptide OB definită în revendicările 1 la 19,	33
și un purtător acceptabil farmaceutic.	
47. Utilizare a unei polipeptide definite în oricare dintre revendicările 1 până la 19, pentru fabricarea unui medicament pentru modificarea greutateii corporale a unui animal.	35
48. Utilizare a unei polipeptide definite în oricare dintre revendicările 1 până la 19, pentru fabricarea unui medicament pentru modificarea greutateii corporale a unui animal care este administrat în combinație cu un medicament pentru tratarea unei afecțiuni alese din grupul format din diabet, hipertensiune și colesterol ridicat.	37 39

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

GGATCCCTGCTCCAGCAGCTGCAAGGTGCAAGTGAAGAAGAGATCCAGGGAGGAAAAATGTG	61
<u>M C</u>	2
CTGGAGACCCCTGTGTGGTTCTGTGGCTTTGGTCTCTATCTGTCTTATGTTCAAGCAGT	121
<u>W R P L C R F L W L W S Y L S Y V Q A V</u>	22
GCCTATCCAGAAAGTCCAGGATGACACCAAAACCTCATCAAGACCAATTGTCACCAGGAT	181
<u>P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I</u>	42
CAATGACATTTACACACGCGCAGTCGGTATCCGCCAAGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTT	241
<u>N D I S H T Q S V S A K Q R V T G L D F</u>	62
CATTCTGGGCTTCACCCCATTTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTA	301
<u>I P G L H P I L S L S K M D Q T L A V Y</u>	82
TCAACAGGTCCTCACCAGCCTGCCTTCCCAAATGTGCTGCAGATAGCCAAATGACCTGGA	361
<u>Q Q V L T S L P S Q N V L Q I A N D L E</u>	102
GAATCTCCGAGACCTCCTCCATCTGTGGCTTCTCCAAGAGCTGCTCCCTGCCTCAGAC	421
<u>N L R D L L H L L A F S K S C S L P Q T</u>	122
CAGTGGCCTGCAGAAGCCAGAGAGCCCTGGATGGCGTCTCTGGAAGCCTCACTCTACTCCAC	481
<u>S G L Q K P E S L D G V L E A S L Y S T</u>	142

Fig. 1A

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

```

AGAGGTGGTGGCTTTGAGCAGGCTGCAGGGCTCTCTGCAGGACATTCTTCAACAGTTGGA 541
E V V A L S R L Q G S L Q D I L Q Q L D 162

TGTTAGCCCTGAATGCTGAAGTTTCAAAGGCCACCAGGCTCCCAAGAATCATGTAGAGGG 601
V S P E C * 167

AAGAAACCTTGGCTTCCAGGGGTCTTCAGGAGAGAGAGCCATGTGCACACATCCATCAT 661

TCATTTCTCTCCCTCCTGTAGACCACCCATCCAAAGGCATGACTCCACAAATGCTTGACTC 721

AAGTTATCCACACAACITTCATGAGCACAAAGAGGGGCCAGCCCTGCAGAGGGGACTCTCAC 781

CTAGTTCCTCAGCAAGTAGAGATAAGAGCCATCCCATCCCCTCCATGTCCCCACCTGCTCC 841

GGGTACATGTTCCCTCCGTGGGTACACGCTTCGCTGCGGGCCAGGAGAGGTGAGGTAGGGA 901

TGGGTAGAGCCTTTGGGCTGTCTCAGAGTCTTTGGGAGCACCGTGAAGGCTGCATCCACA 961

CACAGCTGGAAACTCCCAAGCAGCACACGATGGAAGCACCTTATTTATTTCTGCATTCT 1021

TATTTTGGATGGATCTGAAGCAAGGCATCAGCTTTTTCAGGCTTTGGGGGTGAGCCAGGA 1081

TGAGGAAGGCTCCTGGGGTGTGCTGCTTCAATCCTATTGATGGGTCTGCCCGAGGCAAAACC 1141

```

Fig. 1B

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

TAAATTTTGAGTGACTGGAAGGAGGTGGGATCTTCCAAACAAGAGTCTATGCAGGTAG 1201
 CGCTCAAGATTGACCTCTGGTGACTGGTTTGTCTATTGTGACTGACTCTATCCAAAC 1261
 ACGTTTGCAGCGGCATTGCCGGAGCATAGGCTAGGTTATTATCAAAAGCAGATGAATTT 1321
 TGTCAAGTGTAAATATGTATCTAIGTGCACCTGAGGGTAGAGGATGTGTAGAGGGAGGGT 1381
 GAAGGATCCGGAAGTGTCTCTGAATTACATATGTGTGGTAGGCTTTTCTGAAAGGGTGA 1441
 GGCAATTTTCTTACCTCTGTGGCCACATAGTGTGGCTTTGTGAAAGGACAAAGGAGTTGA 1501
 CTCCTTCCGGAACATTTGGAGTGTAACAGGCACCCCTTGGAGGGGCTAAAGCTACAGGCCT 1561
 TTTGTTGGCATAATTGCTGAGCTCAGGGAGTGAGGGCCCCACATTTGAGACAGTGAGCCCC 1621
 AAGAAAGGGTCCCTGGGTAGATCTCCAAGTTGTCCAGGGTTGATCTCACAAATGCGTT 1681
 TCTTAAGCAGGTAGACGTTTGCAATGCCAATATGTGGTTCTCATCTGATTGGTTTCATCCAA 1741
 AGTAGAACCCCTGTCTCCACCACCATTTCTGTGGGAGTTTGTTCAGTGGGAATGAGAAAT 1801
 CACTTAGCAGATGGTCTGAGCCCTGGGCCAGCACTGCTGAGGAAGTGCCAGGGCCCCCAG 1861

Fig. 1C

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

GCCAGGCTGCCAGAAATTGCCCTTCGGGCTGGAGGATGAACAAAGGGGCTTGGGTTTTTCC 1921
ATCACCCCTGCACCCTATGTCAACCATCAAACCTGGGGGCGAGATCAGTGAGAGGACACTTG 1981
ATGGAAAGCAATACACTTTAAGACTGAGCACAGTTTCGTGCTCAGCTCTGTCTGGTGCTG 2041
TGAGCTAGAGAAGCTCACCATACATATAAAATCAGAGGCTCATGTCCCTGIGGTTAG 2101
ACCCTACTCGCGGGGTGTACTCCACCACAGCAGCACCGCCTGGAAGTACAGTGCT 2161
GTCCTCAACAGGTGTGAAGAACCCTGAGCTGAGGGTGACAGTGCCCAGGGGAACCCCTGCT 2221
TGCAGTCTATTGCATTTACATAACCGCATTTTCAGGGCACATTAGCATCCACTCCCTATGGTA 2281
GCACACTGTTGACAATAGGACAAGGGATAGGGTTGACTATCCCTTATCCAAATGCTTG 2341
GGACTAGAAGAGTTTGGATTTTAGAGTCTTTTCAGGCATAGGTATATTGAGTATATAT 2401
AAATGAGATATCTTGGGGATGGGGCCCAAGTATAAACATGAAGTTCATTATATTTTCAT 2461
AATACCGTATAGACACTGCTTGAAGTGTAGTTTTTATACAGTGTTTTTAAATAACGTTGTAT 2521
GCATGAAAGACGTTTTTACAGCATGAACCTGTCTACTCATGCCAGCACTCAAAAACCTTG 2581

Fig. 1D

⁽⁵¹⁾ Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

GGGTTTGGAGCAGTTTGGATCTTGGGTTTTCTGTTAAGAGATGGTTAGCTTATACCTAA 2641
AACCATAATGGCAACAGGCTGCAGGACCAGACTGGATCCTCAGCCCTGAAGTGTGCCCT 2701
TCCAGCCAGGTCATACCCCTGTGGAGGTGAGCGGGATCAGGTTTTGTGGTGCTAAGAGAGG 2761
AGTTGGAGGTAGATTTTGGAGGATCTGAGGGC 2821

Fig. 1E

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

---G--GTTG CAAGGCCCAA GAAGCCCA-- -TCCTGGGAA GGAAATGCA 50
TTGGGGAACC CTGTGCGGAT TCTTGTGGCT TTGGCCCTAT CTTTCTATG 100
TCCAAGCTGT GCCCATCCAA AAAGTCCAAG ATGACACCAA AACCTCATC 150
AAGACAATTG TCACCAGGAT CAATGACATT TCACACACGC AGTCAGTCTC 200
CTCCAACAG AAAGTCACCG GTTTGGACTT CATTCTGGG CTCCACCCCA 250
TCTGACCTT ATCCAAGATG GACCAGACAC TGGCAGTCTA CCAACAGATC 300
CTCACCAGTA TGCCTTCCAG AAAGTGATC CAAATATCCA ACGACCTGGA 350
GAACCTCCGG GATCTTCTTC ACGTGCTGGC CTTCTCTAAG AGCTGCCACT 400
TGCCCTGGGC CAGTGGCCTG GAGACCTTGG ACAGCCTGGG GGGTGTCTG 450
GAAGCTTCAG GCTACTCCAC AGAGGTGGTG GCCCTGAGCA GGCTGCAGGG 500
GTCTCTGCAG GACATGCTGT GGCAGCTGGA CCTCAGCCCT GGGTGTGAG 550

Fig. 2A

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

GCCTTGAAGG TCACTCTTCC TGCAAGGACT -ACGTTAAGG GAAGGAAGCTC	600
TGGTTTCCAG GTAATCTCCAG GATTGAAGAG CATTGCATGG ACACCCCTTA	650
TCCAGGACTC TGTCAATTTC CCTGACTCCT CTAAGCCACT CTTCCAAAGG	700

Fig. 2B

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

1 MET HIS TRP GLY THR LEU CYS GLY PHE LEU TRP LEU TRP PRO TYR
16 LEU PHE TYR VAL GLN ALA VAL VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
31 THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
46 SER HIS THR GLN SER VAL SER SER LYS GLN LYS VAL THR GLY LEU
61 ASP PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU THR LEU SER LYS MET
76 ASP GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN ILE LEU THR SER MET PRO
91 SER ARG ASN VAL ILE GLN ILE SER ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG
106 ASP LEU LEU HIS VAL LEU ALA PHE SER LYS SER CYS HIS LEU PRO
121 TRP ALA SER GLY LEU GLU THR LEU ASP SER LEU GLY GLY VAL LEU
136 GLU ALA SER GLY TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU
151 GLN GLY SER LEU GLN ASP MET LEU TRP GLN LEU ASP LEU SER PRO
166 GLY CYS END

Fig. 3

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

MOUSE	MCWRPLCRFL	WLWSYLSYVQ	AVPIQKVODD	TKTLIKTIYT	RINDISHTQS	50
	* ** *	* *				
HUMAN	MHWGTLGGFL	WLWPLYLFYVQ	AVPIQKVODD	TKTLIKTIYT	RINDISHTQS	
MOUSE	WSAKQRTVGL	DFIPGLHPIL	SLSKMDQTILA	VYQQVLTSLP	SONVLOIAND	100
	*	-	-	-	*	
HUMAN	VSSKQKVTGL	DFIPGLHPIL	TLSKMDQTILA	VYQQILTSMF	SRNVIOISND	
MOUSE	LENLRDLLHL	LAFSKKCSLP	QTSGLOKPES	LDGVLEASLY	STEVVALSRL	150
		*	** *** *	*	*	
HUMAN	LENLRDLLHV	LAFSKSCHLP	WASGLETIDS	LGGVLEASGY	STEVVALSRL	
MOUSE	QGSLODILQQ	LDVSPEC				167
	- *	- *				
HUMAN	QGSLODMILWQ	LDLSPGC				

Fig. 4

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

1 MET CYS TRP ARG PRO LEU CYS ARG PHE LEU TRP LEU TRP SER TYR
16 LEU SER TYR VAL GLN ALA VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
31 THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
46 SER HIS THR SER VAL SER ALA LYS GLN ARG VAL THR GLY LEU ASP
61 PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU SER LEU SER LYS MET ASP
76 GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN VAL LEU THR SER LEU PRO SER
91 GLN ASN VAL LEU GLN ILE ALA ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG ASP
106 LEU LEU HIS LEU LEU ALA PHE SER LYS SER CYS SER LEU PRO GLN
121 THR SER GLY LEU GLN LYS PRO GLU SER LEU ASP GLY VAL LEU GLU
136 ALA SER LEU TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU GLN
151 GLY SER LEU GLN ASP ILE LEU GLN GLN LEU ASP VAL SER PRO GLU
166 CYS END

Fig. 5

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

1 MET HIS TRP GLY THR LEU CYS GLY PHE LEU TRP LEU TRP PRO TYR
 16 LEU PHE TYR VAL GLN ALA VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
 31 THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
 46 SER HIS THR SER VAL SER SER LYS GLN LYS VAL THR GLY LEU ASP
 61 PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU THR LEU SER LYS MET ASP
 76 GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN ILE LEU THR SER MET PRO SER
 91 ARG ASN VAL ILE GLN ILE SER ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG ASP
 106 LEU LEU HIS VAL LEU ALA PHE SER LYS SER CYS HIS LEU PRO TRP
 121 ALA SER GLY LEU GLU THR LEU ASP SER LEU GLY GLY VAL LEU GLU
 136 ALA SER GLY TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU GLN
 151 GLY SER LEU GLN ASP MET LEU TRP GLN LEU ASP LEU SER PRO GLY
 166 CYS END

