

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96104497.7

C07K 2/00

C07K 14/435 C12P 21/00

C12N 15/12 C12N 15/63

A61K 38/02

[43]公开日 1997 年 8 月 20 日

[11] 公开号 CN 1157290A

[22]申请日 96.5.3

[30]优先权

[32]95.5.5 [33]US[31]435,777

[32]95.6.7 [33]US[31]484,629

[71]申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 A·坎普菲尔德 R·德沃斯

Y·贵斯苾

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标

事务所

代理人 张 闽

权利要求书 5 页 说明书 45 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 重组肥胖(ob)蛋白

[57]摘要

调节动物和人体重量的蛋白，用于治疗、预防和控制肥胖及相关的疾病或症状，以及该生物活性蛋白以纯化和均一物形式的重组表达。

权 利 要 求 书

1、均一的生物活性人体肥胖蛋白或其片段，该片段具有所述蛋白的生物活性。

2、如权利要求1的蛋白或片段，其中，所述蛋白或片段的生物活性的特征是：可减少哺乳动物摄食量并降低哺乳动物的增重速度。

3、如权利要求1的蛋白，它包括SEQ ID NO.6。

4、无其它哺乳动物蛋白的重组生物活性的人体肥胖蛋白或其片段，该片段具有所述蛋白的生物活性。

5、如权利要求4的蛋白或片段，其中，所述蛋白或片段的生物活性的特征是：可减少哺乳动物摄食量并降低哺乳动物的增重速度。

6、如权利要求4的蛋白，它包括SEQ ID NO.6。

7、均一的生物活性鼠肥胖蛋白或其片段，该片段具有所述蛋白的生物活性。

8、如权利要求7的蛋白或片段，其中，所述蛋白或片段的生物活性的特征是：可减少哺乳动物摄食量并降低哺乳动物的增重速度。

9、如权利要求7的蛋白，它包括SEQ ID NO.3。

10、无其它哺乳动物蛋白的重组生物活性的鼠肥胖蛋白或其片段，该片段具有所述蛋白的生物活性。

11、如权利要求10的蛋白，其中，所述蛋白或片段的生物活性的特征是：可减少哺乳动物摄食量并降低哺乳动物的增重速度。

12、如权利要求10的蛋白，它包括SEQ ID NO.3。

13、一种表达载体，包括：

a) 一个启动子序列，和

b) 一个编码一种融合蛋白的DNA序列，该融合蛋白包括SEQ ID NO.3的鼠ob蛋白或SEQ ID NO.6的人ob蛋白和大肠杆菌(E.coli)外膜蛋白A的信号肽，该表达载体能在大肠杆菌宿主细胞中表达上述融合蛋白。

14、如权利要求13的表达载体，其中，所述启动子序列由一个lac启动子操纵基因和一个脂蛋白启动子组成。

15、一种融合蛋白，包括鼠ob蛋白或人ob蛋白和大肠杆菌(E.coli)外膜蛋白A的信号肽。

16、如权利要求15的融合蛋白，其中，鼠ob蛋白包括SEQ ID NO.3，而人ob蛋白包括SEQ ID NO.6。

17、一种包括第一和第二部分的DNA序列，其中，

a)第一部分是编码sOmpA肽的SEQ ID NO.7的sOmpA基因序列；和

b)第二部分是编码鼠ob蛋白的核苷酸序列或编码人ob蛋白的核苷酸序列。

18、如权利要求17的DNA序列，其中，所述鼠ob蛋白包括SEQ ID NO.3。

19、如权利要求17的DNA序列，其中，所述人ob蛋白包括SEQ ID NO.6。

20、一种用权利要求13所述的表达载体转化的大肠杆菌宿主生物。

21、一种生产无其他哺乳动物蛋白的生物活性重组人或鼠ob蛋白的方法，包括以下步骤：

a)构建一个具有一个启动子序列和一个编码一种融合蛋白的DNA序列的表达载体，该融合蛋白包括SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.6，和大肠杆菌外膜蛋白A的信号肽；

b)将该表达载体插入大肠杆菌宿主细胞，以转化该大肠杆菌宿主细胞；

c)在大肠杆菌宿主细胞中表达所述融合蛋白；和

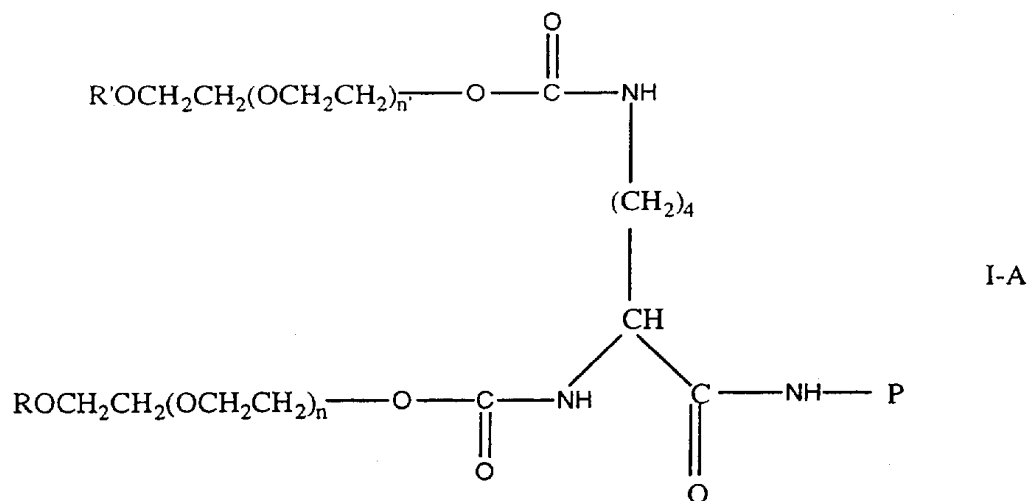
d)用冷渗透休克缓冲液处理所述大肠杆菌宿主细胞，以释放出无其它哺乳动物蛋白和信号肽的鼠或人ob蛋白。

22、所述人ob基因序列包括SEQ ID NO.4。

23、一种生产均一的生物活性重组人或鼠ob蛋白的方法，包括组合使用阴离子交换柱层析、疏水柱层析和凝胶过滤处理含有人或鼠ob蛋白的渗透流体。

24、一种组合物，包括一或多种聚乙二醇和/或聚丙二醇连接在权利要求1 - 12所述的人或鼠ob蛋白上的缀合物，该组合物中缀合物上的聚乙二醇或聚丙二醇单位的平均分子量为15 - 60kDa。

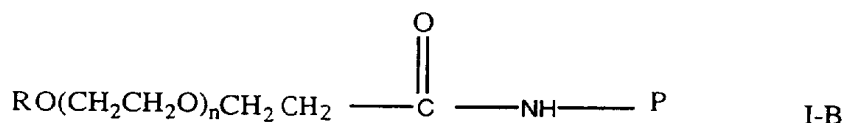
25、一种包括一或多种下式缀合物的组合物：



其中P为权利要求1 - 12所述的人或鼠ob蛋白，n和n'是总数为300 - 1500的整数，该组合物中的缀合物上的PEG单位的平均分子量为15 - 60kDa，而R和R'为低级烷基。

26、如权利要求25的组合物，其中，n和n'的总数约为800 - 1200，而该组合物中的缀合物上的PEG单位的平均分子量为35 - 45kDa。

27、一种包括一或多种下式缀合物的组合物:



其中P为权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白, n和n'是总数为300-1500的整数, 该组合物中的缀合物上的PEG单位的平均分子量为15-60kDa, 而R为低级烷基。

28、如权利要求27的组合物, 其中, n为850-1000, 而该组合物中的缀合物上的PEG单位的平均分子量为35-45kDa。

29、如权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白或如权利要求24-28所述的组合物, 被用作治疗活性剂。

30、如权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白或如权利要求24-28所述的组合物, 被用作治疗、预防和控制肥胖和相关疾病的治疗活性剂。

31、一种药用组合物, 包括如权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白或如权利要求24-28所述的组合物和可以药用的载体材料。

32、将如权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白或如权利要求24-28所述的组合物用于制备药用组合物的用途。

33、将如权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白或如权利要求24-28所述的组合物用于制备用于治疗、预防和控制肥胖及相关疾病的药用组合物的用途。

34、将权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白用于鉴定ob蛋白受体的用途。

35、将权利要求13和14所述的表达载体用于生产如权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白的用途。

36、将权利要求17-19所述的DNA序列用于生产如权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白。

37、将所述大肠杆菌宿主生物用于生产如权利要求1-12所述的人或鼠ob蛋白。

38、用权利要求21或22的方法制备的均一的生物活性重组人或鼠ob蛋白。

39、一种治疗、预防和控制肥胖及相关疾病的方法，包括使用如权利要求1-12和33所述的人或鼠ob蛋白或如权利要求24-28所述的组合物。

40、大致如上所述的产品、药用组合物、工艺和方法。

说明书

重组肥胖 (ob) 蛋白

据报导,肥胖是西方社会最常见的营养失调症 (Zhang,Y.等, Nature372,425-432(1994))。在10个成年美国人中有3个以上超过其理想体重至少20% (Zhang,Y.等, supra)。增加的体重是公共卫生问题,因为它与重要的医学发病,如II型糖尿病 (即,非胰岛素依赖型糖尿病),高血压和高脂血 (Grundy,S.M.和Barnett, Disease-a-Mouth 36,645-696(1990))有关。有证据表明体重是生理调控的,而肥胖 (及其相关的症状或疾病)是部分由于扰乱了这种调控 (Zhang,Y.等, supra)。

在啮齿类动物中报导了七种导致肥胖表型的单一基因突变;其中五个存在于小鼠中。这七个啮齿类模型中,研究最深入的是小鼠的肥胖 (ob) 基因突变,该突变于1950年被鉴定 (Ingalls,A.M.等, J.Hered.41,317-318(1950))。该ob基因突变纯合的小鼠极度地肥胖,会出现II型糖尿病而且过度摄食和代谢减退,作为类似人体病理肥胖综合症的一部分 (Friedman J.M.等, Genomics11,1054-1062(1991))。该ob基因位于小鼠近端染色体6上,并编码一种在脂肪组织中表达的蛋白质 (即ob蛋白质) (Zhang,Y.等, supra)。该ob基因突变纯合的小鼠极少以至不产生这种ob蛋白质,因此出现有缺陷性的体重调控,以致肥胖。

所述鼠或人体ob蛋白质可用于患有与ob基因缺损或突变症状的患者,这种缺损或突变阻止或干扰上述ob蛋白质的产生和/或调节体重。因此这种蛋白质可用作类荷尔蒙物质,用来在人体和动物上控制、抑制或治疗肥胖及其相关的疾病和症状。

以这种方式使用上述鼠或人体ob蛋白质,这种蛋白质可通过多种注射方式使用,如以常规剂量腹膜内、静脉、肌肉或皮下注射。由于它通常是通过注射使用,重要的是这种鼠和人体ob蛋白质要是纯的,最好是均一物,无混杂蛋白材料,并可以可溶的和生物活性形式重组

地表达。本领域的技术人员普遍知道存在于注射药物中的杂质通常会导致毒副作用或有害的免疫反应。

尽管鼠ob基因序列在Zhang,Y.等, *supra*的文章中被公开, 但是尚未见表达这种鼠ob蛋白质或其人体对应物的方法的报导, 至于以生物活性和可溶形式生产这种蛋白质(这种蛋白质可纯化为均一性物质)的报导就更少。因此本发明重要的一点以及目的之一是以一种均一、可溶且生物活性形式表达并生产所述鼠或人体ob蛋白。

业已发现, 重组的人体和鼠ob蛋白质可以生物活性和可溶形式表达, 随后被纯化成为适于给患者注射的均一性物质, 用于治疗、预防或控制肥胖及其相关的症状和疾病, 如II型糖尿病、高血压、高脂血等。

根据本发明, 所述人体和鼠ob蛋白可以通过首先构建用于在大肠杆菌(E.coli)中表达的新的表达载体以生物活性形式重组地生产, 并纯化成为均一性物质。该表达载体带有一个启动子和一段DNA序列, 该DNA序列编码一种由二部分组成的融合蛋白: 大肠杆菌外膜蛋白A的信号肽(即sOmpA)和人体或鼠ob蛋白。根据本发明, 生产生物活性重组形式的鼠和人体ob蛋白的下一步骤是, 将该表达载体插入一种大肠杆菌宿主中, 从而获得该融合蛋白的有效表达, 并易位到外周质间隙中(即位于大肠杆菌微生物的内外细胞膜之间), 在这里, 信号肽被从ob蛋白上切除, 剩下可溶的和生物活性形式的ob蛋白。接下来, 在对宿主大肠杆菌细胞进行冷渗透休克处理之后, 该ob蛋白以可溶和生物活性形式被有效地分泌到无细胞的介质中, 此时, 将该ob蛋白纯化为均一物质, 通过顺序使用阴离子交换层析、疏水柱层析和凝胶过滤而完成。