Fig. 6

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

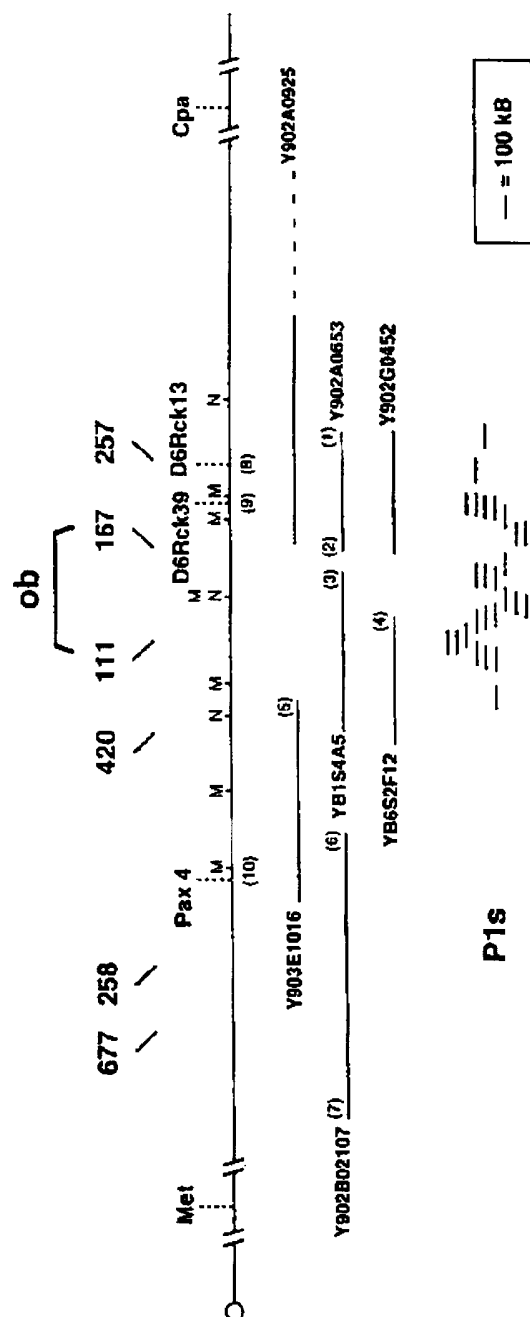


Fig. 7

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

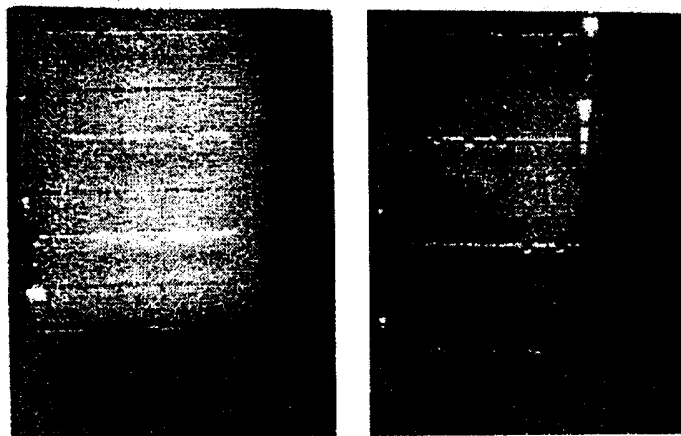


Fig. 8

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

1 2 3 4 5 6 7

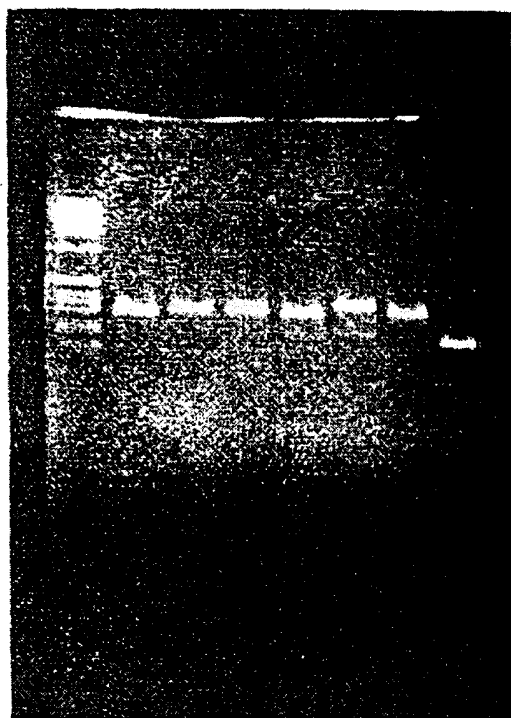


Fig. 9

+10	+20	+30	+40
GTGCAAGAAG	AAGAAGATCC	<u>CAGGGCAGGA</u>	<u>AAATGTGCTG</u> GAGACCCCTG
-----	-----	-----	-----
CACGTTCTTC	TTCTTCTAGG	GTCCCGTCC	TTTACACGAC CTCTGGGGAC
+10	+20	+30	+40
TGTCGGGTCC	NGTGGNITTG	GTCCTATCTG	ICTTATGTC AAGCAGTGCC
-----	-----	-----	-----
ACAGCCCAGG	NCACCNAAAC	CAGGATAGAC	AGAATACANG TTCGTCA <u>GG</u>
+10	+20	+30	+40
TATCCAGAAA	GTCCAGGATG	ACACCAAAG	CCTCATCAAG ACCATTGTCA
-----	-----	-----	-----
<u>ATAGGTCCTT</u>	<u>CAGGTCCTAC</u>	TGIGGTTTTC	GGAGTAGTTC TGGTAACAGT
+10	+20	+30	+40
NCAGGATCAC	TGANATTTC	CACACG	
-----	-----	-----	
NGTCCTAGTG	ACTNTAAAGT	GTGTGC	

Fig. 10

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

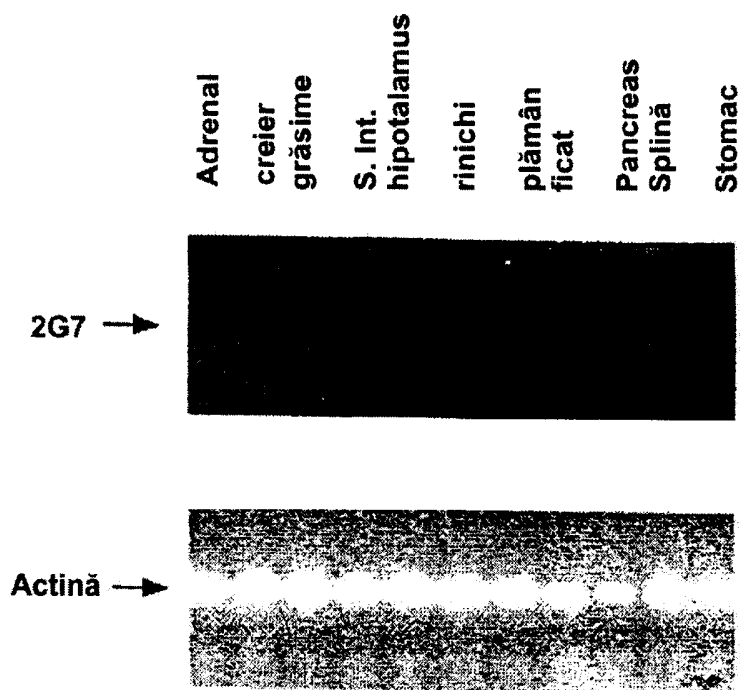


Fig. 11A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

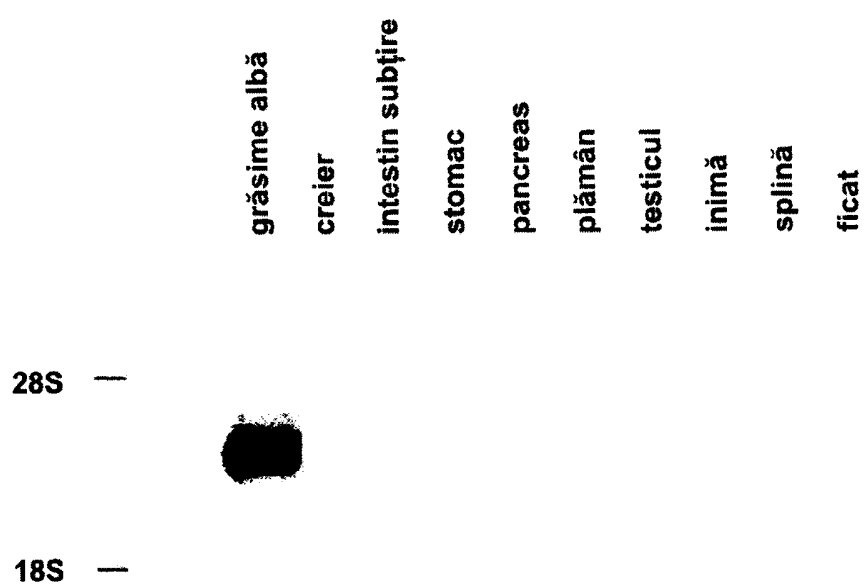


Fig. 11B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)



Fig. 12A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

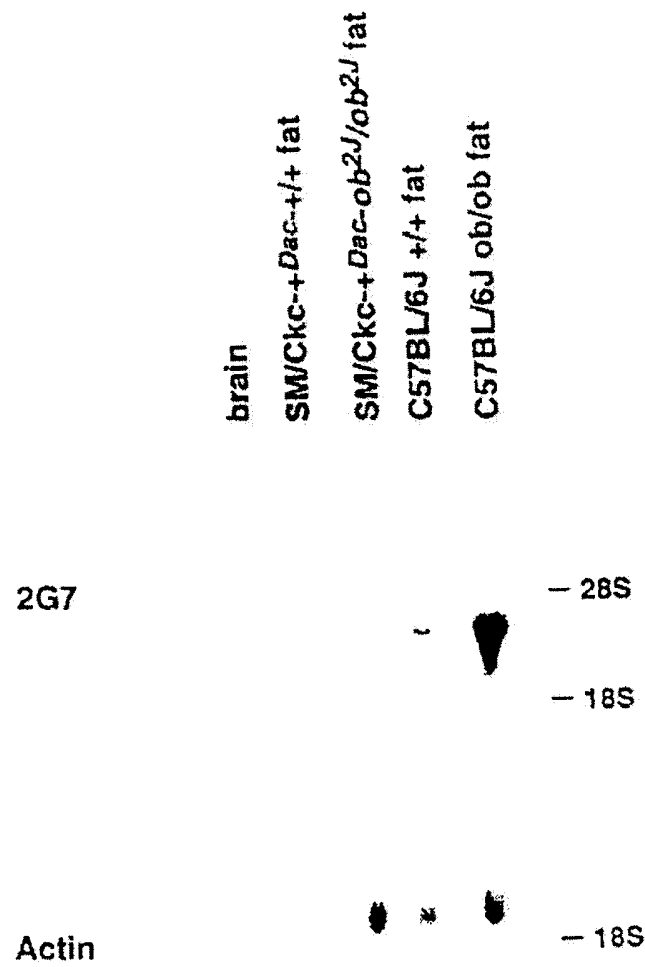


Fig. 12B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

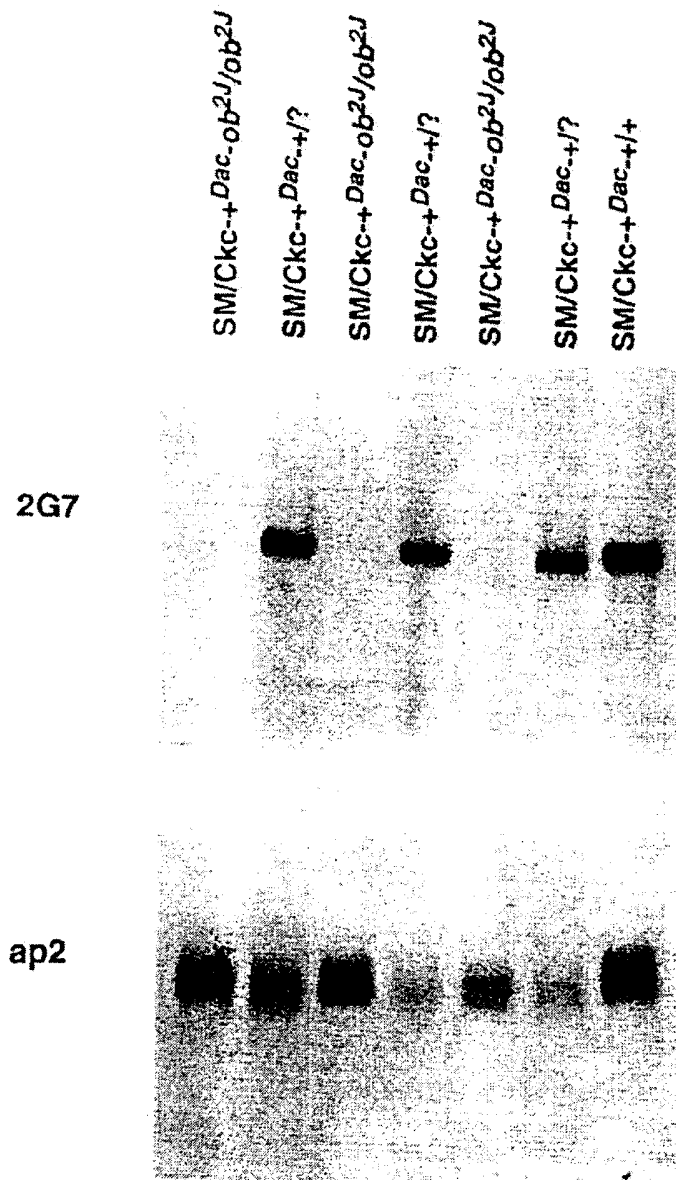


Fig. 13

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

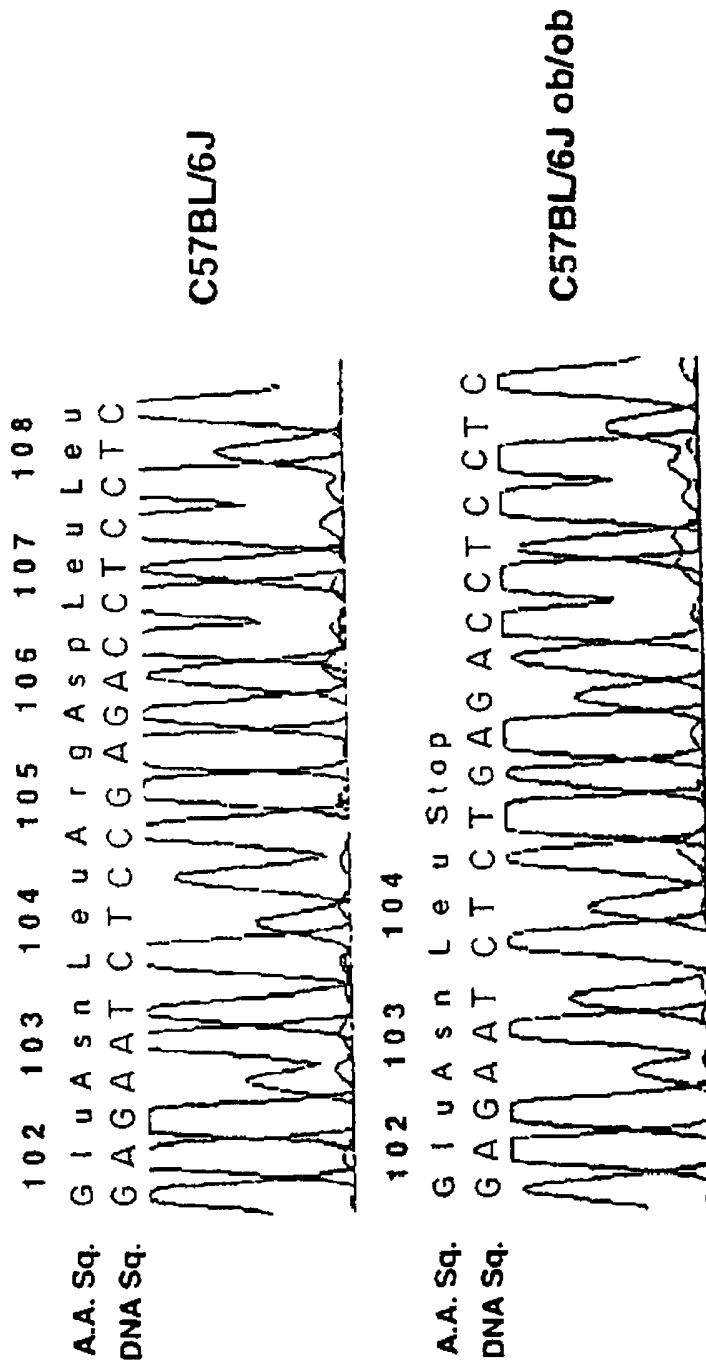


Fig. 14

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.
C12N 15/12 (2006.01);
C07K 14/47 (2006.01);
C12Q 1/68 (2006.01);
A61K 38/17 (2006.01)