本发明还涉及(1)一种带有编码一种包括sOmpA信号肽和人体或鼠ob蛋白的融合蛋白的DNA的表达载体; (2)一种用该表达载体转染或转化的宿主生物; (3)编码人体ob蛋白的DNA序列; 和(4)该ob蛋白的聚乙二醇或聚丙二醇缀合物。

本发明还涉及用于以生物活性和可溶形式表达重组人体和鼠ob蛋白的方法, 和用于以适于给动物和人体使用的纯化均一物形式生产该蛋白的方法。

本发明的用于表达和生产所述鼠ob蛋白的方法，是通过由Zhang, Y.等人 (supra) 报导的鼠ob基因实现的，该基因的序列为702bp核苷酸序列，这里被命名为SEQ ID NO.1。该鼠ob基因序列包括一个501bp的编码序列或开放阅读框架 (ORF)，它以位于第36个核苷酸的起始密码子开始，并以位于第537个核苷酸的终止密码子结束，并且在其3'和5'末端有未翻译序列。该ORF含有从第36至第98个核苷酸的63bp信号序列。

该鼠ob基因序列 (SEQ ID NO.1) 编码鼠ob蛋白 (加上其信号序列)，其氨基酸序列长度为167个氨基酸，并被命名为SEQ ID NO.2。在该SEQ ID NO.2蛋白中，前21个氨基酸表示鼠ob蛋白的信号序列。成熟的鼠ob蛋白 (没有其信号序列) 从第22个氨基酸 (Val) 延伸到第167个氨基酸 (Cys)，并命名为SEQ ID NO.3。

本发明的用于表达和生产人体ob蛋白的方法，是用人体ob基因实现的，该基因序列为690bp核苷酸序列，被命名为SEQ ID NO.4。

Zhang, Y.等人 (supra) 报导，人体ob基因与鼠ob基因高度同源，并公开了用寡聚核苷酸探针探测鼠ob基因的常规方法，该方法可用于 (1) 筛选由人体脂肪组织产生的克隆的cDNA文库，(2) 鉴定具有人体ob基因的克隆，和 (3) 分离并对该人体ob基因序列进行测序。当用常规方法测序时，该人体ob基因序列被测定为具有SEQ ID NO.4的核苷酸序列。

与鼠ob基因一样，人体ob基因包括一个501bp的编码序列或ORF，它始于位于第37个核苷酸的起始密码子并终止于位于第538个核苷酸的终止密码子，并在3'和5'末端具有未翻译的序列。该ORF具有一个63bp的信号序列，从第37 - 99个核苷酸。

该人体ob基因序列 (SEQ ID NO.4) 编码一种人体ob蛋白加上其信号序列，其167个氨基酸长度的氨基酸序列被命名为SEQ ID NO.5。该167氨基酸长度的蛋白的前21个氨基酸表示信号序列。成熟的人体ob蛋白 (没有其信号序列) 从第22个氨基酸 (Val) 延伸至第167个氨基酸 (Cys)，并用SEQ ID NO.6表示。

Zhang, Y.等人 (supra) 报导人体ob蛋白与鼠ob蛋白之间有84% 的相同性。Zhang, Y.等人 (supra) 还报导了有鼠和人体蛋白的变型物

存在，这种变型物之一的特征在于缺失第49个谷氨酰胺。在由鼠脂肪组织和人体脂肪组织产生的cDNA克隆文库中大约30%缺少密码子49（Zhang, Y.等人, *supra*）。

下面术语被定义为：

鼠ob蛋白（mob）：是指SEQ ID NO.3蛋白，其生物特性与治疗、控制或预防肥胖或其相关症状和疾病有关。具体地讲，一种鼠ob蛋白被定义为包括具有一种大体与SEQ ID NO.3的氨基酸序列相同的氨基酸序列的蛋白或多肽，还具有以下的生物活性：

（1）当以20微克或更少的剂量通过颅内（ICV）注射给体重至少为30g的禁食16-18h的成熟的肥胖ob/ob小鼠使用所述蛋白或多肽时（使用Haley和McCormick, *Brit. J. Pharmacol.* 12, 12-15 (1957)的方法），该蛋白或多肽：

（a）与注射媒介物的对照小鼠相比，在5小时的进食实验中摄食量减少50%（ED50用于表示减少摄食）；和

（b）与注射媒介物的对照小鼠相比，在ICV注射之后24小时之内体重增加至少减少50%（ED50用于表示体重增加的减少）。

（2）当在光照开始和黑暗期间3个小时时，给体重至少为30克的非禁食成熟ob/ob小鼠每天两次腹膜（IP）服用该蛋白或多肽一周时，每天的总剂量为20微克或更少，该蛋白或多肽：

（a）与注射媒介物的对照小鼠相比，在5小时和24小时的进食实验中至少摄食量减少20%（ED20用于表示减少摄食）；和

（b）与注射媒介物的对照小鼠相比，在IP注射之后24小时之内体重增加至少减少20%（ED20用于表示体重增加的减少）。

这里所说的鼠ob蛋白一词包括那些被有意改进过的蛋白，例如通过点诱变或偶然突变所产生的蛋白。

人体ob蛋白（hob）：是指SEQ ID NO.6的蛋白，其生物特性与治疗、控制或预防肥胖或其相关的症状和疾病有关。具体地讲，人体ob蛋白被定义为包括具有大致与SEQ ID NO.6的氨基酸序列相同的氨基酸序列的任何蛋白或多肽，还具有以下生物活性：

（1）当以20微克或更少的剂量通过颅内（ICV）注射给体重至少为30g的禁食16-18h的成熟的肥胖ob/ob小鼠使用所述蛋白或多肽时

(使用 Haley 和 McCormick, Brit. J. Pharmacol. 12, 12-15 (1957) 的方法), 该蛋白或多肽:

(a) 与注射媒介物的对照小鼠相比, 在5小时的进食实验中摄食量减少50% (ED50用于表示减少摄食); 和

(b) 与注射媒介物的对照小鼠相比, 在ICV注射之后24小时之内体重增加至少减少50% (ED50用于表示体重增加的减少)。

(2) 当在光照开始和黑暗期间3个小时时, 给体重至少为30克的非禁食成熟ob/ob小鼠每天两次腹膜(IP)服用该蛋白或多肽一周时, 每天的总剂量为20微克或更少, 该蛋白或多肽:

(a) 与注射媒介物的对照小鼠相比, 在5小时和24小时的进食实验中至少摄食量减少20% (ED20用于表示减少摄食); 和

(b) 与注射媒介物的对照小鼠相比, 在IP注射之后24小时之内体重增加至少减少20% (ED20用于表示体重增加的减少)。

这里所说的人ob蛋白一词包括那些被有意改进过的蛋白, 例如通过点诱变或偶然突变所产生的蛋白。

大致相同: 它可以指核酸序列和氨基酸序列, 指一种具体的目标序列, 例如一种突变序列, 通过一或多次置换、缺失、或增加由一种参考序列获得的变形, 其净效应不会在参考序列与目标序列之间导致有害的功能异化。对本发明而言, 具有95%以上同源性、相同的生物特性和相同的表达特征的序列, 被认为大致相同。为了确定同源性, 该成熟序列的平截可以被忽视。同源程度较低、生物活性类似和相同的表达特征的序列被认为基本相同。通常, 同源DNA序列能通过适度严格的标准杂交条件下杂交鉴定。

片段: 鼠或人ob蛋白的片段是指具有一部分或一段鼠或人ob蛋白氨基酸序列的任何蛋白和多肽。它具有人或鼠ob蛋白的生物活性。片段包括通过蛋白质水解降解鼠或人ob蛋白而产生或通过现有方法化学合成而产生的蛋白或多肽。

当给包括人在内的哺乳动物使用该蛋白或片段时, 其ob蛋白或片段具有生物活性, 可以减少食物摄取并降低该哺乳动物的体重增加速度。可采用常规的用于测定一种或多种哺乳动物, 尤其是肥胖的ob/ob小鼠的已知方法测定人或鼠ob蛋白的生物活性。在这里讲述了这

些试验中的几种可用于证实这种生物活性的试验。在用如ICV试验在ob/ob小鼠中测定生物活性时，人或鼠ob蛋白最好在20微克或更少的剂量时，具有ED50的摄食减少，并在20微克或更少的剂量时，具有ED50的体重增重减少。或者，在根据用于ob/ob小鼠的IP实验测定人或鼠ob蛋白的生物活性时，人或鼠ob蛋白最好在20微克或更少的剂量时，具有ED20的摄食减少，并在20微克或更少的剂量时，具有ED20的体重增重减少。通常，具有上述生物活性的片段比较理想。

复制子：是任何起到一个DNA体内复制的自主单位作用的遗传因子（例如质粒，染色体，病毒），即能够在其自身控制下复制。

表达载体：是一个诸如质粒，噬菌体或粘粒的复制子，可将另一段DNA连接在其上面，以便引起被连接上的片段的复制。它包括一个转录单位，该单位包括一个由（1）具有在基因表达中起调控作用的一个或多个遗传因子，如启动子或增强子，（2）一个被转录为mRNA并被翻译成蛋白质的结构或编码序列，以及（3）适当的转录启动和终止序列组成的组件。

克隆：是采用遗传工程技术，通常涉及质粒，由一种原始长度的DNA序列通过细菌或病毒产生的DNA分子。

信号序列：是指位于被表达的蛋白质编码序列的起始末端（5'末端）的核酸序列。该信号序列编码一种信号肽，新合成的蛋白质的N-末端，它指示宿主细胞将蛋白易位到或穿过该宿主细胞膜，通常在该易位过程中该信号肽被切除。

启动密码子：通常是位于一种蛋白编码序列中的一个ATG密码子，而且通常在5'末端，并指示在蛋白质序列中的第一个氨基酸。

终止密码子：是位于一种蛋白质编码序列的3'末端的无义密码子，并指示生长的多肽链的末端。

开放阅读框架（ORF）：是双链DNA上线性排列的密码子三联体，当将其置于适当的调控序列的控制下时，它在体外或体内在细胞中编码一种氨基酸序列。该ORF的范围是由5'末端的一个起始密码子和3'末端的一个终止密码子确定的。也可将其称为“编码序列”。

启动子序列：是DNA调控区，能够在细胞中结合RNA聚合酶并启动一或多个下游结构基因的开放阅读框架（3'方向）的转录。该启动子

序列通常位于信号序列或开放阅读框架5'末端并延伸到5'方向的上游，包括在可检测上述背景水平上启动多肽转录所需的最少的碱基或因子数。

当RNA聚合酶转录上述编码序列为mRNA时，编码序列或ORF受一个启动子序列的控制。

当采用常规方法，如聚丙烯酰胺凝胶染色法检测没有可检数量的混杂蛋白或内源材料时，包括A（这里A是一种单一的多肽）的组合物对A来说是纯合的。本发明中，纯合一词是指包括一种单一蛋白质或多肽的组合物，其中至少占该组合物重量95%的是该单一蛋白或多肽。

下面的步骤描述出用于以生物活性和可溶的无细胞形式重组地表达无其他哺乳动物的蛋白的人和鼠ob蛋白的方法，从这种物质中可将该ob蛋白纯化成均一物质。这些步骤将在实施例中进行详细说明。

（1）获得鼠和人ob基因。编码鼠ob蛋白及其天然信号序列的cDNA（SEQ ID NO.1）被公开于Zhang, Y.等人（*supra*）的文章中，该鼠cDNA已被提取并采用常规技术用寡聚脱氧核苷酸DNA引物通过PCR技术扩增。这些DNA引物以及用于获取它们的方法公开于Zhang, Y.等人（*supra*）的文章中。

编码人ob蛋白及其天然信号序列的cDNA（SEQ ID NO.4）是通过采用与Zhang, Y.等人（*supra*）用于获取鼠ob基因的相同的寡聚脱氧核苷酸DNA引物获得的。通过用常规技术已从由人脂肪细胞组织产生的RNA构成的λ噬菌体cDNA文库中提取出这种人cDNA。

这种人或鼠ob cDNA不仅可由cDNA文库中获得，而且可通过其他常规技术如化学合成或克隆从需要的细胞中提纯的基因组DNA或其片段获得。该方法由Sambrook等所公开，见“DNA Cloning: A Practical Approach”，Vol. I和II，D.N.Glover, ed，1985, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K.; Benton和Davis, Science 196, 180-182(1977); 以及Grunstein和Hogness, Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3961-3965(1975)。为了从cDNA文库中获得这种人或鼠ob cDNA，用常规DNA杂交技术对该cDNA文库进行筛选，Benton&Davis, *supra*, 或Grunstein & Hogness, *supra* 的方法，使用通过从含有鼠ob基因的鼠脂肪细胞中提取的聚腺苷酸化RNA的逆转录而制备的引物。对该引物杂交的克隆进

行限制性内切酶裂解，琼脂糖凝胶电泳，和其他的涉及该电泳引物的杂交实验（“Southern 印迹”）分析。在分离出几个能与鼠cDNA探针杂交的克隆之后，将一个克隆的杂交片段通过常规技术亚克隆并测序。

从基因组DNA产生的克隆，除了编码区以外，可能带有调节区和内含子DNA区：由cDNA产生的克隆没有内含子序列。在来自基因组DNA基因的分子克隆中，产生了DNA片段，其中的一些将编码所需目的基因。该DNA可采用各种限制性内切酶在特异位点进行裂解。或者也可以在有锰的条件下用DNAse将DNA切成片段，或者通过物理剪切方法裂解该DNA，如通过超声处理。然后就可以通过标准技术根据其大小将这些线性DNA片段分离，所述方法包括但不限于琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳和柱层析。

不管其来源如何，鼠或人ob基因可被分子克隆到适当载体上，用于通过本领域已知方法繁殖该基因。任何市售载体均可采用，例如鼠cDNA可插入pCDNA3载体上，而人cDNA可插入pBluescriptSK⁻载体上。用于细菌宿主的适当载体披露于Pouwels等人的文章中，见“Cloning Vectors: A Laboratory Manual”，1985, Elsevier, N.Y.。作为一种代表性但是非限定性的实例，可用于细菌的克隆载体可包括一个选择标记和来源于市售质粒的细菌复制源，而该质粒又来源于已知的克隆载体pBR322(ATCC 37017)。这种市售载体包括例如pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)和 pGEM1(Promega Biotec, Madison, Wisc, USA)。

插入上述市售载体上的人或鼠ob基因的核苷酸序列可通过已知方法测定，如标准的核苷酸测序技术。

编码人或鼠之外的物种的ob蛋白的其它核苷酸序列也可用于本发明。因此，尽管已对与人和鼠ob基因有关的特定DNA进行了克隆和测序，任何动物脂肪细胞都可用作该ob蛋白的核苷酸源。

（2）人和鼠ob蛋白表达载体的构建。按照上述方法克隆的人或鼠的ob基因被分别用来构建用于人或鼠ob蛋白的表达载体。

为了通过转染或转化大肠杆菌宿主细胞表达生物活性的人和鼠ob蛋白，和将该ob蛋白分泌到外周质中，可采用一种新的表达载体。该

表达载体包括一个启动子和一个编码一种融合蛋白的DNA序列。该融合蛋白由两部分组成：第一部分是一种为大肠杆菌外膜蛋白A的信号肽（sOmpA），该融合蛋白的另一部分为人或鼠ob蛋白（去掉其自身的天然信号序列）。编码该融合蛋白的DNA序列也由两部分组成：第一部分编码sOmpA肽而第二部分编码鼠或人ob蛋白（去掉其天然信号序列）。编码sOmpA肽的第一部分DNA序列是由De Sutter,K.等人描述的信号序列（Gene 141, 163-170 (1994)），并具有SEQ ID NO.7的核苷酸序列。该两部分DNA序列的第二部分编码鼠或人ob蛋白并具有分别去掉了编码相应的天然信号序列的核苷酸序列部分的SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.4的核苷酸序列。

由SEQ ID NO.7的sOmpA信号序列编码的信号肽具有De Sutter,K.等人（supra）报导的SEQ ID NO.8的氨基酸序列。

本发明的新的表达载体是通过将该启动子和编码融合蛋白的DNA序列插入适于在大肠杆菌宿主细胞中表达重组蛋白的一种常规表达载体中而获得的。

在构建本发明的新的表达载体时，任何启动子均可采用，只要它能够控制包括sOmpA肽和ob蛋白的融合蛋白在大肠杆菌细胞中的转录。当把sOmpA用作信号肽时，最好采用lac-操纵基因启动子（PO_{lac}）和脂蛋白启动子（P_{lpp}）。可用于在大肠杆菌中表达的其他启动子包括T7 RNA聚合酶启动子，如Studier等人所述（J. Mol. Biol. 189, 113-130 (1986)），如Lauer所述的（J. Mol. Appl. Genet. 1, 139-147 (1981)）可从美国典型培养物中心（ATCC）获得的lacZ启动子，保藏号ATCC37121，如Maniatis所述的（见“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”，Cold Spring Harbor 1982）并可以ATCC37138提供的tac启动子，碱性磷酸酶（phoA）启动子和如Goeddel等人所述的（Nucleic Acids Research 8, 4057-4075 (1980)）trp启动子。被发现的和用于大肠杆菌其他启动子以及与其核苷酸序列有关的使得本领域技术人员能够将其有功能地连接在本发明的表达载体中的细节也已公开（Siebenlist等，Cell 20, 269-281, 1980）。

具体地讲，一种表述载体包括：

(a) 一个启动子序列, 和

(b) 一个编码一种融合蛋白的DNA序列, 该融合蛋白包括SEQ ID NO.3的鼠ob蛋白或SEQ ID NO.6的人ob蛋白, 和大肠杆菌外膜蛋白A的信号肽。

下面讲述构建该新的表达载体方法。该方法在实施例和图2和3中有更详细的描述。首先, 将人或鼠ob基因(去掉其天然信号序列)的编码序列整合到带有sOmpA信号序列的质粒, 如pT10sOmpArPDI质粒上。该pT10sOmpArPDI质粒及其结构和制备由De Sutter,K.等(supra)公开。一旦人或鼠ob基因整合到该质粒上, 它就与sOmpA基因融合, 在该质粒中产生一个“杂合基因序列”。该sOmpA基因必须位于ob基因编码序列5'部分的上游。随后将上面所列举的启动子, 特别是脂蛋白启动子(P_{lpp})和lac启动子-操纵基因(PO_{lac})整合到带有该杂合基因序列的质粒上, 以产生本发明的表达载体。该表达载体的实施例被命名为pLPPsOmpA mob和pLPPsOmpA hob1, 并分别示于图2和3中。

本领域中构建这样一种质粒的任何已知方法均可采用。不过, 将sOmpA和ob基因序列融合, 将该基因序列整合到适当质粒, 以及整合所述启动子以构成本发明的表达载体的顺序并不重要。例如, 可将sOmpA基因序列首先直接融合到鼠或人ob基因序列上以产生杂合基因序列, 然后将杂合序列插入到其上面已经整合有适当启动子的质粒上。不过, 该sOmpA基因序列必须位于鼠或人ob基因序列5'末端的上游。

业已发现, 采用这种新的表达载体特别是采用编码sOmpA的信号序列, 鼠或人ob蛋白可被易位到外周质间隙, 在这里信号肽被适当地切除, 剩下可溶的和生物活性形式的完整的人或鼠ob蛋白。一旦位于该周质间隙中, 当对该宿主细胞进行冷渗透休克处理时该ob蛋白就被有效地分泌到无其它哺乳动物蛋白的无细胞环境中。

3、在转化的大肠杆菌细胞中表达人或鼠ob蛋白。

随后, 将按照上述方法构建的表达载体插入宿主大肠杆菌细胞, 以转化该大肠杆菌细胞。任何大肠杆菌菌株均可使用, 如E.coli K-12

菌株294, 如英国专利公开号2055382A (ATCC No.31446) 所公开的。可用于本发明的其它菌株包括E.coli MC1061 (Casadaban & Cohen,J.Mol. Biol.138,179-207,1980) , E.coli B,E.coli X1776 (ATCC No.31537),和 E.coli W3110 (ATCC No.27325) 或其它菌株, 其中很多被保存于并可由被认可的微生物保藏机构获得。

转化的大肠杆菌细胞生长至适当的细胞密度, 并通过标准方法培养。在该转化大肠杆菌宿主的生长和培养过程中, 本发明的表达载体能有效地表达鼠或人ob蛋白并将该蛋白以可溶的和生物活性形式易位到大肠杆菌宿主细胞的外周质中。在该融合蛋白易位到外周质的过程中sOmpA信号肽(即该融合蛋白的部分1)被切除, 产生无其它哺乳动物蛋白或多肽的生物活性形式的ob蛋白。具体地讲, 该生产生物活性形式的无其它哺乳动物蛋白的重组人或鼠肥胖蛋白的方法包括以下步骤:

(a) 构建一个具有启动子序列和编码一种融合蛋白的DNA序列的表达载体, 该融合蛋白包括SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.6以及大肠杆菌外膜蛋白A的信号肽;

(b) 将该表达载体插入大肠杆菌宿主细胞, 以转化该宿主细胞;

(c) 在该大肠杆菌宿主细胞中表达所述融合蛋白; 和

(d) 用冷渗透压休克缓冲液处理该大肠杆菌宿主细胞, 以释放出含有其它哺乳动物蛋白, 也不含有信号肽的鼠或人ob蛋白。

随后将转化的大肠杆菌细胞外周质中的通过重组产生的可溶的生物活性形式的人或鼠ob蛋白纯化成均一物。

按照上述方法易位到细胞外周质中的重组人和鼠ob蛋白, 在对该宿主细胞进行冷渗透压处理时能被有效地分泌到细胞外边, 该方法在本领域是已知的并由Koshland,D.& Botstein,D.所公开 (Cell 20, 749-760,1980) 。使用冷渗透压休克, 可将ob蛋白以不含其他哺乳动物蛋白或多肽的生物活性形式从大肠杆菌中释出。

按照上述方法在对转化的大肠杆菌细胞进行冷渗处理之后位于渗透流体中的人或鼠ob蛋白是生物活性形式的, 并可通过组合使用阴离子交换柱层析、疏水柱层析和凝胶过滤将其纯化成均一物。阴离子交换和疏水柱层析能以任何顺序进行, 但是必须在凝胶过滤之前进行。

该阴离子交换步骤可以常规方式进行。用于阴离子交换层析的优选柱是一种Q Sepharose速流柱。适用的阴离子层析介质包括各种不可溶的基质，包括二乙氨乙基（DEAE）或二乙-（2-羟丙基）氨乙基（QAE）。该基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或其他常用于蛋白质纯化的材料。特别适用于阴离子交换层析的材料是DEAE-Sephacel (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。当采用含有DEAE基团的介质时，含有鼠或人ob蛋白的提取物以弱碱性pH，如pH8.1提供。通过采用适当缓冲液，如Tris-HCl中的盐梯度，可以更高的纯度将结合的鼠或人ob蛋白洗脱。通常，可通过涉及少量重组蛋白的初步洗脱实验确定该梯度的特征。

当把阴离子交换层析作为第一个纯化步骤时，通过阴离子交换层析所获得的含有人或鼠ob蛋白的材料随后要进行疏水层析处理，疏水层析是这样一种分离技术：其中物质是按照其与带有疏水基团的不带电荷的基质材料之间的疏水作用的强度的差异进行分离的。通常，疏水层析首先在有利于疏水结合的条件下，如高离子强度进行平衡。可将下降的盐梯度用于洗脱该样品。

任何疏水层析柱均可采用。优选的疏水柱是苯基Sepharose，不过丁基Sepharose也可采用。根据本发明将从阴离子柱上洗脱的含有重组鼠或人ob蛋白的材料上到含有较强的疏水凝胶，如苯基Sepharose的柱上。为了改善与该疏水凝胶的疏水作用，采用一种含有浓度大于或等于0.4M硫酸铵（最好为0.4M）的溶剂。因此，将柱和样品在50mM Tris缓冲液中调整至0.4M的硫酸铵浓度，并将该样品上柱。用0.4M的硫酸铵缓冲液洗脱该柱。然后用能减弱疏水作用的溶剂，如下降的盐梯度、乙二醇或丙二醇或尿素洗脱该ob蛋白。涉及柱洗脱的优选实施例，顺序采用Tris缓冲液和含有20%乙二醇的Tris缓冲液。随着Tris缓冲液中硫酸铵浓度的梯度下降和乙二醇浓度的增加，ob蛋白被依次从柱上洗脱。以任意次序结合并依次使用阴离子层析和疏水柱层析，所得到的人或鼠ob蛋白的纯度通常为90%。

凝胶过滤层析步骤在上述阴离子交换层析和疏水柱层析步骤之后进行，并可以任何常规凝胶过滤方法进行。从最后使用的疏水层析柱或阴离子交换柱上洗脱的ob蛋白，可被浓缩并透析至较小的体积，采

用一种切断分子量为10,000的膜（AMICON - YM10膜）。然后，可将浓缩的材料上到装有凝胶过滤介质，如 G100 - Sephadex（Pharmacia, Uppsala, Sweden）的柱上。然后就可通过标准技术，根据其分子量用 SDS - PAGE 将该 ob 蛋白同其它杂质分开。