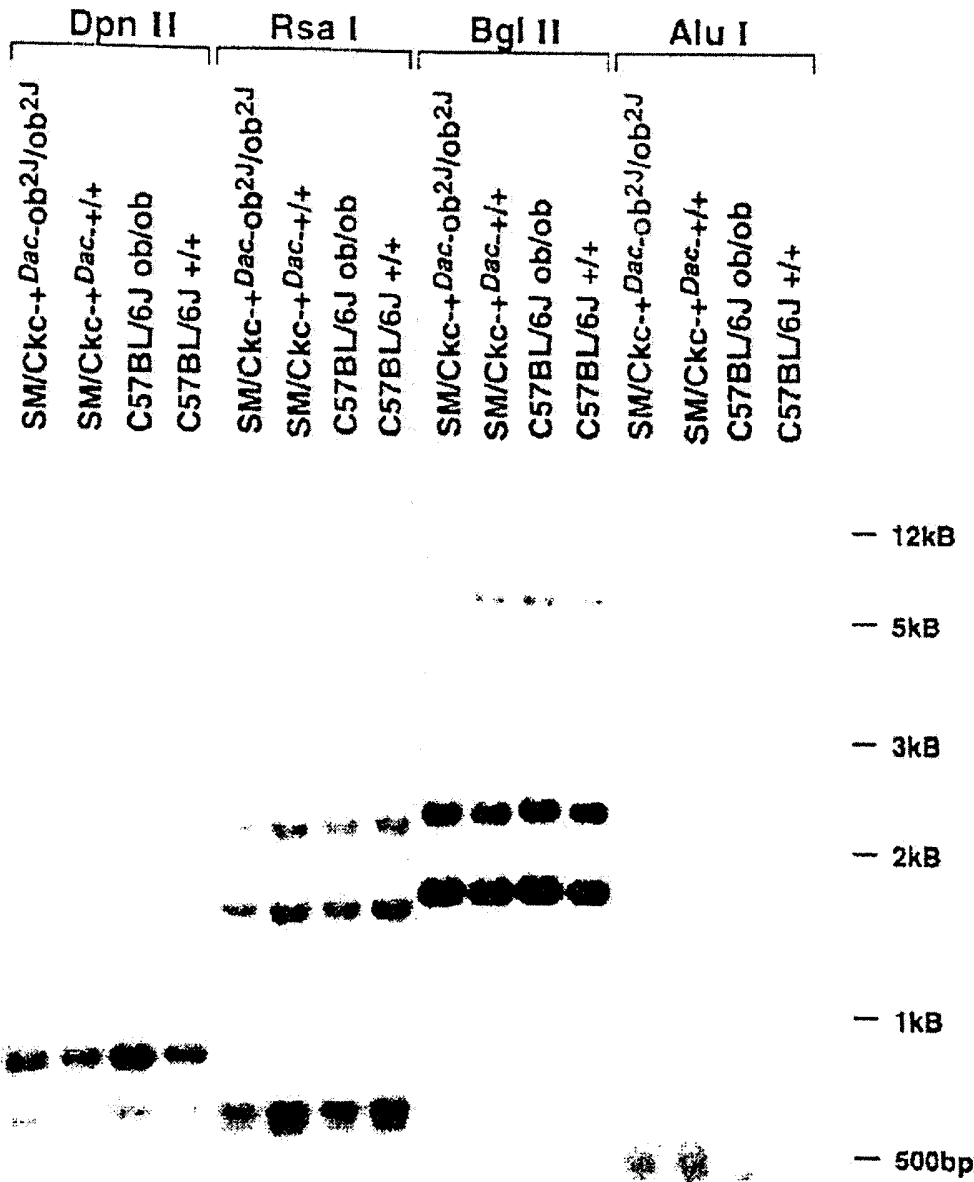


Fig. 15A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

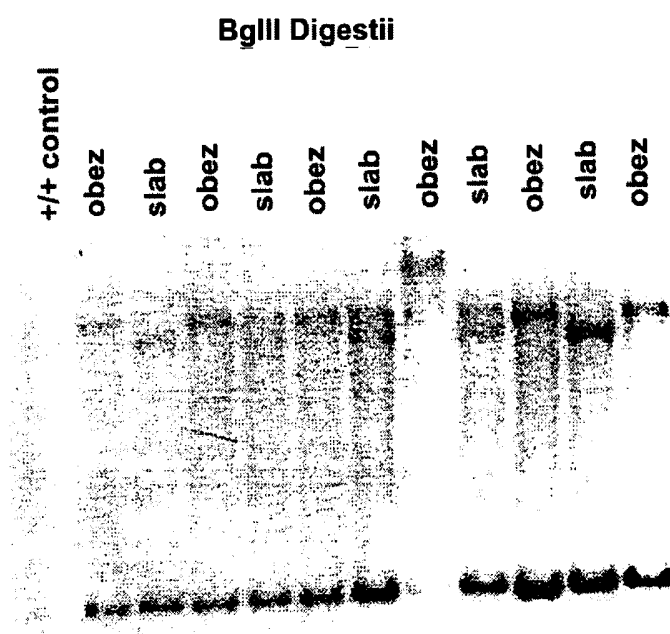


Fig. 15B

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

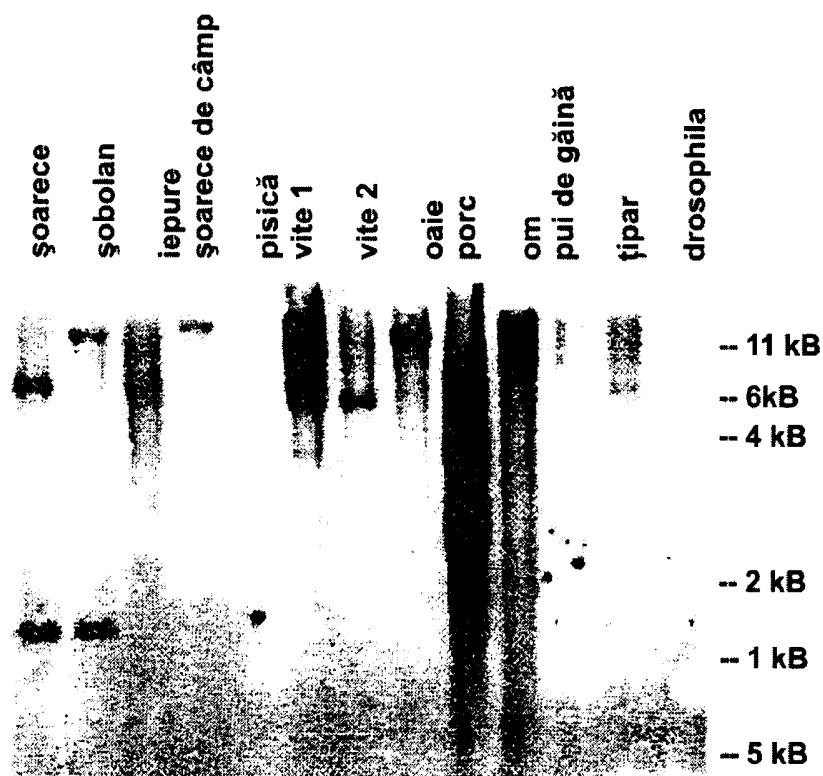


Fig. 16

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

```

T7 PROMOTER PRIMER 69348-1
----->
      BGLII
      AGATCTCGATCCGCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGGGGATAACAATCCCTCTACA
      T7 PROMOTER
      ----->
      LAC OPERATOR
      XBAI
      AATAATTFTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGC
      RBS
      NCOI
      HIS-TAG
      METGLYSERSESHISHISHISSESRGLY
      NOEI
      XHOI
      BAMHI
      CTGGTCCGCGCGGCGGAGCCATATGCTCGAGGATCCCGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAGCTGAGTTGGCT
      LEUVALPROARGGLYSEHISMETLEUGLUASPProALAALAAASNLYSALAARGLYSGLUALAGLULEALA
      THROMBIN
      BpuJI1021
      GCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTG
      ALAALATHRALAGLULNEND
      <-----
      T7 TERMINATOR PRIMER #69337-1
  