结合并顺序使用阴离子交换层析、疏水柱层析和凝胶过滤，通常能得到纯度为95%的人或鼠 ob 蛋白。

可通过已知方法，如 Laemmli 等人的电转移方法（U.K., Nature 227, 680-685, 1970）或 Matsudaira, P. 所述的方法（J. Biol. Chem. 262, 10035-10038, 1987）对纯化的鼠或人 ob 蛋白 N - 末端进行氨基酸测序。内部测序也可用已知方法进行。例如，可通过用内蛋白酶 Lysine C 消化 M 带（在硝酸纤维素上）产生肽片段，然后通过 HPLC 系统进行分离。

本发明提纯的人和鼠 ob 蛋白的生物活性是这样的，与未注射或对照组患者相比，经常通过注射给病人或鼠使用该 ob 蛋白，可导致摄食减少并降低增重速度。

按照本发明方法获得并提纯的人和鼠 ob 蛋白或其片段的生物活性，可通过常规方法测定，例如，按照 Haley, T.J. 等（SUPRA）的方法给 ob/ob 小鼠反复或一次颅内（ICV）注射这种蛋白，在例13和16中有更详细的描述。根据该 ICV 测定，可以确定表示摄食减少的 ED50 和表示增重减少的 ED50。另外，纯化的人和鼠 ob 蛋白或其片段的生物活性，可通过反复给 ob/ob 小鼠 IP 注射来测定，如例15所述。根据该 IP 试验，可确定表示摄食减少的 ED20 和表示增重减少的 ED20。

按照本发明方法获得并提纯的人和鼠 ob 蛋白或其片段的生物活性，也可通过已知方法用人体进行测定，例如，根据通过给肥胖受试人体 IV 使用该 ob 蛋白后与 IV 使用盐水的对照相比摄食的减少来进行测定，该方法如 Muurahainen, N.E. 等所述（Am. J. Physiol 260, 672-680, 1991），在例14和17中详细描述。或者按照 Drent, M.L. 等的方法（Int. J. Obesity 19, 221-226, 1995），给肥胖受试人体反复 IV 使用的方法，测定本发明纯化的鼠和人 ob 蛋白降低体重增加速度的能力（如引起体重减少），该方法在例18中有更详细的描述。

当按照本发明的方法纯化时，本发明的鼠和人ob蛋白具有以下生物活性：

(1) 当采用Haley和McCormick的方法 (supra) 通过颅内 (ICV) 注射以20微克或更少的剂量给体重至少为30g的禁食16-18h的成熟的肥胖ob/ob小鼠使用所述蛋白或多肽时，该蛋白或多肽：

(a) 与注射媒介物的对照小鼠相比，在5小时的进食实验中摄食量减少50% (ED50用于表示减少摄食)；和

(b) 与注射媒介物的对照小鼠相比，在ICV注射之后24小时之内体重增加至少减少50% (ED50用于表示体重增加的减少)。

(2) 当在光照开始和黑暗期间3个小时时，给体重至少为30克的非禁食成熟ob/ob小鼠每天两次腹腔内 (IP) 服用该蛋白或多肽一周时，每天的总剂量为20微克或更少，该蛋白或多肽：

(a) 与注射媒介物的对照小鼠相比，在5小时和24小时的进食实验中减少摄食量至少20% (ED20用于表示减少摄食)；和

(b) 与注射媒介物的对照小鼠相比，在首次IP注射之后24小时之内体重增加至少减少20% (ED20用于表示体重增加的减少)。

另外，尽管在20微克或更少的剂量下会发生体重和摄食的减少，即使在ICV使用时1微克和更少的剂量也会出现这种结果，特别是当该蛋白被纯化成均一物时。

上述生物分析方法和实施例中所详细描述用于测定人和/或鼠ob蛋白生物活性的方法可用于测定该蛋白片段的生物活性，不管该片段是通过蛋白水解降解该ob蛋白、化学合成、通过编码该ob蛋白的一部分DNA序列的重组蛋白表达或是本领域其它任何已知方法而获得。

根据本发明的另一个实施例，本发明的鼠和人ob蛋白可与聚乙二醇或聚丙二醇同聚物缀合，该同聚物可以是未被取代的或是通过用一个低级的烷基基团对其一个末端的羟基基团之一进行酯化而被取代过的。这种缀合使ob蛋白呈一种稳定的形式并改善该蛋白的半衰期。另外，采用这种由聚乙二醇或聚丙二醇同聚物形成的缀合物可以延长该ob蛋白在体内的生物活性的半衰期。而且，还发现该缀合物具有其它的优点，如增加该治疗用ob蛋白在体内的稳定性和循环时间，同时还

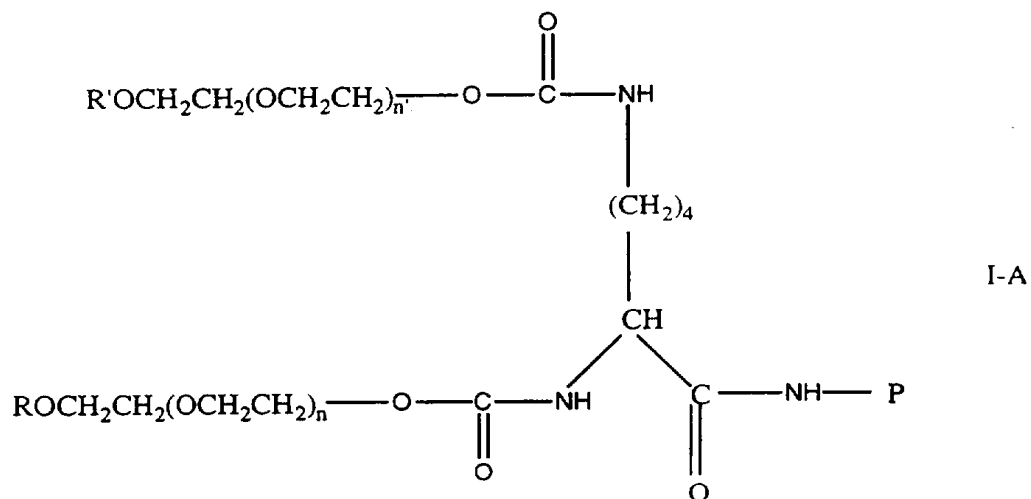
减少该ob蛋白的免疫原性。该peg化的(pegylated)ob蛋白易于被人体吸收并能增加血液系统的吸收。

与ob蛋白缀合的优选聚乙二醇或聚丙二醇同聚物分子量约为15-60kDa,以产生一种可与聚乙二醇或聚丙二醇分子单一或多聚peg化的蛋白。在优选实例中,该ob蛋白被单一或二peg化,以与聚乙二醇或聚丙二醇单元形成一种缀合物,缀合物中的上述单元的总分子量为15-60kDa,最好为35-45kDa。通常,该缀合物是以聚乙二醇和聚丙二醇缀合物的混合物(组合物)形式产生的,因为聚乙二醇和聚丙二醇原料是以具有不同分子量的不同同聚物的混合物形式出售的。上面所述的分子量是由此所产生的ob缀合物的混合物的平均分子量。如有必要,通过常规方法,如包括HPLC在内的柱层析方法将该混合物分离成单一缀合物。不过,在治疗时该缀合物通常是以混合物形式使用。

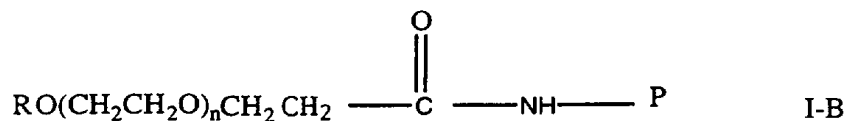
可通过任何常规方法将上述聚乙二醇或聚丙二醇聚合物(PEG)连接到ob蛋白上,以形成缀合物。将聚乙二醇或聚丙二醇连接到ob蛋白上以与其形成缀合物的方法可以是众多已知方法中的任一种。聚乙二醇或聚丙二醇可通过蛋白的N-末端氨基酸与ob蛋白共价结合,也可通过与该ob蛋白上的各个赖氨酸残基而结合。

此外,聚乙二醇或聚丙二醇同聚物也可通过双或多功能连接基团与该ob蛋白缀合。在生产单聚乙二醇或聚丙二醇同聚物缀合物时,采用双功能接头,该同聚物被缀合到该接头的一个官能团上,而ob蛋白的N-末端的氨基酸以及赖氨酸基团可与该接头的其它官能团缀合。通过使用三功能或多功能接头可形成与ob蛋白的三或多(聚乙二醇或聚丙二醇)聚合物即缀合物。该同聚物可与该接头的两个或更多此类官能团缀合,留下一个官能团与ob蛋白连接。这样的接头有具有胺基和羧基官能团的多功能接头。胺基基团可与聚乙二醇或聚丙二醇的功能化的羟基基团缀合以形成酰胺键。羧基基团可与ob蛋白上的胺基基团缀合以形成酰胺键并与乙二醇上的功能化的羟基基团生成酯。可用于在ob蛋白和PEG之间形成缀合物的多种类型的连接基团被披露于以下美国专利中: US4902502, 5034514, 4609546, 5122614和4847325。

本发明的特别优选实施例是以下化学式的缀合物

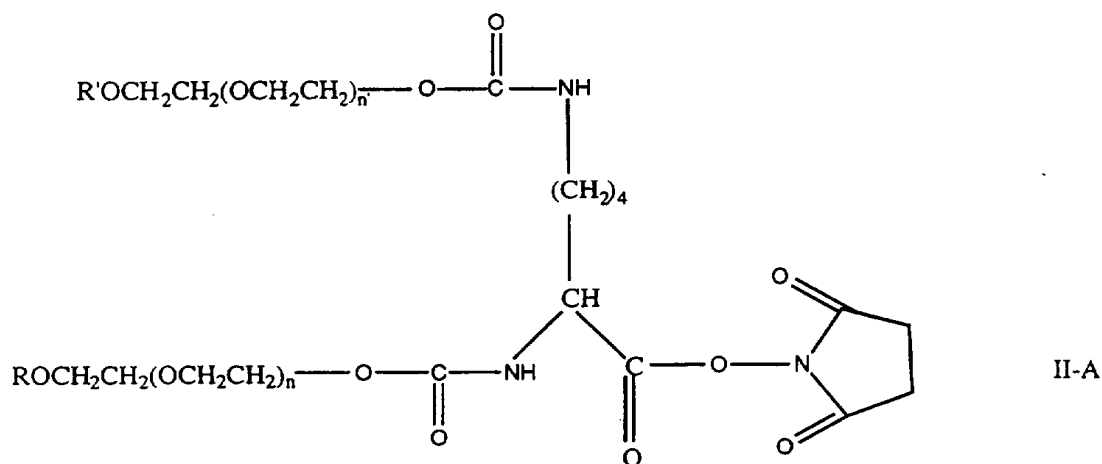


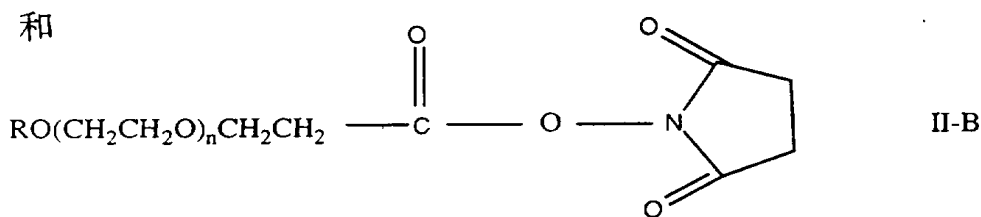
和



其中P表示所述的鼠或人ob蛋白；n和n'表示整数，其总和为300-1200以使得所有PEG单元的平均分子量为15-60kDa，而该缀合物的总分子量为30-80kDa；R和R'表示低级烷基。

可由已知的聚合材料通过将其与本发明的鼠或人的ob蛋白缩合制备式I-A和I-B的化合物。





将活性酯与胺反应以形成酰胺的任何常规方法均可采用。在上述反应中，所述的琥珀酰亚胺酯是一个导致酰胺形成的离去基团。式II-B化合物被用于生产式I-B的化合物，与本发明的鼠或人的ob蛋白的反应是以与所述式II-A化合物转化为式I-A化合物的相同方法进行。与蛋白缀合以产生缀合物的这种琥珀酰亚胺酯，如式II-A化合物披露于Monfardini等人的文章中（*Bioconjugate Chem*, 6, 62-69, 1995）。