```

Fig. 17

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

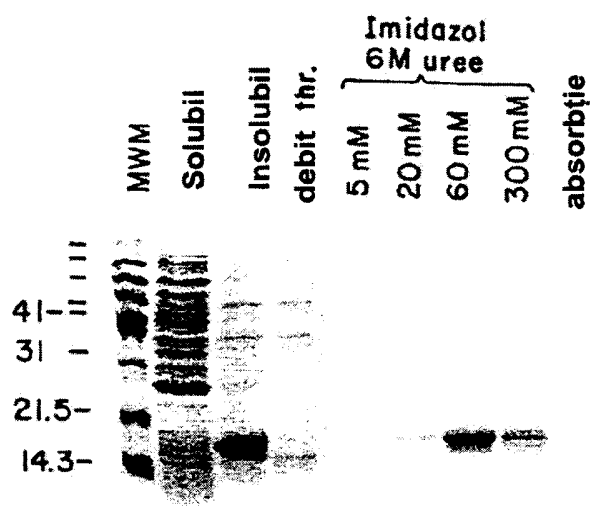


Fig. 18A

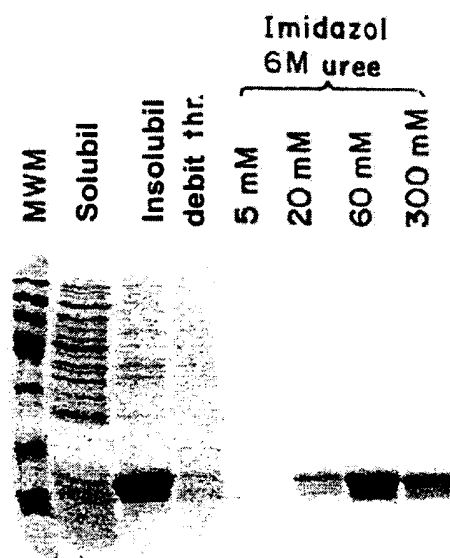


Fig. 18B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

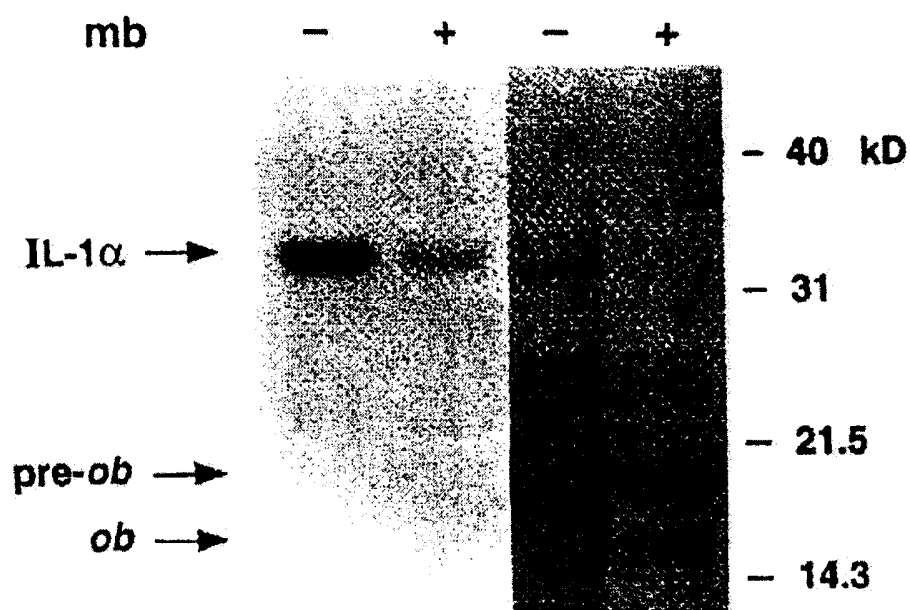


Fig. 19A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

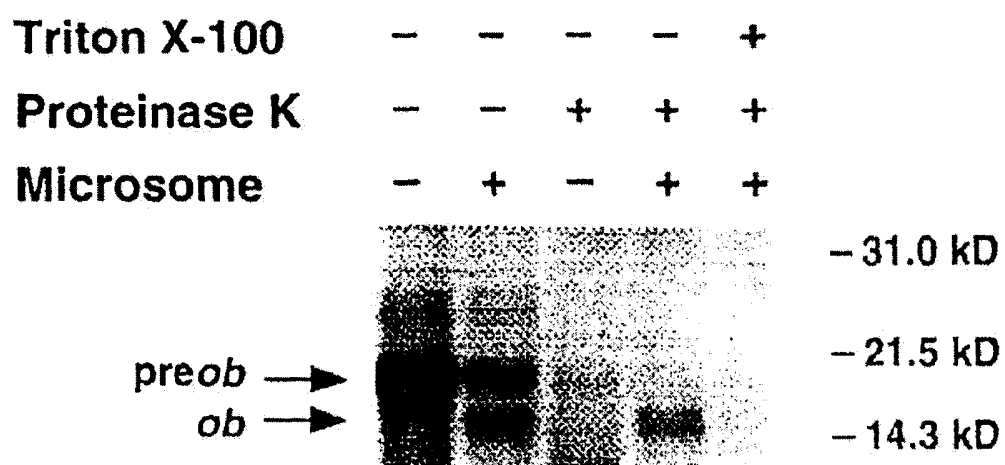


Fig. 19B

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

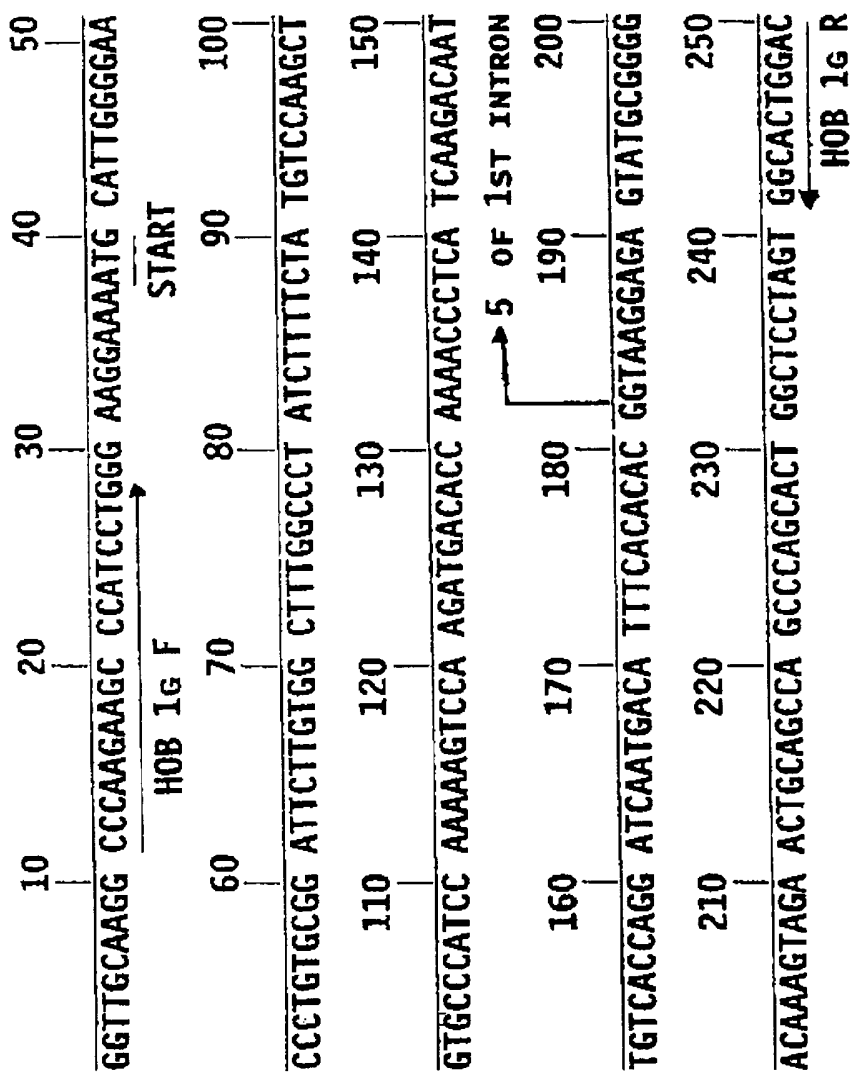


Fig. 20A

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
CCAGATAGTC CAAGAAACAT TTATTGAACG CCTCCTGAAT GCCAGGCACC
 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
TACTGGAAGC TGAGAAGGAT TTGGATAGC ACAGGGCTCC ACCTTTCTG
 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
GTTGTTTCTT NTGGCCCCCT CTGCCTGCTG AGATNCCAGG GGTTAGNGGT
 410 | 420 | 430 | 440 | 450 |
TCTTAATTCC TAAA-----
 GAP OF SEQUENCE (~1.4 KB)
 -----CT
 460 | 470 | 480 | 490 | 500 |
GGTTCTTTCA GGAAGAGGCC ATGTAAGAGA AAGGAATTGA CCTAGGGAAA

Fig. 20B

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

510 520 530 540 550
 ATTGGCCTGG GAAGTGGAGG GAACGGATGG TGTGGGAAA GCAGGAATCT

560 570 580 590 600
 CGGAGACCAG CITAGAGGCT TGGCAGTCAC CTGGGTGCAG GANACAAGGG

610 620 630 640 650
 CCTGAGCCAA AGTGGTGAGG GAGGGTGGA GGAGACAGCC CAGAGAATGA

660 670 680 690 700
 CCCTCCATGC CCACGGGGAA GGCAGAGGGC TCTGAGAGCG ATTCCCTCCA

710 720 730 740 750
 CATGCTGAGC ACTTGTTCTC CCTCTTCCTC CINCATAGCA GTCAGTCTCC

HOB 2g F

3 OF 1ST INTRON 4

Fig. 20C

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

760	770	780	790	800
<u>TCCAAACAGA AAGTCACCGG TTTGGACTTC ATTCTGGGC TCCACCCCAT</u>				
810	820	830	840	850
<u>CCTGACCITA TCCAAGATGG ACCAGACACT GGCAGTCTAC CAACAGATCC</u>				
860	870	880	890	900
<u>TCACCAGTAT GCCTTCCAGA AACGTGATCC AAATATCCAA CGACCTGGAG</u>				
910	920	930	940	950
<u>AACCTCCGGG ATCTTCTTCA CGTGCTGCC TTCTCTAAGA GCTGCCACTT</u>				
960	970	980	990	1000
<u>GCCCTGGGCC AGTGGCCTGG AGACCTTGGG CAGCCTGGGG GGTGTCCTGG</u>				

Fig. 20D

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

1010	1020	1030	1040	1050
<u>AAGCTTCAGG CTATCCACA GAGGTGGTGG CCTGAGCAG GCTGCAGGGG</u>				
1060	1070	1080	1090	1100
<u>TCTCTGCAGG ACATGCTGTG GCAGCTGGAC CTCAGCCCTG GGTGCTGAGG</u>				
				STOP
1110	1120	1130	1140	1150
<u>CCTTGAAGGT CACTCTTCTT GCAAGGACTA CGTTAAGGGA AGGAACTCTG</u>				
1160	1170	1180	1190	1200
<u>GCCTTCCAGG TATCTCCAGG ATTGAAGAGC ATTGCATGGA CACCCCTTAT</u>				
HOB 2G R				
1210	1220	1230	1240	1249
<u>CCAGGACTCT GTCAATTTC CTGACTCCCTC TAAGCCACTC TTCCAAAGG</u>				

Fig. 20E

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

structura OB la șoarece

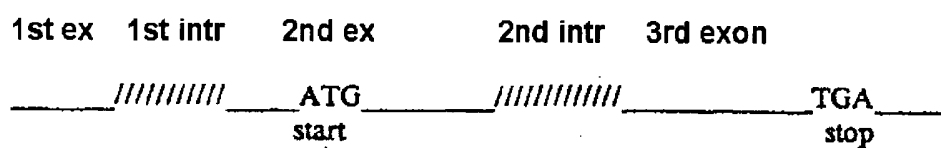


Fig. 20F

structura OB umană

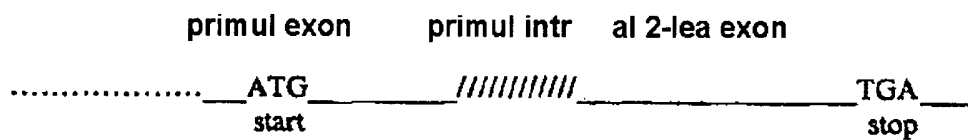


Fig. 20G

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

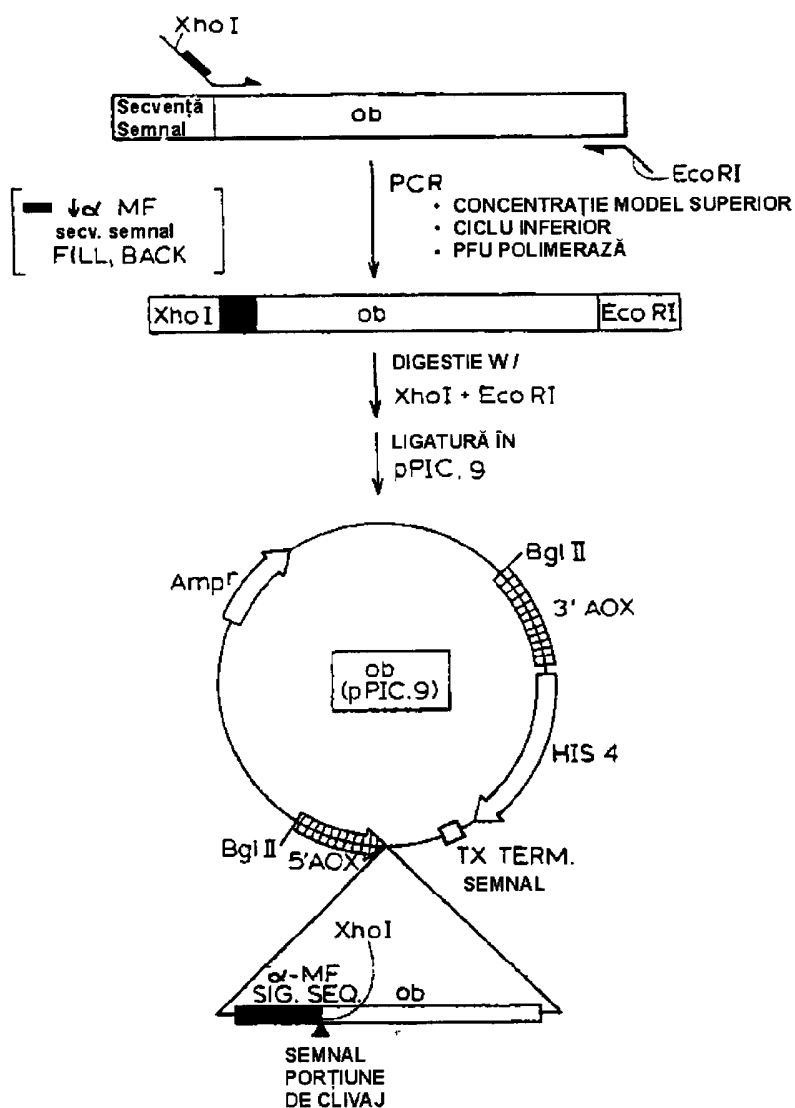


Fig. 21A

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

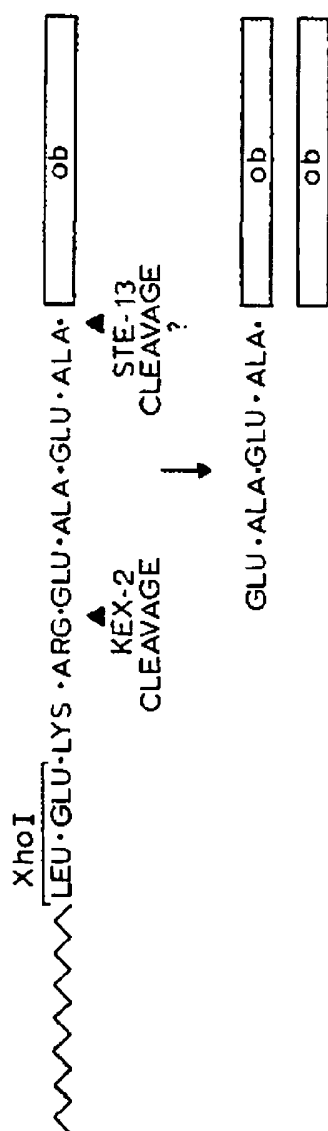


Fig. 21B

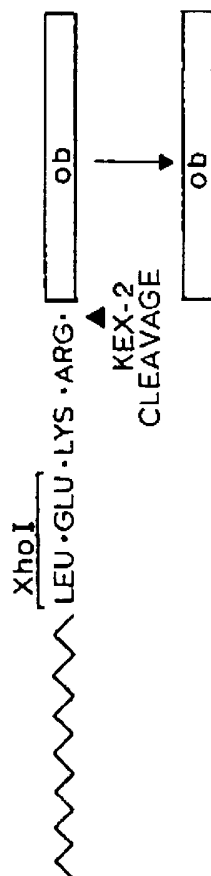


Fig. 21C

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

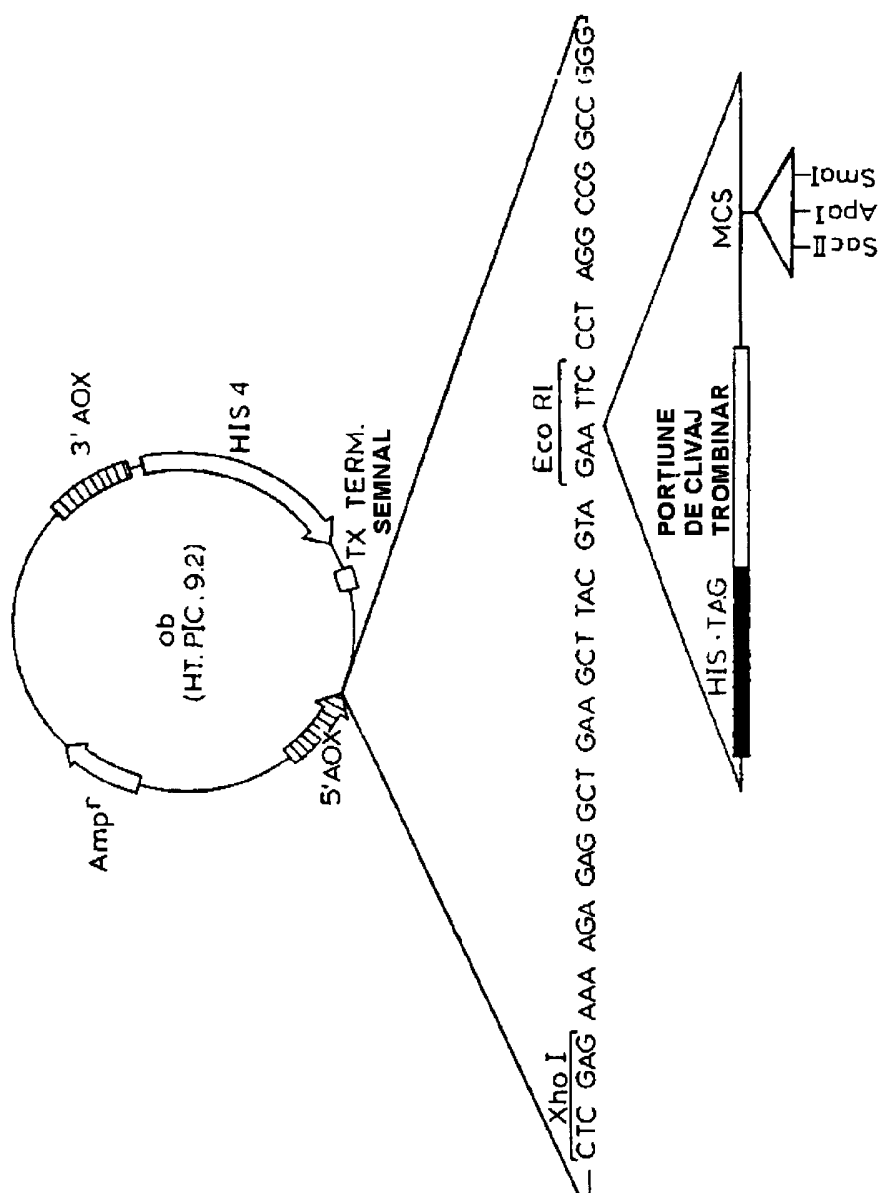


Fig. 22A

(51) Int.Cl.
C12N 15/12 (2006.01);
C07K 14/47 (2006.01);
C12Q 1/68 (2006.01);
A61K 38/17 (2006.01)

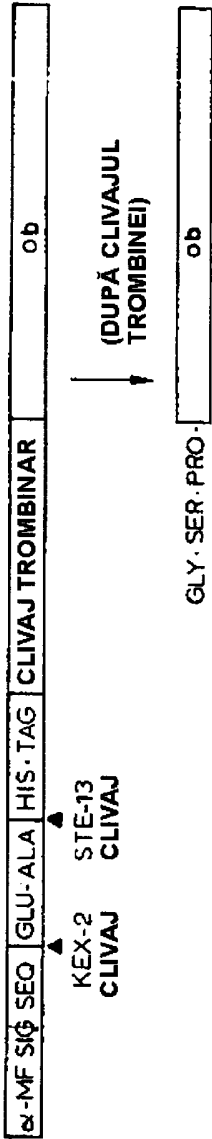


Fig. 22B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

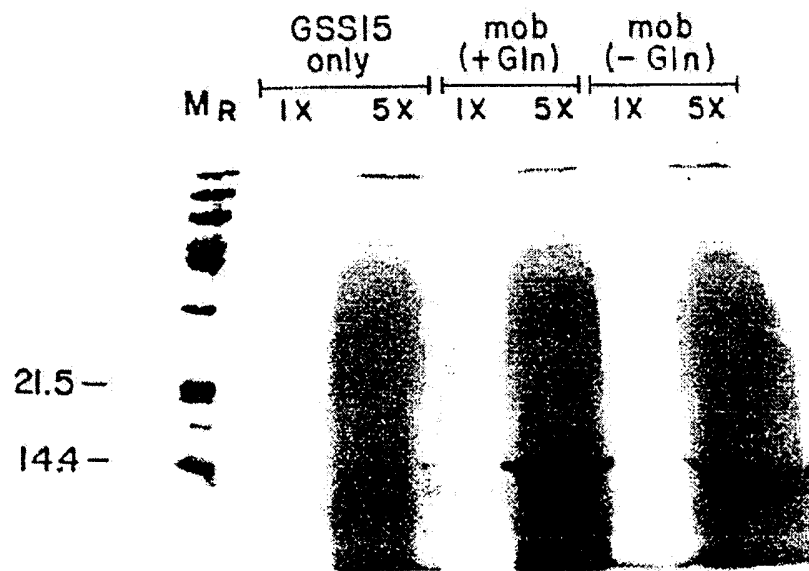


Fig. 23A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

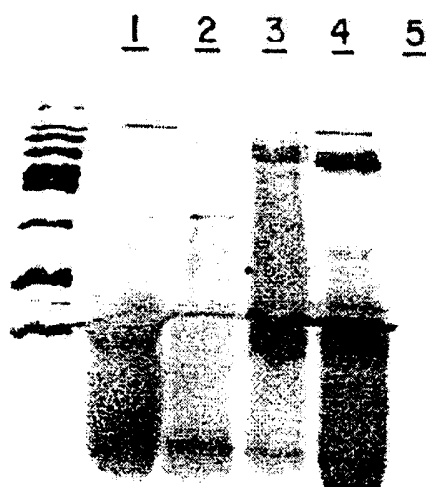


Fig. 23B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

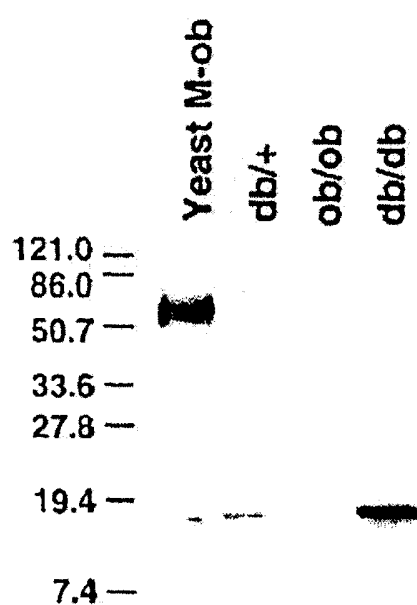


Fig. 24A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

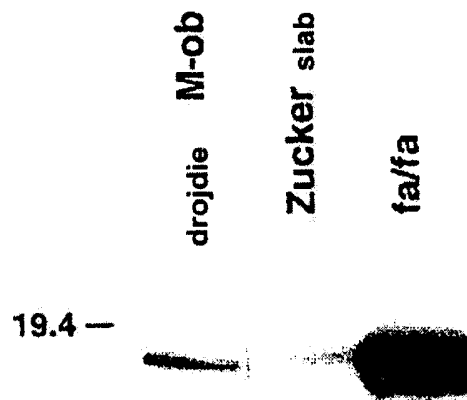


Fig. 24B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

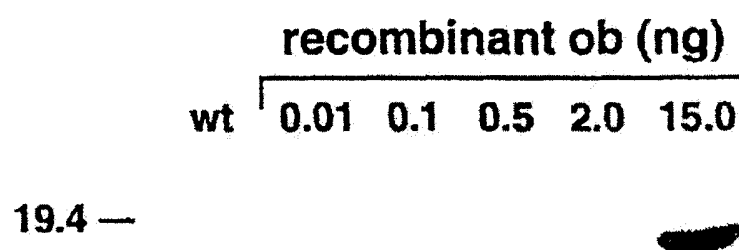


Fig. 24C

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)



Fig. 24D

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

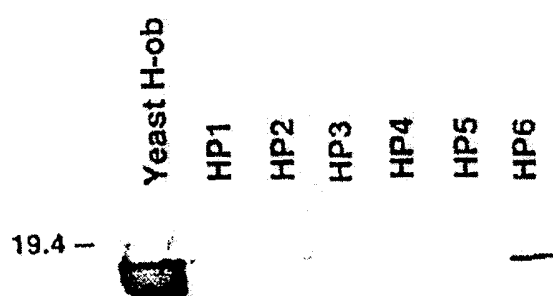


Fig. 25A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

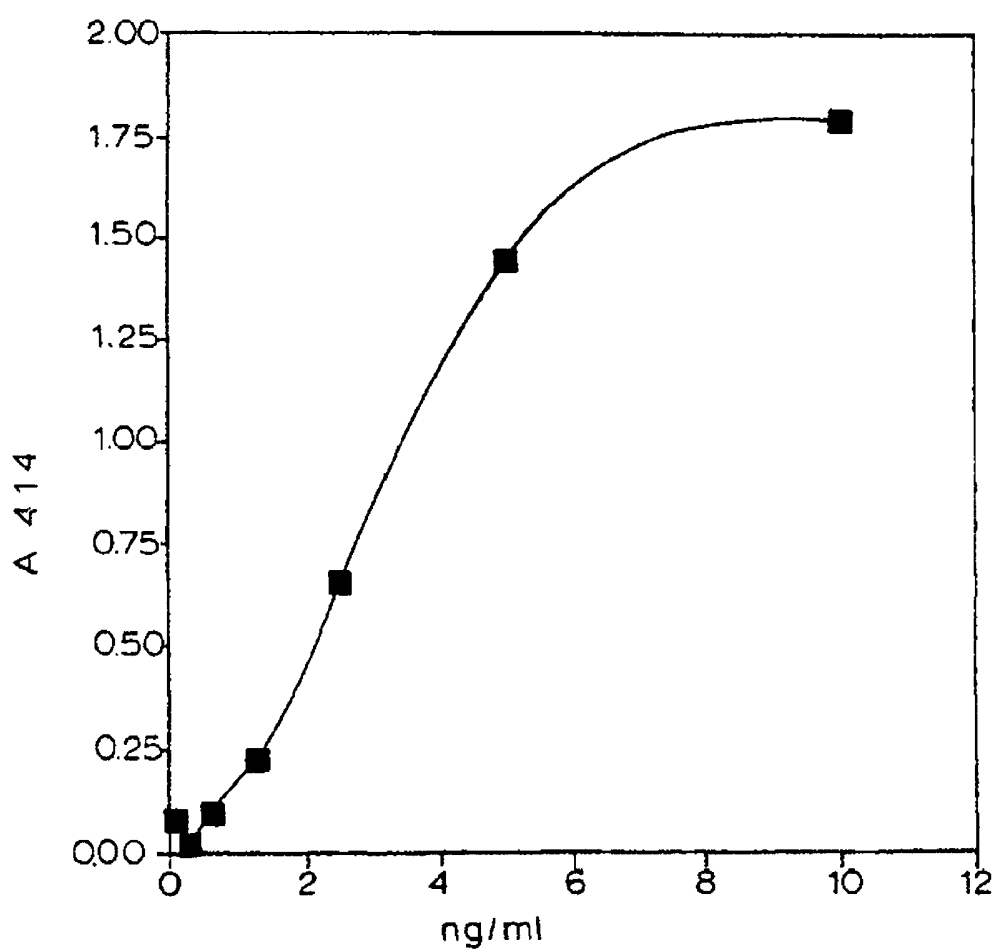


Fig. 25B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

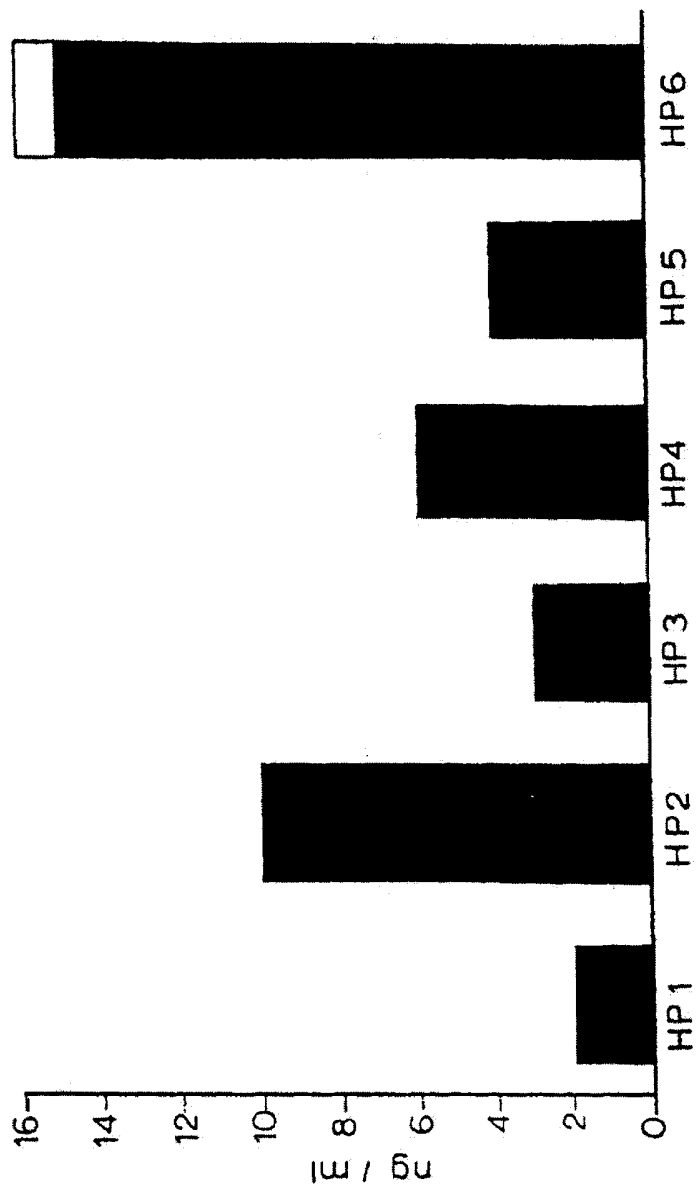


Fig. 25C

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

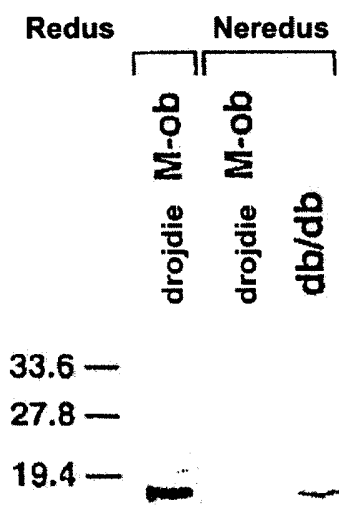


Fig. 26A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

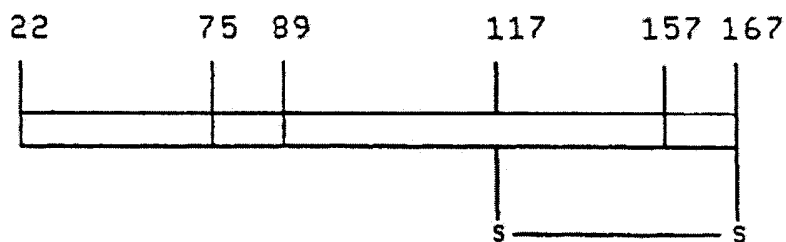
C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

ob uman



Peptidă	Masa (Da)	
	Prevăzut	Observat
22-167	16,024	16,024 ± 3
22-75	5936.9	5936.6 ± 1
76-89	1562.7	N.D.
90-167	8434.5	8435.6 ± 1
158-167	1131.9	N.D.