就式I-A化合物而言，n和n'的总数为300-1500，以形成一种PEG单元的总平均分子量为15-60kDa，最好为35-45kDa的缀合物。在式I-A的优选实施例中，n和n'的总数为800-1200，使n和n'平均数为850-1000。一般，式I-A和II-A化合物中n与n'的最佳比例为0.5-1.5，最好为0.8-1.2。就式I-B化合物而言，n最好为300-1500，以形成一种具有300-1500个PEG单元、总分子量为15-60kDa，最好为35-45kDa的化合物。在优选实施例中，n大约为850-1000。

按照本发明方法制备的人或鼠ob蛋白，可与可以药用的载体或媒介物一起通过已知方法制备成适于注射的药用组合物。任何常规的载体材料均可采用。该载体材料可以是适于肠道、皮肤或肠胃外使用的有机或无机材料。适用的载体包括水、明胶、阿拉伯树胶、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、滑石、植物油、聚二醇、石油冻等。此外，该药物制剂可含有其它药物活性剂。另外可根据该药用化合物的用途添加诸如香味剂、防腐剂、稳定剂、乳化剂、缓冲液之类的添加剂。其中用于配制本发明的ob蛋白的均一物的优选载体是人血清白蛋白，人血浆蛋白等。

使用重组同源ob蛋白，无论是人的或鼠的或其混合物都会导致胖人和动物的摄食减少和体重下降。因此，使用该ob蛋白表明，该蛋白

在调节人体重量方面起着重要作用。含有人或鼠ob蛋白的药用组合物可配制成用于通过各种方式给遭受体重异常变化（作为一种有害的医学症状或疾病或其一部分，如II型糖尿病）的病人或动物使用的强有效剂量形式。可采用通过注射的多种使用方法，其中有皮下、静脉和腹膜内注射。该ob蛋白的平均量可以变化，在具体使用时应根据有资格的医师或兽医的推荐和处方使用。

根据本发明所制备的人或鼠的ob蛋白，也可用于鉴定ob蛋白受体的筛选方法。

下面例举的实施例并非用于限定本发明。

图1是用于人体ob蛋白的二个克隆的示意图；即hob c11和hob c12，它表示位于该人体ob cDNA序列5'和3'末端的限制性位点的位置和类型。

图2是pLPPsOmpA mob表达载体的结构示意图。

图3是pLPPsOmpA hob1表达载体的结构示意图。

例1

获得人体ob cDNA

该人体ob cDNA是通过筛选通过商业渠道获得的由人脂肪细胞组织得到的RNA组成的 λ 噬菌体cDNA文库（“Clontech”）而获得的。通过 λ 噬菌体文库的杂交，从该文库中得到了二个 λ 噬菌体，它们各自含有与人体ob cDNA序列相关的约2.5kb的片段。通过该方法鉴定了二个克隆，即hob1 cDNA和hob2 cDNA。将该人体ob基因亚克隆到质粒载体DNA pBluescriptSK⁻上，该载体可从Stratagene购买。所得到的带有该人体ob基因序列的载体被称为pBluescriptSK⁻hob1和pBluescriptSK⁻hob2。

通过核苷酸测序分析该pBluescriptSK⁻hob1和pBluescriptSK⁻hob2上的人ob基因序列。由该核苷酸序列产生的氨基酸序列与由SEQ ID NO.4编码的人ob蛋白相应，如Zhang, Y.等人所述（supra）。pBluescriptSK⁻在该hob1 cDNA的终止密码子后有一个T-C突变。该突变导致了StuI限制性位点的丢失，而该位点预计存在于如下的核苷酸序列中：

hob 1

...GGG.TGC.**TGA** GGCCCT TGA...

Gly Cys 终止

pBluescriptSk-hob1

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

Gly Cys 终止

pBluescriptSk-hob2

...GGG.TGC.**TGA** GGCCCT TGA

Gly Cys 终止

由于pBluescriptSK⁺hob1上的这一突变位于人ob cDNA序列的终止密码子之后，它不会导致人ob蛋白氨基酸序列的改变，如Zhang, Y.等人所述（supra）。

就存在于pBluescriptSK⁺hob2上的cDNA核苷酸序列而言，通过对该质粒进行的限制性内切酶分析表明，在人ob cDNA序列的终止密码子后面具有StuI限制性位点。

除了在pBluescriptSK⁺hob1上的终止密码子后面的StuI限制性位点上有一个突变之外，pBluescriptSK⁺hob1在其hob1 cDNA上的ORF之后有一个EcoRI限制性位点，而该位点在hob2 cDNA中是没有的（图1）。

例2

用于鼠ob蛋白（mob）的质粒构建

通过Zhang, Y.等人的方法（supra）获得SEQ ID NO.1的鼠ob cDNA，随后将其插入从Invitrogen(San Diego, California, USA)购买的pCDNA3载体。由此所获得的鼠ob基因被用于构建表达mob的表达载体pLPPsOmpA-mob。该表达载体及其结构如图2所示。

构建的第一步是实现sOmpA基因的信号编码序列与鼠ob基因的成熟编码区即没有其天然信号序列的融合。插入pCDNA3载体中的编码该成熟的鼠ob蛋白的501bp的DNA片段通过聚合酶链式反应（PCR），使用Vent DNA聚合酶(New England Biolabs)进行扩增，使用一个由编码缬氨酸(它是成熟ob的第一个氨基酸)的密码子的第一个核苷酸开始的正向引物(引物1)(Zhang, Y.等,supra),和一个与含有mob的终止密码子的mob区相关的反向引物（引物2）。引物2还带有一个与Hind III 限制性位点相关的序列。

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

引物2: 5' TCCCAAGCTT TCAGCATTTCAGGGCTAAC 3'
HindIII 终止

通过琼脂糖凝胶电泳纯化扩增的501bp的DNA片段，并用T4多聚核苷酸激酶（“Boehringer”）将其磷酸化，随后再用限制性内切酶HindIII消化以在引物2的相关位置形成5'突出末端。所获得的片段具有一个与编码成熟mob的cDNA的第一个核苷酸相应的平端，和一个与切除的HindIII位点相应的5'突出末端。

随后，将通过De Sutter,K.等人的方法（supra）获得的sOmpA质粒pT10sOmpArPDI与mob基因融合，以产生pT10sOmpAmob质粒。为此，通过T4连接酶（“New England-Biolabs”）将mob片段连接到pT10sOmpArPDI载体DNA上进行克隆，该载体预先用限制性内切酶NaeI和HindIII通过已知方法消化过（Sambrook,J.等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989）。该pT10sOmpArPDI质粒是由质粒p714衍生出来的（Parker&Wiley, Gene83, 117-134, 1989）。该质粒带有与sOmpA序列融合的编码成熟鼠蛋白二硫异构酶（rPDI）的cDNA。

sOmpA上最后一个密码子（丙氨酸）与成熟rPDI的cDNA上第1个密码子（甘氨酸）的融合，出现一个NaeI限制性位点，在用NaeI裂解以后以平端形式释放出sOmpA序列上的最后一个密码子和编码rPDI的cDNA序列上的第一个密码子。

NaeI
5'GCC / GGC3'
Ala Gly
sOmpA cDNA / 成熟 rPDI cDNA

在编码rPDI的cDNA的末端存在一个HindIII位点。因此，用HindIII进一步消化该质粒能释放出rPDI cDNA的大部分，并产生一个与该PCR片段的末端之一亲和的突出末端。所得到的质粒的编码rPDI的cDNA被编码成熟鼠ob的cDNA所取代，它被称为pT10sOmpAmob并示于图2中。

用标准的电击法将连接的DNA导入大肠杆菌菌株MC1061，所得到的克隆通过限制性内切酶分析筛选鼠obDNA片段的存在。将具有编码成熟鼠ob蛋白的序列的克隆pT10sOmpAmob与编码sOmpA的序列融合。

随后，mob在大肠杆菌中在该pT10sOmpAmob中的表达被置于脂蛋白启动子（ P_{lpp} ）和lac启动子-操纵基因（ PO_{lac} ）的控制之下。为此，杂合基因sOmpA-mob序列被从质粒pT10sOmpA mob上转移到质粒载体pLPPsOmpArPDI上，采用De Sutter等（supra）的标准方法。如上所述，该pLPPsOmpArPDI质粒是由质粒p714衍生而来的（Parker and Wiley, Gene 83, 117-134, 1989）。对这一步骤而言，质粒pT10sOmpAmob DNA用限制性内切酶XbaI和HindIII进行裂解。然后将带有sOmpA-mob编码DNA的片段连接到质粒pLPPsOmpArPDI上，已通过限制性内切酶XbaI和HindIII裂解预先将sOmpA-rPDI编码DNA从该质粒上面除去。所得到的质粒被称为pLPPsOmpAmob。

例3

鼠ob蛋白在大肠杆菌（MC1061）中的表达

鼠ob蛋白在大肠杆菌中的表达是通过以下方式实现的。将通过例2方法构建的pLPPsOmpAmob质粒通过电击法插入大肠杆菌菌株MC1061。将获得了该质粒的大肠杆菌细胞（MC1061）在补充有抗生素羧苄青霉素（100微克/ml，“Beecham”）的LB培养基（“Difco Laboratories”）中，在28℃下生长过夜。然后将该培养物用做接种物（稀释100倍）接种在30毫升的相同的培养基中在28℃培养过夜。然后再将该培养物在上述培养基中稀释100倍使总体积为3升（例如，6×0.5 l，在1升的三角瓶中），并在28℃下在一台New Brunswick空气振荡器（300rpm）中振荡约4小时，直到A600密度达到0.3-0.5。此时，通过以2mM的最终浓度添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG, Boehringer）激活所述lac启动子，如De Sutter等（supra）所述。该细胞在28℃进一步培养约5小时直到细胞密度达到A600为1.3-1.5。接着，通过在JA10转子（Beckman离心机，J2-21或J2-21M型）上以6750rpm(8000×g)的速度，在4℃下离心6分钟收集该细胞。除

去上清液，并将细胞沉淀迅速再悬浮于250毫升的冰镇渗压休克缓冲液（100mM Tris-HCl, PH7.4, 含有20% 蔗糖，10mM EDTA）中，并按照 Koshland & Botstein所述的方法(supra) 在冰上温育10 - 20分钟。

随后将该悬浮液转移到塑料离心管中并通过以8200rpm (8000 × g) 速度在4℃下在JA20转子中离心5分钟收集细胞。除去上清液，并在剧烈振荡下将细胞沉淀迅速再悬浮于120毫升的冰镇水中，并在冰上再温育10分钟。随后在4℃下以11,500rpm(16,000xg)的速度在JA20转子中离心6分钟，并收集与外周质部分（渗压休克流体）相应的上清液（约120毫升）。将叠氮钠和Tris-HCl (PH7.5) 分别以0.05% 和50mM 的浓度添加进去。将含有鼠ob蛋白的渗压休克流体在-20℃温度下保存直到再次使用。

例4

鼠ob蛋白在大肠杆菌（MC1061）中的表达

鼠ob蛋白的表达是通过例3所述的方法进行的，所不同的是，将 triacilline(100微克/ml)用于补充LB培养基（而不是羧苄青霉素）。

例5

从大肠杆菌渗压流体中提纯鼠ob蛋白

例4所述的120毫升冰冻渗压休克流体中所含的鼠ob蛋白按以下方法提纯。将含有鼠ob蛋白的120毫升渗压休克流体解冻并在JA20转子中在4℃下以16,000rpm的速度离心20分钟，以除去不可溶的碎片。然后将上清液直接上到盛有30毫升床体积的用50mMTris-HCl (PH7.5) 缓冲液预平衡过的Q-Sephrose Fast Flow (Pharmacia) 的柱上。在用50mMTris-HCl (PH7.5) 缓冲液洗涤以后，mob蛋白被含有0.1MNaCl的50mMTris-HCl (PH7.5) 洗脱。

随后，将固体硫酸铵添加到从上述含有Q-Sephrose Fast Flow的柱上洗脱的材料中，使其最终浓度为1.0M，并将该混合物上到用含有1.0M硫酸铵的50mMTris-HCl (PH7.5) 预平衡过的盛有7.5毫升床体积的丁基-Sephrose Fast Flow的柱上。用含1.0M (NH₄)₂SO₄的Tris-HCl(PH7.5)洗涤后，该mob蛋白通过溶于50mMTris-HCl (PH7.5) 缓冲液中的1.0M硫酸铵至溶于水中的20% 乙二醇的梯度而

被洗脱。该mob蛋白在该梯度的最后从丁基Sephacrose Fast Flow柱上洗脱，而大部分杂质被较早地洗脱。通过银染色聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）法测得此时mob蛋白的纯度为90%。

通过凝胶过滤层析进一步提纯从装有丁基Sephacrose Fast Flow的柱上洗脱的材料中的mob蛋白。为此，使用一种8MC浓缩装置（Amicon）在4℃下将鼠ob蛋白在YM10（Amicon）膜上浓缩至1毫升的体积，并将其上到用磷酸缓冲的盐水预平衡过的盛有39毫升G100-Sephadex（Pharmacia）的柱上（1.0cmx50cm）然后收集含有mob蛋白的部分并在YM10膜上浓缩。此时，通过PAGE和银染色法测得该mob蛋白的纯度高于95%。SDS-PAGE显示在分子量15,000处有一条蛋白带。

例6

鼠ob蛋白的序列分析

按照Laemmli,U.K.的方法（supra），对在上述例2、3、4和5中获得并提纯的鼠ob蛋白N-末端氨基酸序列进行测定。在用Bauw,G.等的方法（J.Biol.Chem.7,194-196,1988）将电泳过的蛋白电转移到聚（4-乙烯N-甲基吡啶碘盐）涂敷过的玻璃纤维片上之后，将分子量为15,000的蛋白带从该膜上切除，并通过Edman降解法在一台装配有120A联机乙内酰苯硫尿氨基酸分析仪的470A气相测序仪（Applied Biosystems）上测定N-末端氨基酸序列。通过上述方法获得的鼠ob蛋白的N-末端氨基酸序列为与SEQ ID NO.3的成熟的鼠ob蛋白相应的Val-Pro-Ile-Gln。

例7

人ob蛋白（hob）表达载体的构建

将按例1方法所获得的人ob基因用于构建用来表达人ob蛋白的表达载体pLPPsOmpAhob1，这一构建过程与例2中所述pLPPsOmpAmob的构建相似，并示于图3中。构建带有完整成熟的人ob编码序列的片段需要一个三片段连接过程。

在该构建方法的第一步，将以编码成熟的人ob蛋白的第1个氨基酸（缬氨酸）的密码子的第1个核苷酸开始的hob核苷酸系列与OmpA（sOmpA）的信号编码序列融合，以使sOmpA序列位于该hob核苷酸

编码序列的5'端的上游。通过在含有质粒pBluescriptSK⁺hob1, Vent DNA聚合酶和二种引物的PCR混合物中扩增而获得该DNA片段。正向引物(引物1)以编码成熟的人ob蛋白的第1个氨基酸的密码子的第1个核苷酸开始,而反向引物(引物2)带有人cDNA序列,该序列带有终止密码子。扩增反应所产生的501bp的DNA片段带有编码成熟的人ob蛋白的序列。然后用T4多聚核苷酸激酶将该DNA片段的5'末端磷酸化并用限制性内切酶HindIII消化,以产生具有与编码成熟的hob的cDNA的第1个核苷酸相应的平端(相应于引物1的位置)和一个与切除的HindIII位点相应的5'突出末端的353bp的DNA片段。通过琼脂糖凝胶电泳提纯该353bp DNA片段,并克隆到预先用限制性内切酶NaeI和HindIII消化过的pT10sOmpArPDI质粒上。所得到的质粒pL10sOmpAhob1(部分)具有与编码sOmpA的序列融合的编码一部分成熟的人ob蛋白(氨基端部分)的DNA片段。

引物1: 5' GTGCCCATCCAAAAAGTC 3'

引物2: 5' TCCCAAGCTTTCAGCACCCAGGGCTGAG 3'

终止

在第二步,将编码人ob蛋白的羧基末端部分的DNA序列,即片段2连接到编码成熟的hob的氨基末端部分的DNA片段上,并将所得到的融合到sOmpA上的编码整个成熟的hob序列的片段转移到质粒pLPPsOmpArPDI上以使成熟的人ob蛋白在脂蛋白和lac启动子-操纵基因的控制下在大肠杆菌中表达。为此,用XbaI和HindIII消化质粒pT10sOmpAhob1(部分),并通过琼脂糖凝胶电泳分离400bp的hobDNA片段1。随后用HindIII和EcoRI裂解质粒pBluescriptSK⁺hob1,并通过琼脂糖凝胶电泳分离450bp的片段(片段2)。最后,用XbaI和EcoRI裂解质粒pLPPsOmpArPDI,并通过琼脂糖凝胶电泳分离载体片段(片段3)。然后将DNA片段1、2和3连接在一起,并将连接混合物引入大肠杆菌菌株MC1061中。含有最终的质粒结构pLPPsOmpAhob1的克隆被用于成熟的人ob蛋白的表达和分泌。

例8

人ob蛋白在大肠杆菌(MC1061)中的表达

将根据例7方法构建的pLPPsOmpAhob1用于转化大肠杆菌菌株MC1061，使人ob蛋白以可溶的生物活性形式在该宿主大肠杆菌细胞的外周质中表达。该质粒是通过电击法插入所述宿主大肠杆菌细胞中的。将获得了质粒pLPPsOmpAhob1的大肠杆菌细胞（MC1061）在28℃温度下于补充了抗生素羧苄青霉素（100微克/毫升，Beecham）的LB培养基（Difco.Laboratories）中生长至合适的密度，此后，通过以2mM的最终浓度添加IPTG激活lac启动子，如De Sutter等（supra）所述。使细胞进一步生长，直到细胞密度达到 1.3×10^6 。随后通过离心（ $8000 \times g$, 4℃）收集细胞并将细胞沉淀迅速再悬浮于冰镇的渗压休克缓冲液（100mM Tris-HCl, PH7.4，含有20%蔗糖和10mM EDTA）中，并在冰上温育10分钟，如Koshland&Botstein所述。

随后，再按上述方法收集细胞并将细胞沉淀再悬浮于冰镇的水中，并在冰上温育10分钟。该悬浮液以 $16,000 \times g$ 的离心力离心5分钟并收集上清液（渗压休克流体）。分别以0.05%和50mM的终浓度添加叠氮钠和Tris-HCl（PH7.5）。将含有人ob蛋白的渗压休克流体于-20℃保存直到再次使用。

例9

人ob蛋白在大肠杆菌（MC1061）中的表达

人ob蛋白的表达是采用例8所述方法实现的，所不同是将triacycline（100微克/ml）用作抗生素补充到LB培养基中，而不是用羧苄青霉素。

例10

从大肠杆菌渗压流体中提纯人ob蛋白

为了提纯例9的渗压休克流体中的人ob蛋白，以0.1M终浓度将NaCl加入该流体中，然后将该流体直接上到装有30毫升床体积的用50mM Tris-HCl（PH7.5）缓冲液预平衡的Q-Sephrose Fast Flow的柱上。

随后，将固体硫酸铵加入从含有Q-Sephrose Fast Flow柱上洗脱的流通材料中，终浓度为1.0M，并将该混和物上到用含有1.0M硫酸铵的50mM Tris-HCl（PH7.5）缓冲液预平衡过的含有7.5毫升床体积丁基Sephrose Fast Flow的柱上。在用含有1.0M硫酸铵的50mM Tris-HCl

(PH7.5) 缓冲液洗涤之后, 该ob蛋白被通过使用从溶解于50mMTris-HCl (PH7.5) 缓冲液中的1.0M硫酸铵至溶于水中的20% 乙二醇的梯度洗脱。该ob蛋白在该梯度的最后被从含有丁基Sephacose Fast Flow的柱上洗脱, 而大部分杂质被较早洗脱。在这一步hob蛋白的纯度通过银染色聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 测定为90%。

从含有丁基Sephacose Fast Flow的柱上洗脱的材料中所含hob蛋白, 通过凝胶过滤层析进一步提纯。为此, 采用8MC浓缩装置 (Amicon) 在YM10膜 (Amicon) 上在4℃ 温度下将人体ob蛋白浓缩至1毫升, 并将其上到用磷酸缓冲的盐水预平衡过的含有39ml G100 - Sephadex (Pharmacia)的柱上 (1.0cmx50cm)。然后收集含有hob蛋白的部分并在YM10膜上浓缩该蛋白。此时, 通过PAGE和银染色法测得hob蛋白的纯度高於95%。对洗脱液的SDS PAGE分析表明, 在15, 000的分子量处有一条蛋白带。

例11

从大肠杆菌渗压流体中提纯人ob蛋白

为了纯化例9中渗压休克流体中所含有的人体蛋白, 采用例10的方法, 所不同的是在将固体硫酸铵加入所述流通材料之前, 对例9所述的渗压休克流体作以下步骤的处理。

将例9中渗压休克流体所含的人体ob蛋白直接上到用50mMTris-HCl (PH7.5) 缓冲液预平衡过的装有30ml床体积Q - Sepharose Fast Flow (Pharmacia) 的柱上。在用50mMTris-HCl (PH7.5) 缓冲液洗涤之后, 用含有0.1MNaCl的50mMTris-HCl (PH7.5) 缓冲液将hob蛋白洗脱。

例12

人ob蛋白的序列分析

按照Laemmli, U.K.等人的方法 (supra), 对用例7 - 11的方法提纯并获得的人ob蛋白的N - 末端氨基酸序列进行分析。在用Bauw, G.等人的方法 (supra) 将电泳过的蛋白电转移到聚 (4 - 乙烯N - 甲基吡啶碘盐) 涂敷过的玻璃纤维片上之后, 将分子量为15, 000的蛋白带从该膜上切除, 并通过Edman降解法在一台装配有120A联机乙内酰苯硫尿氨基酸分析仪的470A气相测序仪 (Applied Biosystems) 上测定N - 末端

氨基酸序列。通过上述方法获得的hob蛋白的N-末端氨基酸序列为与SEQ ID NO.6的成熟的人ob蛋白相应的Val-Pro-Ile-Gln。

例13

鼠ob蛋白生物活性:

颅内 (ICV) 注射ob/ob小鼠

采用下面的ICV方法测定用例5方法纯化的成熟鼠ob蛋白的生物活性。根据Haley和McCormick的方法 (supra), 采用以下参数 (距中线侧2毫米; 与前囟相距0.6毫米; 2毫米下) 将输液插管植入被麻醉的雌性肥胖ob/ob小鼠 (6-13周龄) 的脑侧室中。该插管的一端用宝石螺钉和补齿粘合剂安装在其头盖骨上。将小鼠单独圈养在塑料笼子中, 并留有放进食物 (在ICV注射之前的一夜除外) 和水的空间。在小鼠从手术后恢复日常进食和增加体重之后, 通过ICV注射1微升的下述试验溶液之一研究小鼠在几种情况下的表现:

- (1) 人工CSF;
- (2) 细菌对照溶液;
- (3) ob蛋白 (0.6-1微克/鼠); 或
- (4) 不输液。

将上述试验溶液之一ICV注射到每只小鼠体内之后, 用1微升人工CSF清洁插管。在该实验中, 所述细菌对照溶液是一种按上述例2-4方法处理并制备的样品, 只是插入大肠杆菌细菌中的质粒缺少鼠ob基因。

在ICV注射之前将小鼠禁食18小时 (过夜)。将小鼠稍加约束并将一个装有1个预先校准过的聚乙烯管 (PE20) 的10微升的Hamilton注射器用于把1微升的试验溶液注射到置于脑侧室的插管中。然后立即把小鼠放入试验笼中, 其中放有盛有预先称重过的丸化鼠饲料的盘子和水瓶。用肉眼观察小鼠, 并在随后的7小时内测量摄食。在ICV注射之后的0.5、1、2、3、4、6和7小时获得摄食测量数据。在ICV注射之前和24小时之后测定每只小鼠的体重。Morley, J.E.等 (American J. Physiol. 253, 516-522, 1987) 通过在给禁食2小时的小鼠ICV注射10微克神经肽Y后的摄食增加, 证实成功的插管放置。

上述ICV试验的结果如下:

A. 减少摄食

在ICV注射之后的前30分钟之内，几乎所有小鼠都有一个短的进食潜伏期并仅食用约0.5克。而未接受注射或注射人工CSF的小鼠在随后的6.5小时中持续进食并在7小时内累计进食达3.2克（表1）。相反，用ob蛋白ICV处理的小鼠在头30分钟后停止进食并再也不吃东西。因此，在随后的6.5小时其累计进食被抑制在约0.5克（表1）。接受媒介物对照溶液ICV处理的小鼠30分钟之后也停止进食，并在6-7小时之间才开始进食。

B. 体重增加降低

24小时内注射媒介物对照的小鼠体重变化仅略低于注射人工CSF或未经注射的小鼠的体重（表1）。然而，注射ob蛋白的小鼠的体重变化的百分率几乎为零，并明显低于注射媒介物对照的小鼠（表1）。

C. 结论

直接使用重组鼠ob蛋白（1.1微克/鼠，1微升，用于大脑）后所观察到的效果是雌性ob/ob小鼠进食和体重增加的持续而明显减少。这表明，ob蛋白可直接作用于大脑，并与腹膜内注射该ob蛋白的效果一致。该实施例还证实了本发明的细菌表达的重组鼠ob蛋白对雌性肥胖ob/ob小鼠的生物活性。