Fig. 26B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

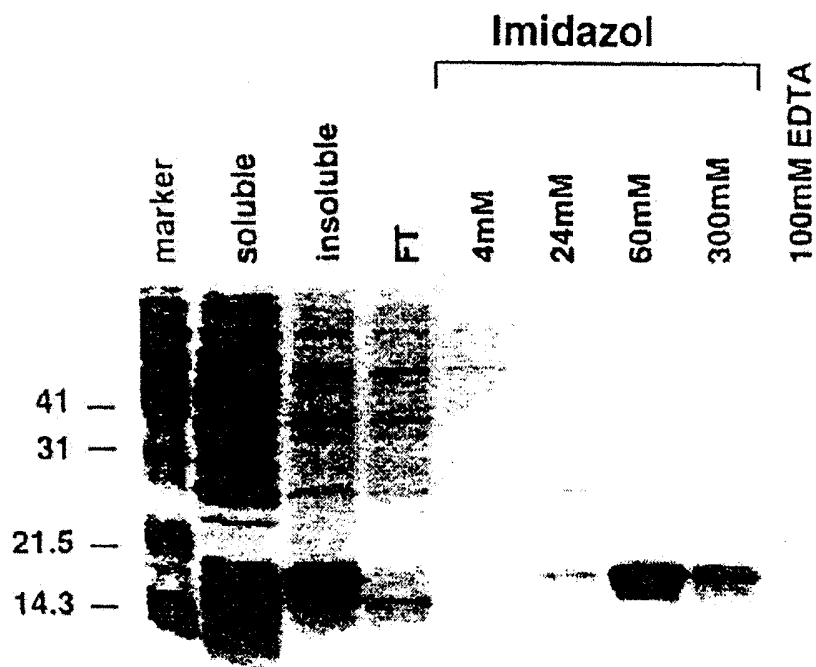


Fig. 27

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

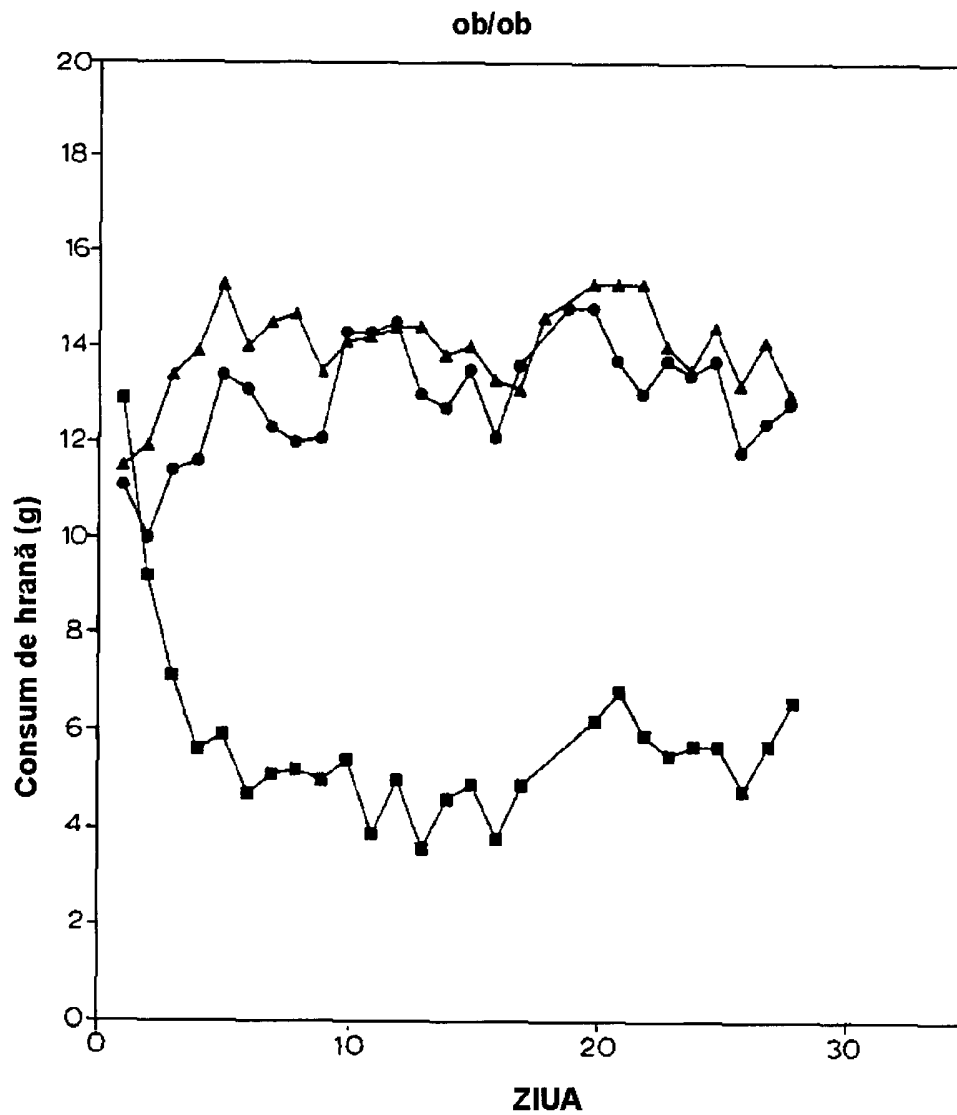


Fig. 28A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

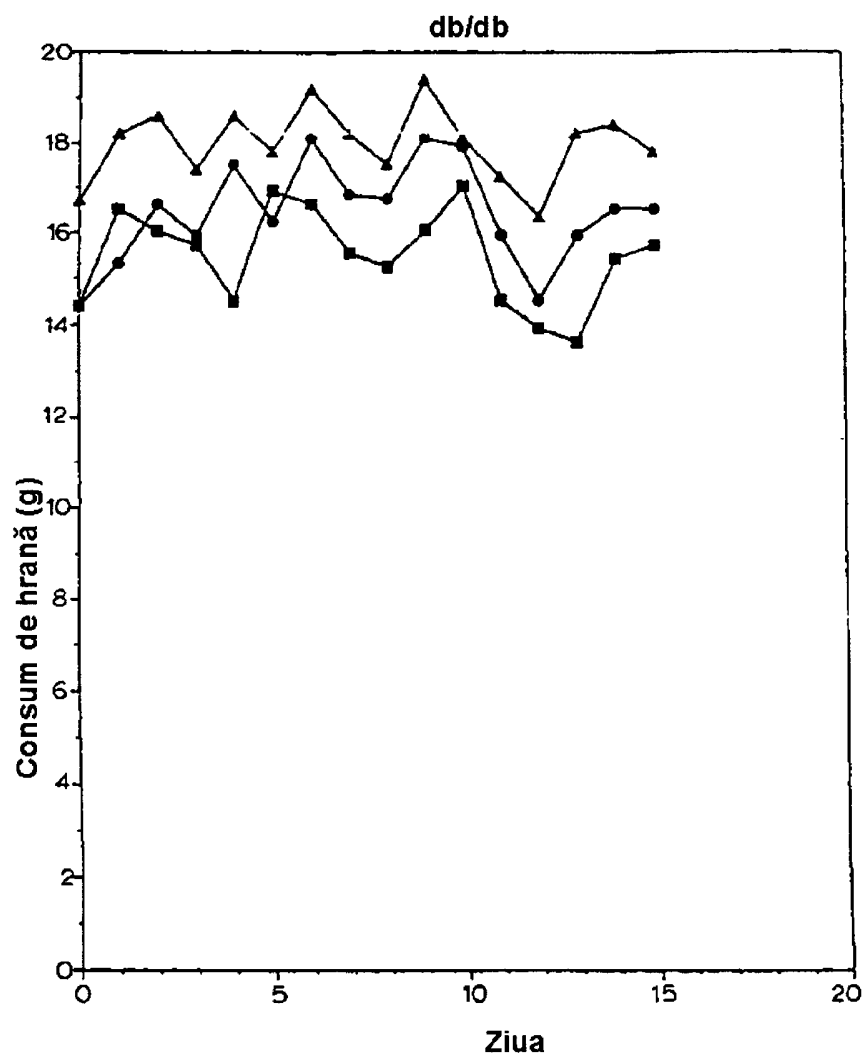


Fig. 28B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

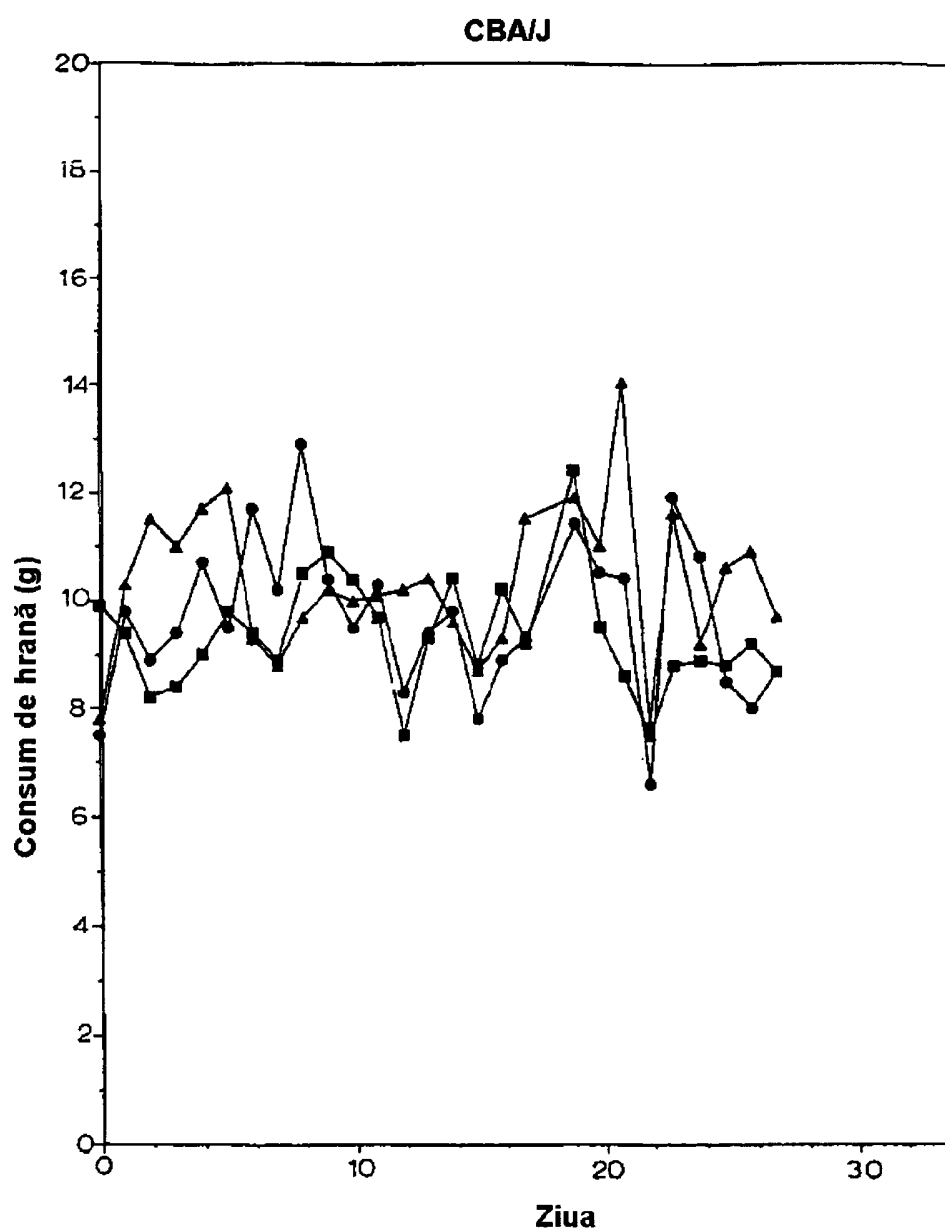


Fig. 28C

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

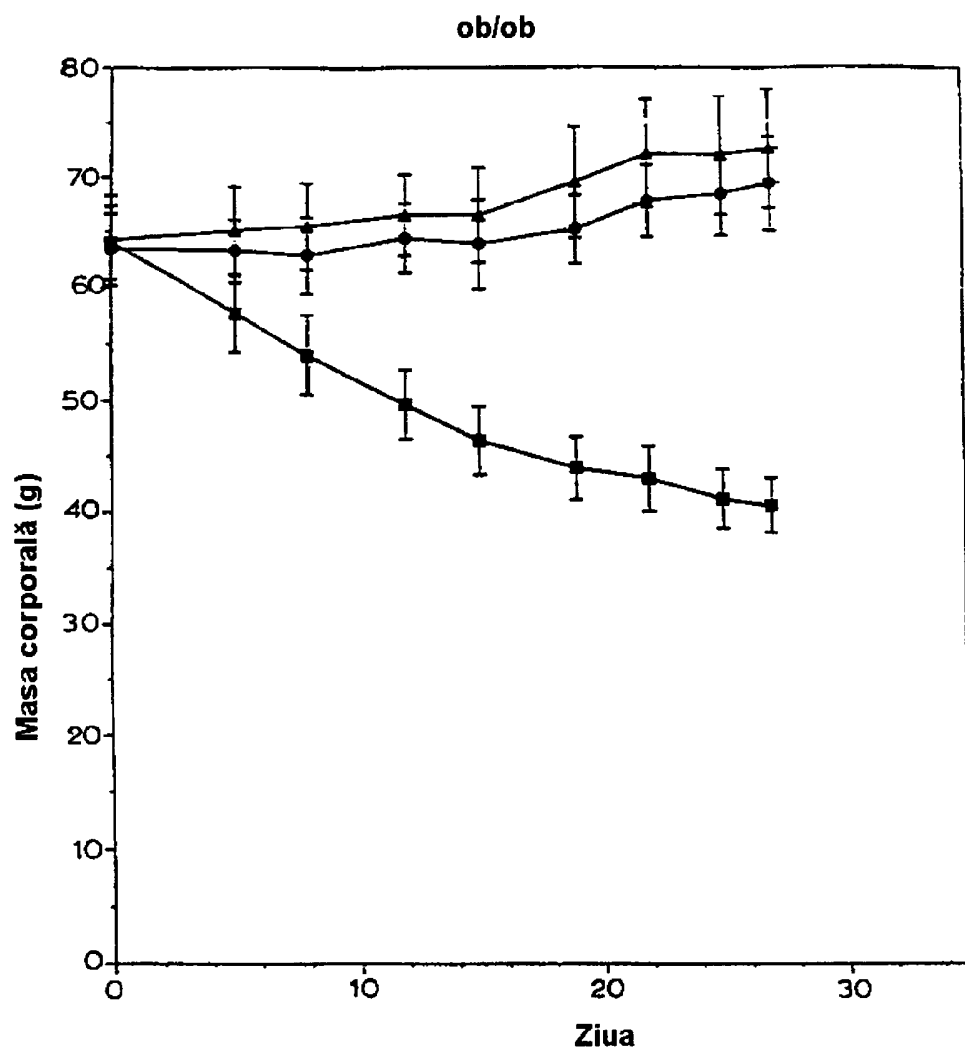