表1

处 理	摄食量（0.7小时）		体重增加（0-24小时）	
	g	%**	g	%
人工CSF	3.2 ± 0.2	100	3.8 ± 0.3	100
媒介物对照	0.9 ± 0.3	28.1	2.9 ± 0.2	76
ob蛋白 (1微克/鼠)	0.5 ± 0.1*	15.6	0.3 ± 0.5*	8

*表示ob蛋白组与人工CSF（脑脊髓液）组之间的显著性差异，p小于0.05。

**表示对照百分比

例14

给ob/ob小鼠静脉（IV）注射鼠ob蛋白的生物活性

通过以下述方式给肥胖ob/ob小鼠IV注射按例2、3、4和5方法获得并提纯的鼠ob蛋白，以试验其生物活性。

根据 Mokhtarian A.等 的方法 (*Physiol.Behav*,54,895-898,1993)，将长期的颈部插管在戊巴比妥麻醉 (80mg/kg体重) 条件下植入雄性和雌性肥胖ob/ob小鼠 (6 - 13周龄) 体内。将小鼠在12小时黑暗/12小时光照循环的稳定环境条件下单独圈养在塑料笼中。在输液中每天测量体重，并通过输入小于或等于0.1ml无菌肝素/盐水溶液 (50U/ml，溶于0.9%的盐水中) 在第二天证实插管的效用。在通过测定体重增加证实其从手术中完全恢复之后，将小鼠禁食16 - 18小时 (过夜)。次日晨，将小鼠称重并将其放入试验笼中45分钟，在试验之前进行驯化。不断供水。分别给小鼠静脉注射ob蛋白 (3微克，0.1毫升) 或等体积的媒介物对照或盐水 (0.9%) 溶液。对苏醒的小鼠稍加约束，并用0.5毫升的胰岛素注射器将0.1ml的试验溶液注射到其体内，随后再注射0.05ml的肝素/盐水。试验至少分三天进行。随后立即把小鼠换到放有盛着鼠饲料丸的盘子的试验笼中。用肉眼观察小鼠，并在IV注射后的0.5、1、2、3、4、6和7小时测定7小时内的摄食。IV注射前称量体重，24小时后再次称量。将二组插管的小鼠 (11只ob/ob鼠和12只瘦鼠) 用于5个单独的试验。大多数小鼠接受鼠ob蛋白，1或2个对照以相应的顺序注射。将二种不同的鼠ob蛋白制剂用于该实验。所给出的数据为这些重复试验结果的综合。

A.结果

上述实验的结果如下：

在IV注射之后的前30分钟之内，大多数肥胖小鼠和瘦小鼠的进食有一个短的潜伏期，只吃约0.3-0.5克。而注射盐水和媒介物对照的肥胖小鼠在该实验中摄食增加。注射媒介物对照的肥胖ob/ob小鼠的累计摄食量与注射盐水的被类似禁食的小鼠的摄食量没有差别。相反，注射了重组ob蛋白的肥胖ob/ob小鼠的摄食量明显下降，并被抑制为对照的57% (表2)。在7小时的观察期间，未发现媒介物对照组与ob蛋白组在行为效果方面的其它作用。正如所预料的，在处理组中 (表2) 注射后24小时的体重增加没有区别，由于鼠ob蛋白单一IV团块的作用时间是有限的。

B. 结论

这些结果表明，在给肥胖ob/ob小鼠IV使用重组鼠ob蛋白（3微克/鼠）之后，可明显减少累计的7小时摄食量。重组鼠ob蛋白这一减少肥胖ob/ob小鼠摄食的能力与给肥胖ob/ob小鼠反复IP注射这种ob蛋白所产生的摄食方面的效果是一致的。该实施例还证实了细菌表达的重组鼠ob蛋白的在雌性肥胖ob/ob小鼠上的生物活性。

表2:给ob/ob小鼠IV使用鼠ob蛋白

处 理	摄食量（0-7小时）		体重增加（0-24小时）	
	g	%**	g	%
盐水（n=4）	1.8 ± 0.2		2.9 ± 0.3	
媒介物对照 （n=7）	1.4 ± 0.3	100	2.2 ± 0.6	100
ob蛋白 （1微克/鼠） （n=8）	0.8 ± 0.2*	57	1.4 ± 0.6	64

表中的数据为平均值 ± 平均标准误差，n = 表示小鼠个体数，*表示ob蛋白组与人工CSF组之间显著性差异，p小于0.05。

**表示对照的百分比

例15

鼠ob蛋白的生物活性：给ob/ob小鼠反复IP注射。

通过给肥胖ob/ob小鼠反复IP注射在例2-5中获得并提纯的鼠ob蛋白，检验其生物活性。方法如下：

对三组六只雌性肥胖ob/ob小鼠进行研究。将小鼠在稳定的环境条件下圈养于塑料笼中（每笼3只），给予12小时黑暗/12小时光照的循环。每日测量24小时的摄食量和体重。在经历一个适应环境条件和日常处理与注射的时期以后，将上述小鼠分成3个处理组。每只小鼠每天接受二次IP注射（在黑暗/光照周期的黑暗阶段开始之前不久和进入黑暗阶段3小时），注射0.1ml的下列试验溶液：

（1）盐水（0.9%）；

(2) 细菌对照溶液; 或

(3) 鼠ob蛋白 (3微克/0.1毫升)。

细菌对照溶液为按例2-4获得ob蛋白相同方法而获得的样品, 不同的是插入大肠杆菌细菌的质粒缺少鼠ob基因。在5天内每天2次处理小鼠。接下来2天不进行处理。在每个处理日的第1次IP注射之后的第2、3、5和24小时测定每只笼子的摄食量。

A. 结果

摄食减少

在一周的实验中, 在处理和非处理日, 注射盐水和细菌对照的小鼠的摄食量没有差别 (表3)。不过, 在该实验的处理日中注射了6微克ob蛋白的6只小鼠的摄食量减少。与细菌对照和盐水对照组相比, 在处理日的首次注射ob蛋白之后第2、3、5和24小时观察到摄食的减少。

体重增加下降

ob蛋白组在5个处理日的累计体重增加为 -3.3 ± 0.7 克, 而盐水组为 -0.9 ± 0.2 克, 细菌对照组为 -0.7 ± 0.4 克 (表3)。

结论

该实施例表明, 与盐水和细菌对照处理的ob/ob小鼠相比, 每日给ob/ob小鼠2次IP注射细菌表达的鼠ob蛋白 (6微克/鼠/日) 会导致摄食的明显、持续的减少以及体重增加速度的明显下降。上述结果表明, 细菌表达的鼠ob蛋白具有生物活性, 并具有本发明所期望的对遗传性肥胖ob/ob小鼠的抗肥胖效果。在表3中, 2和3小时的结果为每日摄食量的平均值, 而24小时的结果为5天累计摄食量。

表3: 给ob/ob小鼠反复IP使用鼠ob蛋白

处理	摄食量（克/3只鼠）						体重增加
	2小时		5小时		24小时		克
	g	对照 %	g	对照 %	g	对照 %	
未注射	5.5 ± 0.5		14.5 ± 0.5		44.3 ± 3.5		- 0.9 ± 0.2
对照	7.0 ± 0.5	100	16.5 ± 1.5	100	49.5 ± 6.1	100	- 0.7 ± 0.4
ob蛋白	3.5 ± 0.5*	50	5.5 ± 1.0*	33	25.5 ± 4.6*	52	- 3.3 ± 0.7*

表中数据为每组6只ob/ob小鼠的平均值 $\pm$ 平均标准误差。摄食量为在5天的处理期间，在首次IP注射之后第2、5和24小时装有3只小鼠的笼子的平均累计摄食量。体重增加为在5天处理期间体重的累计变化。*表示ob蛋白组和媒介物组之间的显著性差异，p小于0.05。

例16

人ob蛋白的生物活性：给ob/ob小鼠颅内（ICV）注射

通过给ob/ob小鼠ICV注射以测定人ob蛋白的生物活性的方法与例13的方法相同，不同的是试验溶液为：

· 将例11中生产的重组人ob蛋白（0.05 微克）溶于含有0.1% 鼠血清白蛋白的磷酸缓冲盐水（PBS）中；和

· 将含有0.1%（w/v）的鼠血清白蛋白（白蛋白对照）的PBS用作媒介物对照溶液。

A.减少摄食

在ICV注射之后的前30分钟之内，几乎所有小鼠的进食都有一个短暂的潜伏期并仅食用约0.5克。而未接受注射的小鼠在随后的6.5小时中持续进食并在7小时内累计进食达1.8克（表4）。接受白蛋白对照溶液ICV的小鼠30分钟之后也停止进食，并在3-7小时才开始进食。相反，用人ob蛋白ICV处理的小鼠在头30分钟进食明显减少（0.2克），并在以后的6.5小时中只吃极少量的食物。因此，在随后的6.5小时内其累计摄食量仍被抑制在约0.4克（表4）。

B.体重增加下降

与注射人工CSF或未注射小鼠相比，注射媒介物对照的小鼠24小时的体重变化略有下降（表4）。不过，注射人ob蛋白的小鼠的体重变化百分比几乎为零（表4）。

C.结论

所观察到的给雌性ob/ob小鼠的大脑直接使用重组人ob蛋白（0.5微克/鼠，1微升）导致摄食和体重增加持续而明显下降的效果表明，ob蛋白可直接作用于大脑，并与IP注射ob蛋白的效果一致。该实施例还证实了细菌表达的重组人ob蛋白对雌性肥胖ob/ob小鼠的生物活性。

表4: 给ob/ob小鼠ICV使用人ob蛋白

处 理	摄食量 (0.7小时)		体重增加 (0-24小时)	
	g	%**	g	%**
未注射 (n=3)	1.8 ± 0.2		3.1 ± 0.4	
白蛋白对照 (n=3)	1.0 ± 0.4	100	1.7 ± 0.6	100
人ob蛋白 (1微克/鼠) (n=5)	0.4 ± 0.2*	40	0 ± 0.8	0

表中数据为平均值 ± 平均标准误差。N = 表示小鼠只数。*表示人ob蛋白组与人工CSF组之间的显著性差异，p小于0.05。**表示对照百分比

例17

ob蛋白对受试胖人的生物活性：在IV使用之后对试验食物摄取的减少。

通过下述方法，测定给人体IV使用之后试验食物摄取量，以测定分别按照例7 - 11方法获得并提纯的鼠和人ob蛋白的生物活性。

采用Muurahainen,N.E.等的方法 (supra)，在一个进食实验室中以固定的热量给瘦人和胖人志愿者提供试验食物。至少在提供食物之前1小时将一根埋藏IV导管放入肘前或前臂静脉中，并用一个肝素夹保持开放。获得进食前15分钟、进食后15分钟和在进食结束时的目视类似饥饿速度，然后在进食之前20分钟将鼠或人ob蛋白或盐水IV输入。每个受试对象被告知吃尽可能多的食物，直到满意为止。测定每个受试对象摄入的试验食物量。然后给各实验对象输入人ob蛋白 (0.5mg/kg体重)、鼠ob蛋白 (0.5mg/kg体重) 或盐水，并计算在该条件下摄入的试验食物量的差别。在人或鼠ob蛋白组中，食物的消耗量下降至少20%。

例18

ob蛋白对胖人受试对象的生物活性：反复IV使用后的体重减少下降。

通过下述方法，测定给人体反复IV使用ob蛋白之后体重减少以测定分别按照例7-11方法获得并提纯的鼠和人ob蛋白的生物活性。

采用Drent, M.L. 等的方法 (supra) 进行安慰物对照双盲体重减少研究。给体重指数 (BMI) 大于27的胖人称重，并在2-4周内为其提供1500Kcal的食物。在这一时期结束时，将所有减重至少1kg的胖人随机分成二个处理组，在该试验阶段与体重下降匹配。每日给受试对象IV使用人或鼠ob蛋白 (0.5mg/kg/日) 或安慰物 (盐水) 至少6周。每周记录体重。在6周的处理之后，接受人或鼠ob蛋白的受试对象比使用安慰物组的体重明显下降。

例19

A. 由大肠杆菌细胞制备聚乙二醇缀合的ob蛋白

将例8中制备的50克大肠杆菌细胞沉淀于再悬浮之前悬浮于11的含有5mMEDTA的Tris-HCl (PH8.5) 中。该悬浮液在37℃下温育15分钟，再用含有5mMEDTA的11的Tris-HCl (PH8.5) 稀释。随后，用匀浆器以50%的设定功率将该悬浮液匀浆15分钟。在4℃下以8000rpm的速度离心1小时使悬浮液沉淀。弃除沉淀物。用水将上清液稀释至导电率为1.8mS，并直接上到装有200ml Q-Sepharose Fast Flow (强阴离子交换树脂) 的用Tris-HCl (PH8.5) 预平衡过的柱上。在用该平衡缓冲液洗涤之后，被吸附的ob蛋白被含有100mM NaCl的相同平衡缓冲液从柱上洗脱。用含有氯化钠的平衡缓冲液处理该柱之后获得的洗脱液被称为Q-Sepharose洗脱物。

将固体氯化钠加入该Q-Sepharose洗脱物中使最终的导电率达到82mS。此后，将该洗脱物上到装有200ml 丁基Sepharose Fast Flow的用含有1M NaCl的50mM Tris-HCl (PH8.5) 预平衡过的疏水柱 (HIC) 上。未被吸附的材料由平衡缓冲液洗脱，而被吸附的ob蛋白被50mM的乙酸铵 (PH6.9) 洗脱，得到HIC洗脱物。通过反相HPLC测得该HIC洗脱物中ob蛋白的纯度为95%。采用一种筛分膜 (YM-10) 将提纯的ob蛋白浓缩至3.7mg/ml。该筛分膜是一种能留住分子量为10000Da或更大的分子的膜。在采用筛分膜的该浓缩步骤之后，将ob蛋白渗滤到100mM 硼酸缓冲液 (PH8.0) 中，将其用作ob母液。

B. 人ob蛋白的PEG化

在进行该PEG化反应时，采用式II - A的 PEG_2 - NHS试剂，其中R是 CH_3 ，n和n'的总数为820 - 1040，平均总数为约930，平均分子量为40kDa，该试剂购自Shearwater Polymers (Huntsville, Alabama)。它是式II - A的 PEG_2 - NHS试剂的混合物，其中n与n'比例为约0.1，而该混合物中n和n'的总数为820 - 1040个单位，该混合物中PEG链的平均分子量为约20kDa，以使得该试剂的平均分子量约为40kDa，该混合物中n和n'平均总数为930。向在上述部分A中制备的2mg或0.54ml的3.7mg/ml纯化人ob母液中加入250nmoles的上述 PEG_2 - NHS试剂溶液。该溶液由溶于1mMHCl中的10mg或0.1ml的 PEG_2 - NHS试剂溶液组成。通过加入100mM的硼酸 (PH5.0) 使反应混合物的总体积为0.67ml，蛋白与该试剂最终摩尔比为1: 2。在4℃下搅拌该混合物4小时并加入1微升冰醋酸终止反应，使最终的PH为4.5。用水将所得反应混合物 (0.67ml) 稀释成27ml的溶液，并将其上到装有1.7ml羧基甲基化阳离子交换树脂的柱上 (Perseptive, Framingham, Massachusetts)。用3.3 μM 的HEPES/MES/乙酸钠缓冲液 (PH5.0) 平衡该柱。将稀释过的反应混合物上到该柱上，并将未被吸附的 PEG_2 - NHS试剂从柱上洗脱。用80、150和500mMNaCl的梯度盐溶液 (各为15倍的柱体积) 洗脱被吸附的PEG化和未改性的ob蛋白。依次分别收集2ml的该洗脱物，并对每一部分进行SDS - PAGE分析。通过该分析，该洗脱物被确认为高度PEG化的缀合物，理想分枝的单 - PEG - ob (PEG_2 - ob) 和未改性的ob蛋白。将上述各部分集中到上述类型的收集物中，而第2部分收集液中含有理想分枝的单 - PEG - ob蛋白。该理想蛋白具有式I - A化合物的结构，其中n和n'的总数约为820 - 1040，平均总数约为930，R和R'为 CH_3 ，每个PEG链的平均分子均约为20kDa。PEG化的产物具有约为56kDa的平均分子量。采用YM10膜将含有 PEG_2 - ob的收集液浓缩至3.7mg/ml。YM10是一种能留住分子量为10000Da或更大的分子的筛分膜。在该筛分步骤之后，将浓缩材料渗滤到PBS缓冲液 (PH7.3) 中并在 - 20℃冰冻保存。该保存物为PEG化的式I - A蛋

白，其中n和n'的总数约为820 - 1040，每条ob链的平均分子量约为20kDa。在该ob蛋白缀合混合物中的PEG蛋白的平均分子量为56kDa。

例20

PEG化的人ob蛋白的生物学试验：给ob/ob小鼠一次IP注射
方法

对两组六只雌性胖ob/ob小鼠进行研究。在稳定环境条件下将鼠圈养于塑料笼中（3只/笼），给予12小时黑暗/12小时光照周期。每天测定24小时摄食量和体重。在适应该环境条件、日常处理和注射一段时间之后，将小鼠分成2个处理组。在该实验的第1天给小鼠腹膜（IP）注射一次（在黑暗/光照周期的黑暗阶段开始之前）0.1ml的下述溶液：盐水（0.9%）；例19中A部分所制备的人ob蛋白母液；PEG化的对照溶液（按相同方法制造并提纯的不含人ob蛋白的溶液）或按例19的A部分方法制备的PEG化ob蛋白（30微克/0.1ml）。在第一天仅给小鼠注射一次。在随后三天测量每日每只笼子的摄食量和每只小鼠的体重，并在第6天再次测定。

结果

A)摄食减少

在一次处理的当天和随后二天注射盐水和PEG化对照的每日摄食量没有差别（表5）。不过，与注射盐水和PEG化对照的小鼠相比，注射30微克人ob蛋白和PEG化人ob蛋白的6只小鼠在处理当天的日进食量减少（5.2，8.2对11.9，11.4克）。在该实验的以后几天，注射人ob蛋白的小鼠的摄食量恢复到对照水平，而注射PEG化人ob蛋白的小鼠的摄食量仍保持减少。在一次注射PEG化人ob蛋白组中，48小时以后观察到摄食量下降。与盐水和PEG化对照组相比，注射PEG化人ob蛋白的小鼠在该实验3天中的24小时累计进摄食量明显降低至对照的49%。

B)体重增加下降

在一次处理的当天和随后2天注射盐水和PEG化对照的小鼠在体重变化方面没有区别（表6）。不过，与注射盐水和PEG化对照的小鼠相比，6只注射了30微克人ob蛋白和PEG化人ob蛋白的小鼠在处理当天体重下降（-0.9，-0.7对0.1，0.3克）。在该实验的以后几天注射人ob蛋白的小鼠体重恢复到对照水平，而注射PEG化人ob蛋白的小鼠体

重继续下降。在一次注射PEG化人ob蛋白组的48小时之后观察到体重的持续下降。与ob蛋白组的-1.6克，盐水对照组的0.7克和PEG化对照组的 1.1 ± 0.2 克相比，在该实验的6天中其体重的累计变化为-1.6克（表6）。

结论

该实施例表明，与用盐水和PEG化对照处理的ob/ob小鼠相比，在3天中用PEG化人ob蛋白（30微克/鼠）一次IP注射处理的雌性ob/ob小鼠会出现明显而持续的摄食减少和明显的体重下降。这一结果表明，PEG化的人ob蛋白具有持续有效的生物活性并具有所期待的对遗传性肥胖ob/ob小鼠的抗肥胖作用。

表5：给ob/ob小鼠一次IP使用PEG化人ob蛋白的日进食量

处理	摄食量（3只鼠/日）					
	第一天		第二天		第三天	
	克	对照 %	克	对照 %	克	对照 %
盐水	11.9	100	13.7	100	13.6	100
ob蛋白	5.2	43.7	1.7	85.4	12.5	92
PEG化对照	11.4	95.8	4.5	106	13.4	99
PEG化人ob蛋白	8.2	68.9	6.0	43.8	4.9	36

表中数据为每一组中6只ob/ob小鼠的平均值。摄食量为装有3只小鼠的笼子在实验的第一天中一次IP注射之后的每一天的平均日进食量。仅在PEG化ob蛋白组观察到日进食量的持续下降。

表6：给ob/ob小鼠一次IP使用PEG化人ob蛋白的体重变化

处理	体重变化（克）			
	第一天	第二天	第三天	第六天
盐水	0.1	0.6	0.01	-0.01
ob蛋白	-0.9	1.1	0.2	ND
PEG化对照	0.3	0.4	0.6	-0.2
PEG化人ob蛋白	-0.7	-0.6	-0.9	0.6

表中数据为每组中6只ob/ob小鼠的平均值。仅在第1天给小鼠IP注射一次。体重变化为处理日中每一天的体重变化。仅在PEG化ob蛋白组中观察到持续的体重下降。ND表示未测定。

序列清单

(1) 一般资料:

(i) 申请人:

(A) 姓名: F.HOFFMANN-LA ROCHE AG

(B) 街道: Grenzacherstrasse 124

(C) 城市: Basle

(D) 州: Bs

(E) 国家: 瑞士

(F) 邮政编码 (ZIP): CH - 4070

(G) 电话: 061 - 6884256

(H) 传真: 061 - 6881395

(I) 电传: 962292/965542 hlr ch

(ii) 发明名称: 重组肥胖 (ob) 蛋白

(iii) 序列号: 8

(iv) 计算机可读形式:

(A) 媒体类型: 软盘

(B) 计算机: Apple Macintosh

(C) 操作系统: 系统7.1 (Macintosh)

(D) 软件: Word5.0

(2) 有关SEQ ID NO. 1的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 702bp

(B) 种类: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) SEQ ID NO. 1的序列

CAAGGTGCAA GAAGAAGAAG ATCCCAGGGA GGAAAATGTG CTGGAGACCC CTGTGTCGGT	60
TCCTGTGGCT TTGGTCCTAT CTGTCTTATG TTCAAGCAGT GCCTATCCAG AAAGTCCAGG	120
ATGACACCAA AACCCTCATC AAGACCATTG TCACCAGGAT CAATGACATT TCACACACGC	180
AGTCGGTATC CGCCAAGCAG AGGGTCACTG GCTTGGACTT CATTCCTGGG CTTACCCCCA	240
TTCTGAGTTT GTCCAAGATG GACCAGACTC TGGCAGTCTA TCAACAGGTC CTCACCAGCC	300
TGCCTTCCCA AAATGTGCTG CAGATAGCCA ATGACCTGGA GAATCTCCGA GACCTCCTCC	360
ATCTGCTGGC CTTCTCCAAG AGCTGCTCCC TGCCTCAGAC CAGTGGCCTG CAGAAGCCAG	420
AGAGCCTGGA TGGCGTCCTG GAAGCCTCAC TCTACTCCAC AGAGGTGGTG GCTTTGAGCA	480
GGCTGCAGGG CTCTCTGCAG GACATTCTTC AACAGTTGGA TGTTAGCCCT GAATGCTGAA	540
GTTTCAAAGG CCACCAGGCT CCCAAGAATC ATGTAGAGGG AAGAAACCTT GGCTTCCAGG	600
GGTCTTCAGG AGAAGAGAGC CATGTGCACA CATCCATCAT TCATTTCTCT CCCTCCTGTA	660
GACCACCCAT CCAAAGGCAT GACTCCACAA TGCTTGACTC AA	702

(2) 有关SEQ ID NO. 2的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167个氨基酸

(B) 种类: 氨基酸

(C) 链型: 不涉及

(D) 拓扑学: 未知

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) SEQ ID NO. 2的序列

```
Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu
1          5          10          15
Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
20          25          30
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
35          40          45
Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
50          55          60
Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
65          70          75          80
Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln
85          90          95
Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala
100         105         110
Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro
115         120         125
Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val
130         135         140
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln
145         150         155         160
Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys
165
```

(2) 有关SEQ ID NO. 3的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 146个氨基酸

(B) 种类: 氨基酸

(C) 链型: 不涉及

(D) 拓扑学: 未知

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) SEQ ID NO. 3的序列

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

(2) 有关SEQ ID NO. 4的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 690bp

(B) 种类: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) SEQ ID NO. 4的序列

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

(2) 有关SEQ ID NO. 5的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167个氨基酸

(B) 种类: 氨基酸

(C) 链型: 不涉及

(D) 拓扑学: 未知

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) SEQ ID NO. 5的序列

```
Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1          5          10          15
Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
20          25          30
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
35          40          45
Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
50          55          60
Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
65          70          75
Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln
85          90          95
Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala
100         105         110
Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu
115         120         125
Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val
130         135         140
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln
145         150         155         160
Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
165
```

(2) 有关SEQ ID NO. 6的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 146个氨基酸

(B) 种类: 氨基酸

(C) 链型: 不涉及

(D) 拓扑学: 未知

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) SEQ ID NO. 6的序列

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

(2) 有关SEQ ID NO. 7的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 63bp

(B) 种类: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) SEQ ID NO. 7的序列

ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTAGCGCAG 60

GCC 63

(2) (2) 有关SEQ ID NO. 8的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21个氨基酸

(B) 种类: 氨基酸

(C) 链型: 不涉及

(D) 拓扑学: 未知

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) SEQ ID NO. 8的序列

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

Thr Val Ala Gln Ala
20

说明书附图

图 1