Fig. 28D

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

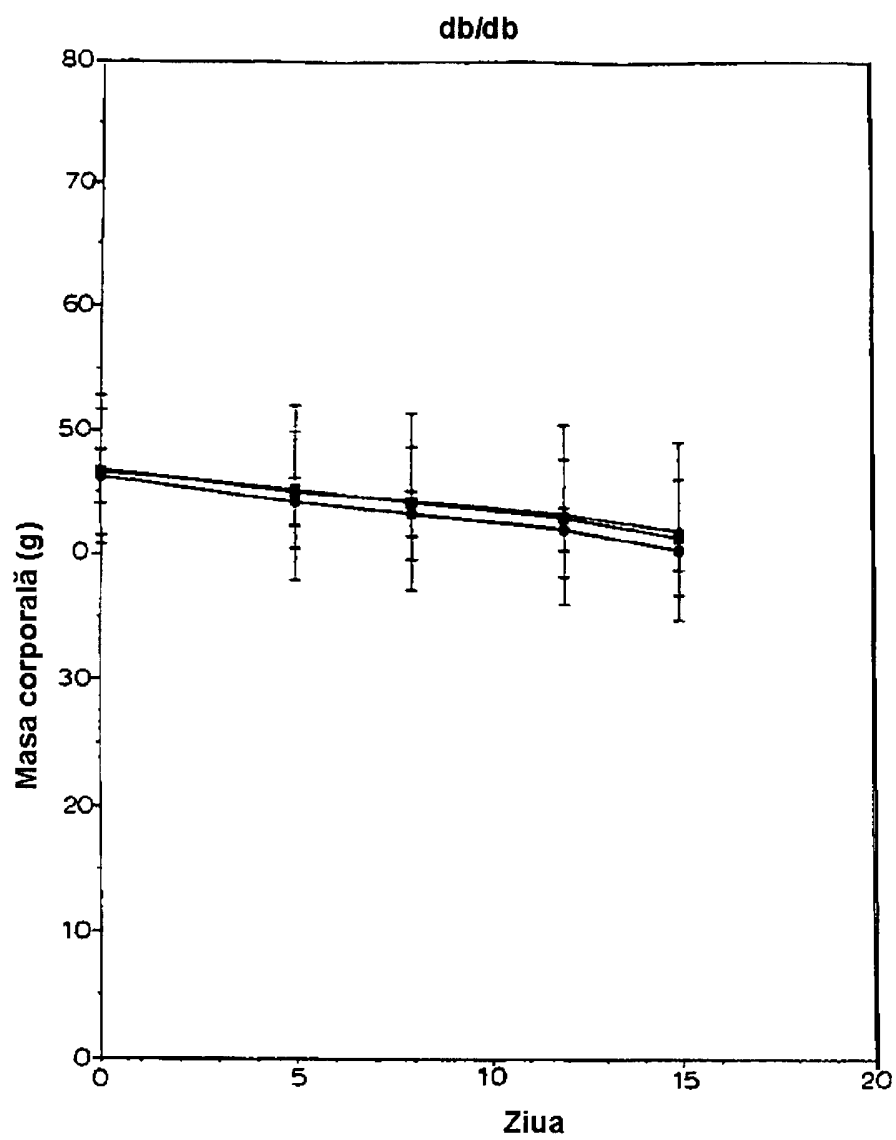


Fig. 28E

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

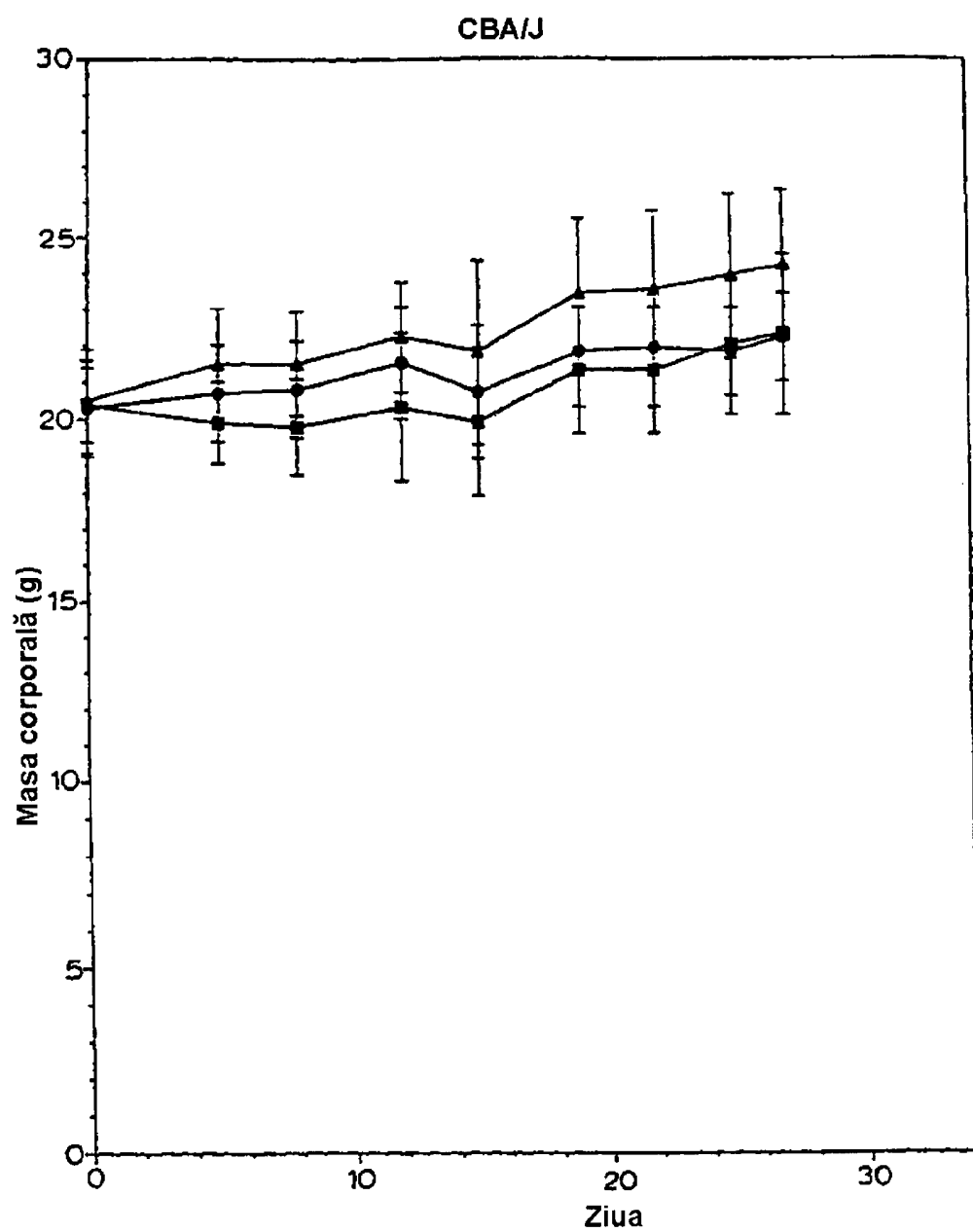


Fig. 28F

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

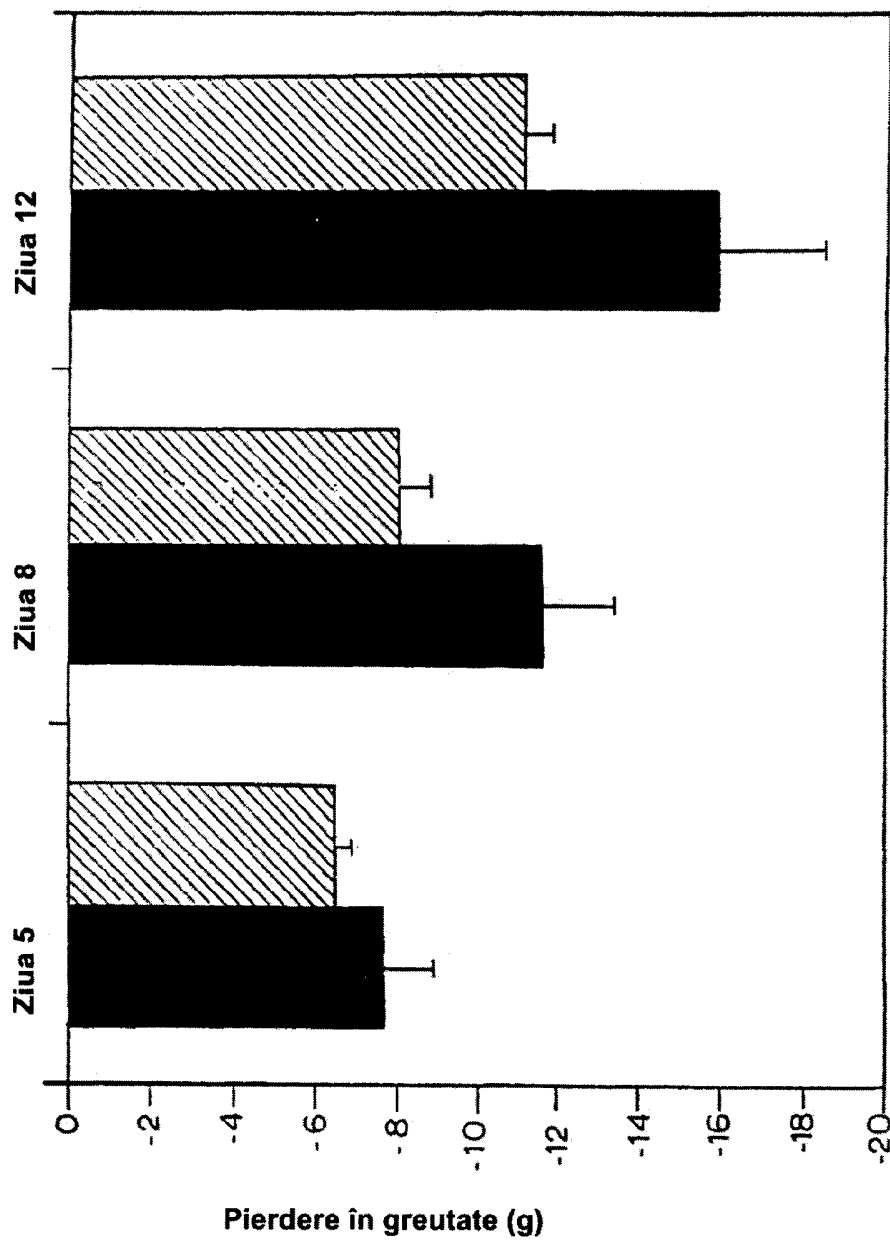


Fig. 29A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

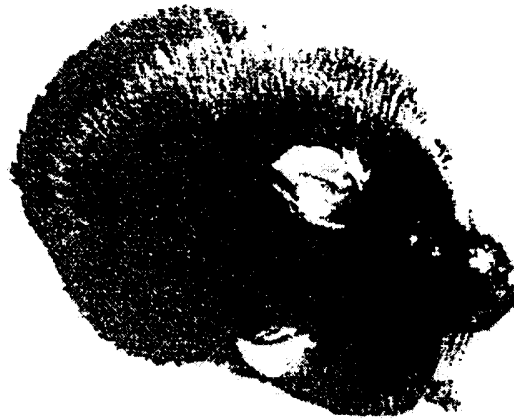


Fig. 29B

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)



Fig. 29C

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

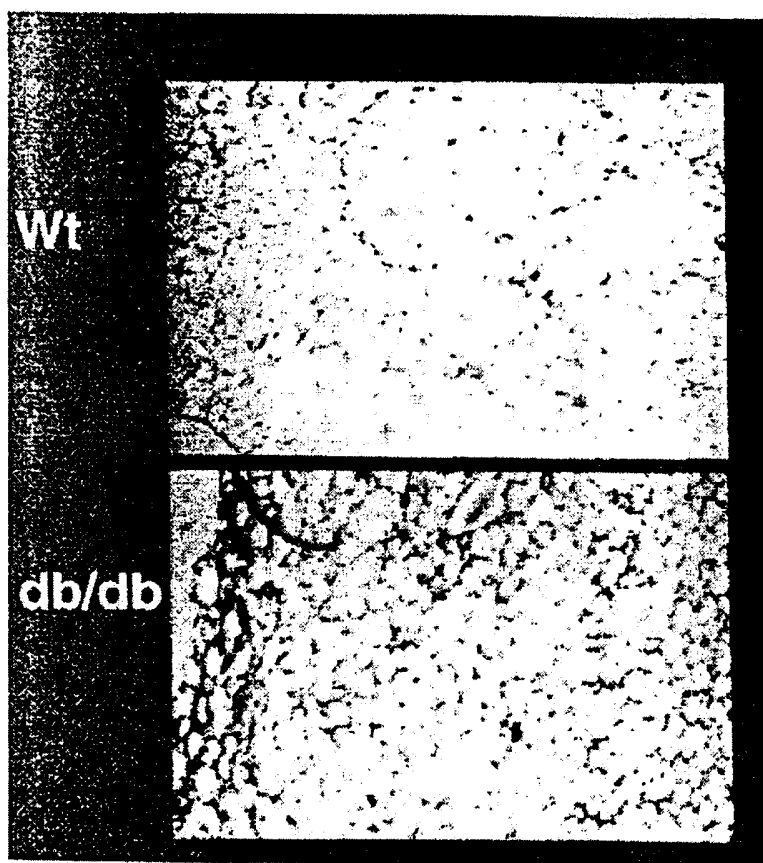


Fig. 30

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

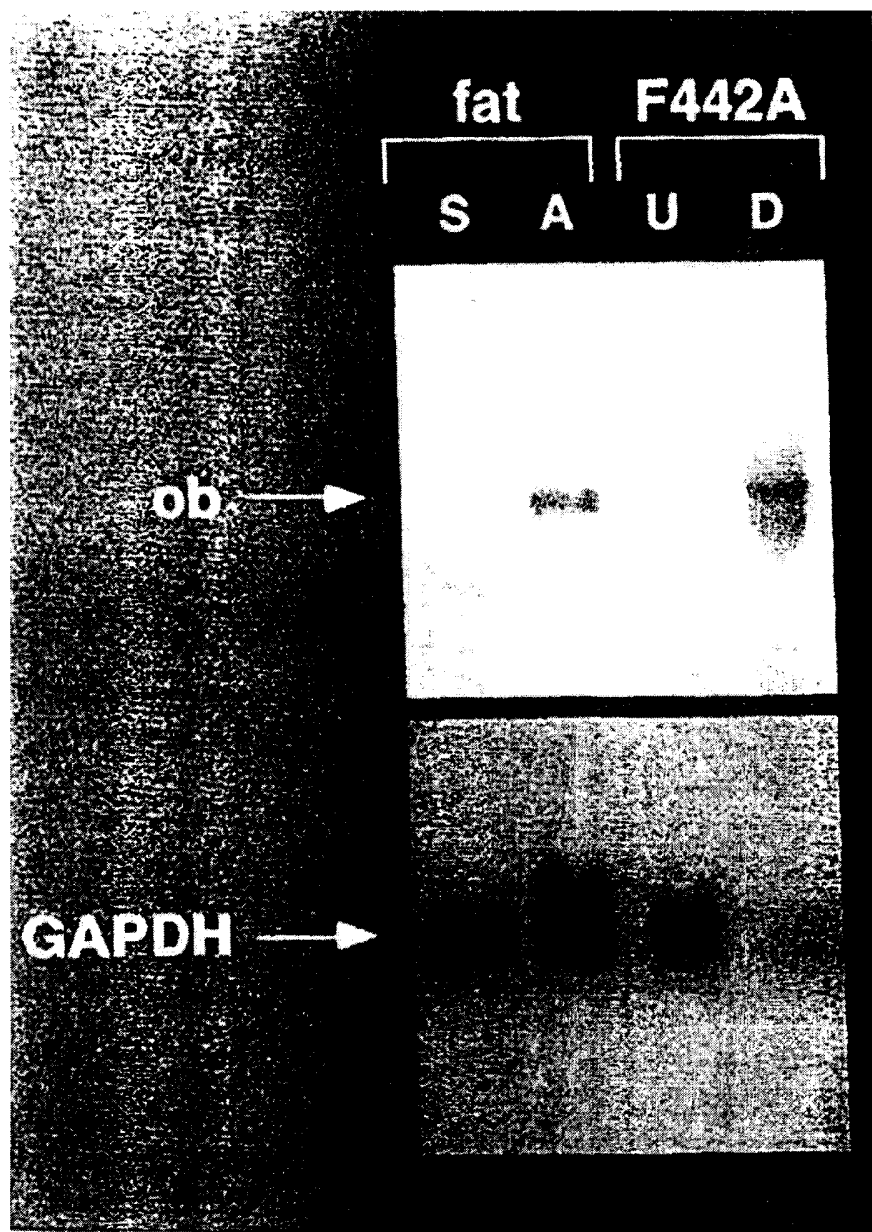


Fig. 31

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

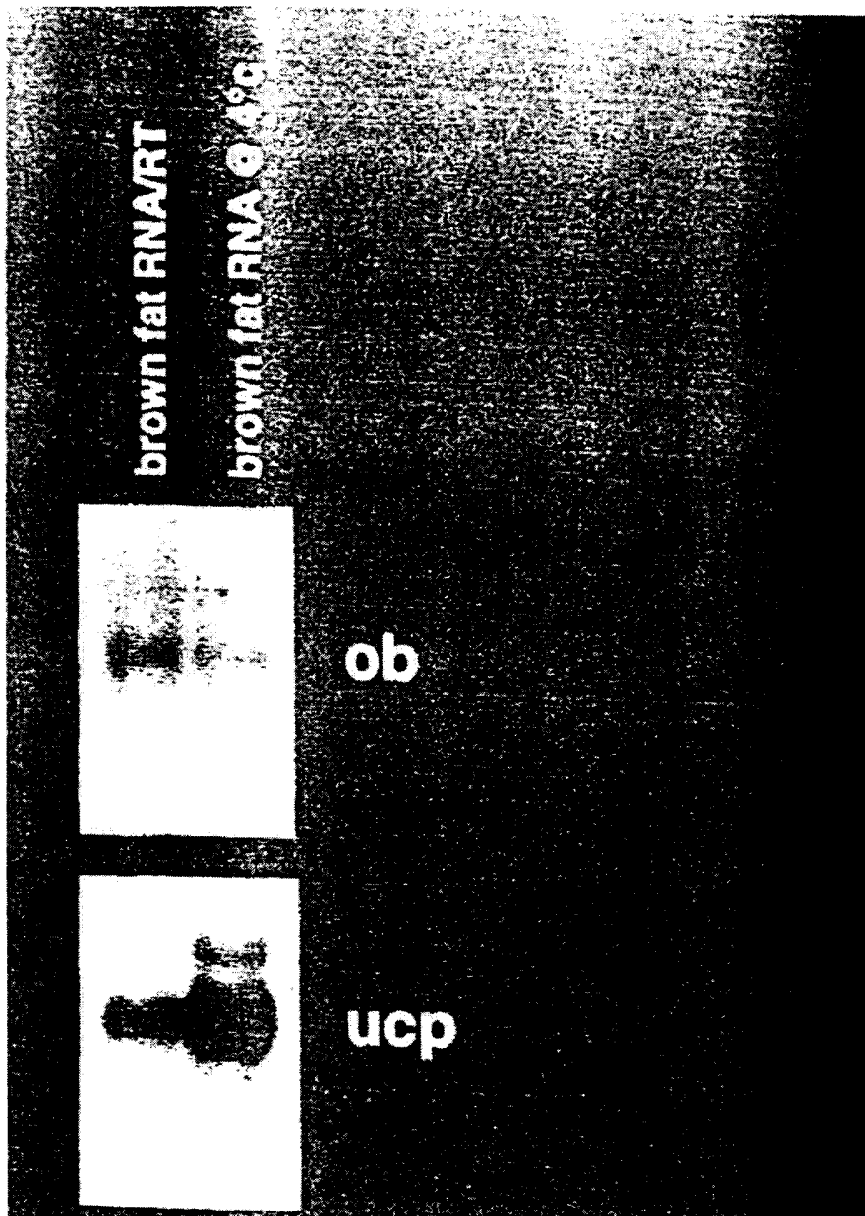


Fig. 32B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

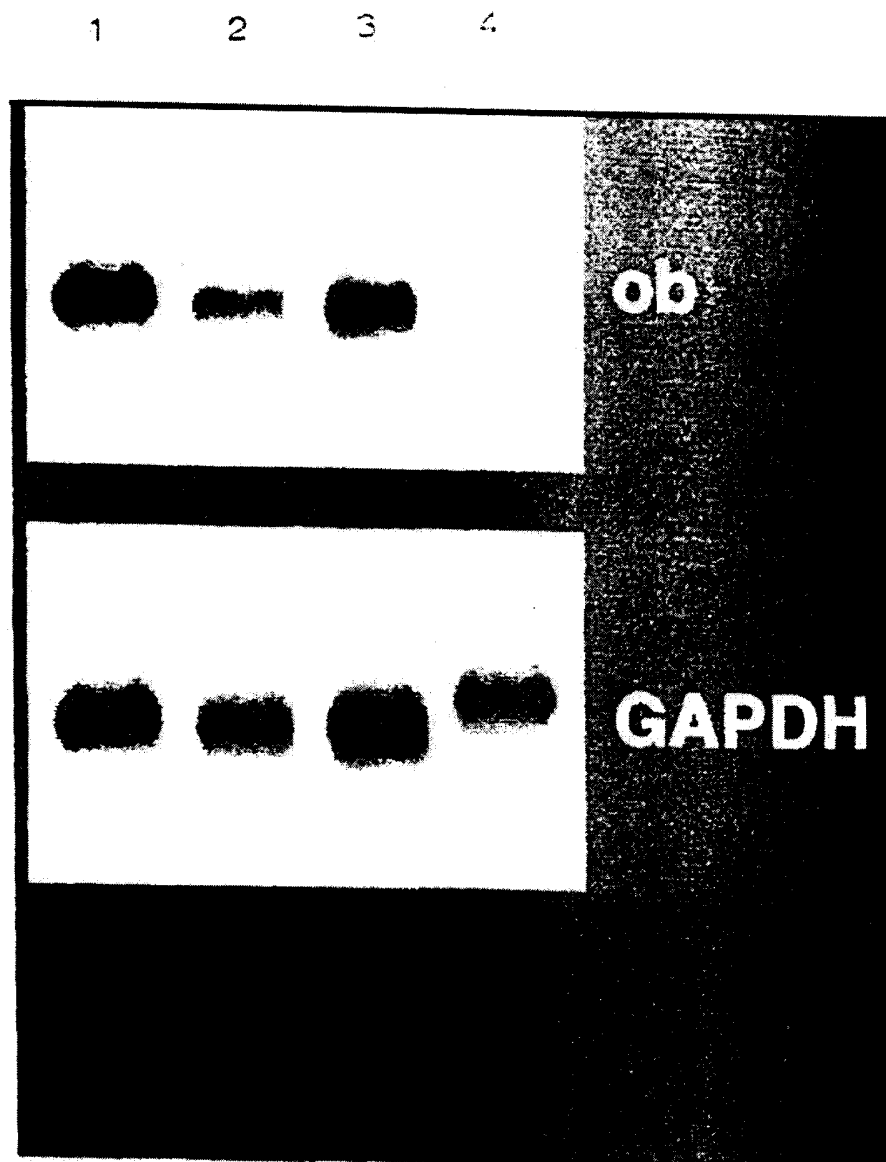


Fig. 32A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

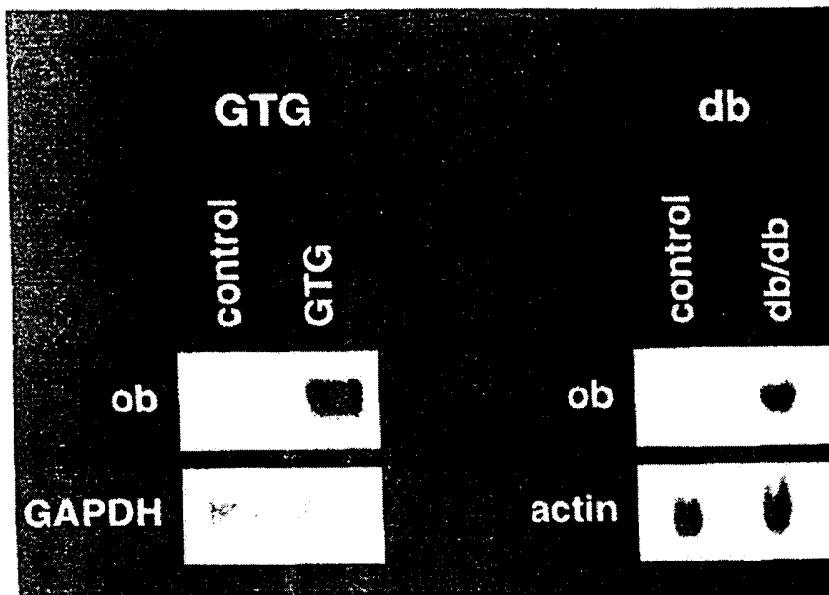


Fig. 33

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

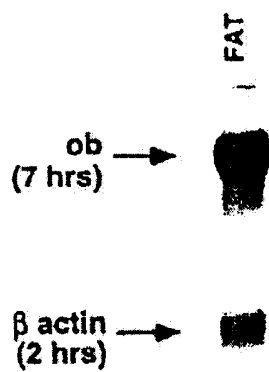


Fig. 34A



Fig. 34B

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

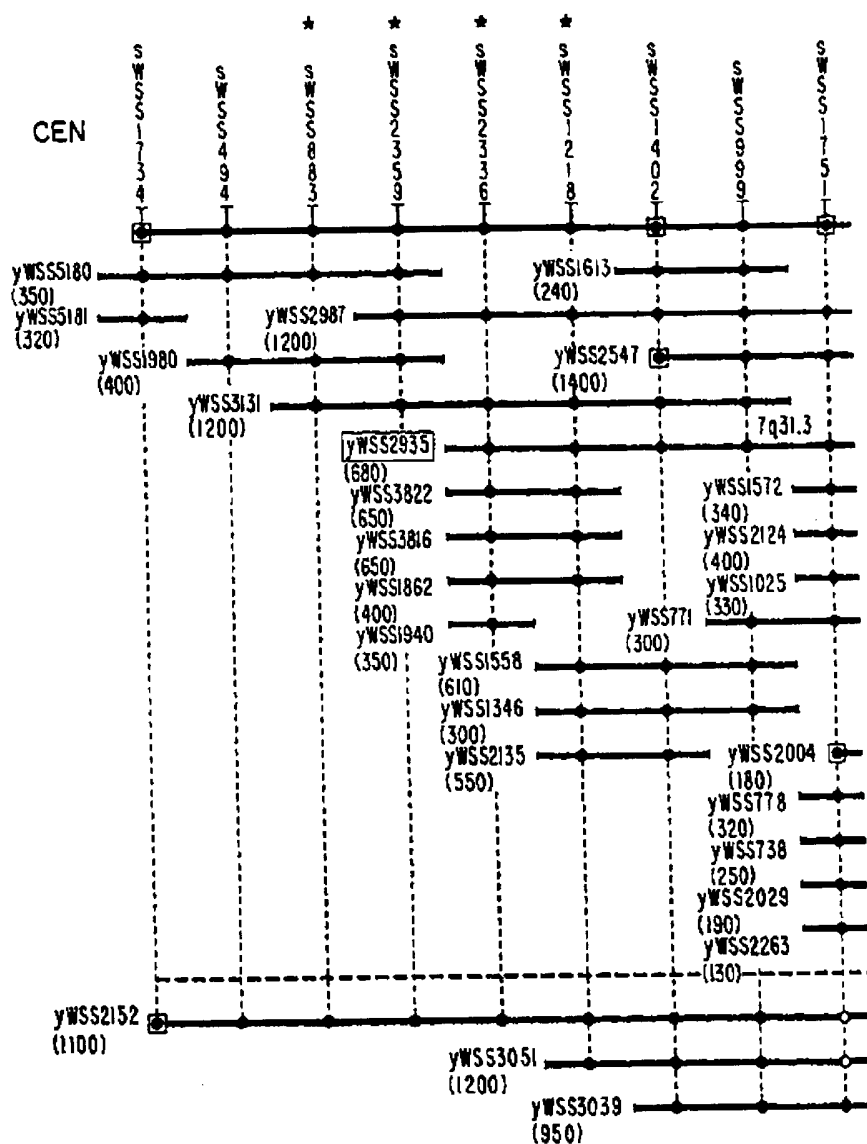


Fig. 35A

RO 121036 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01);

C07K 14/47 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01);

A61K 38/17 (2006.01)

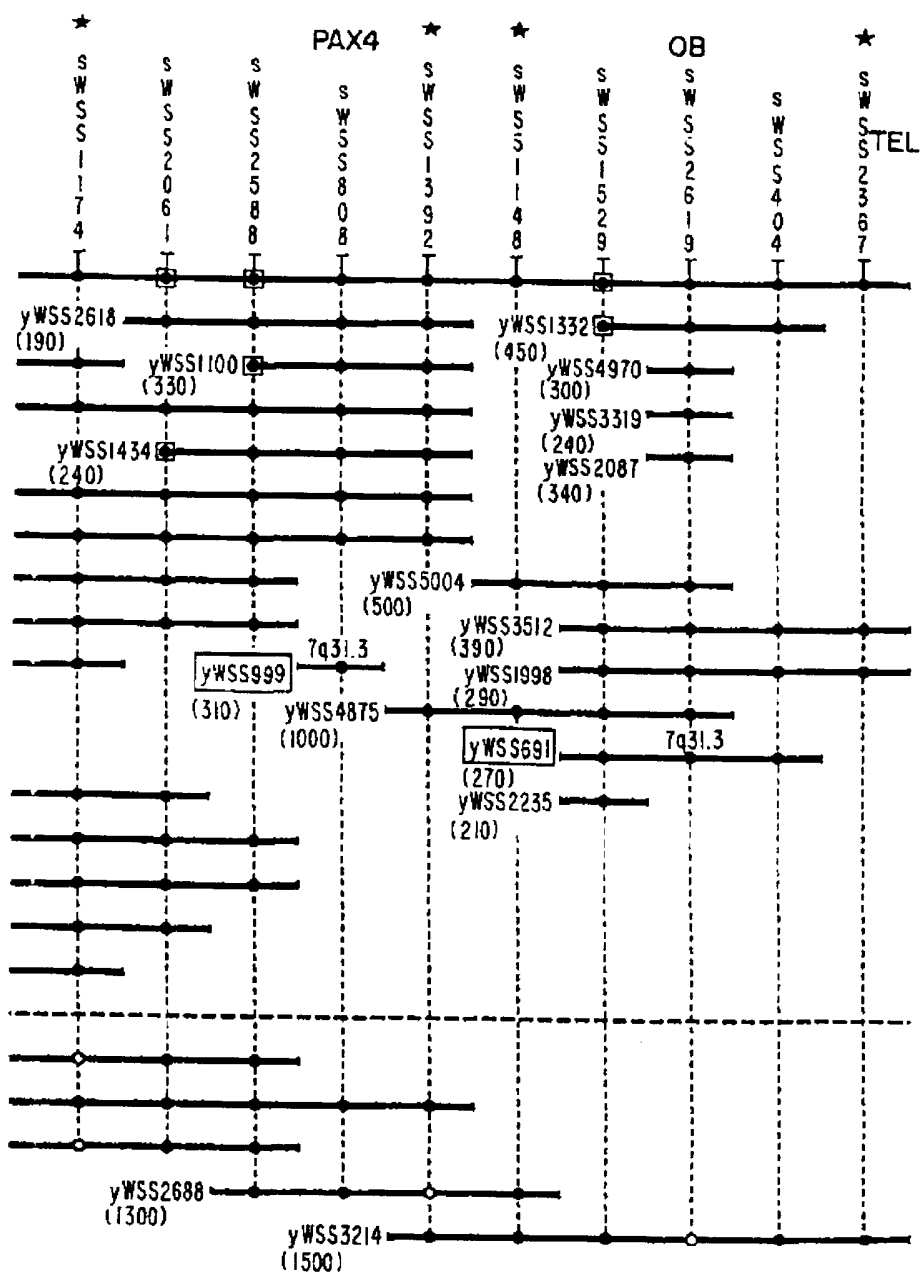


Fig. 35B



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci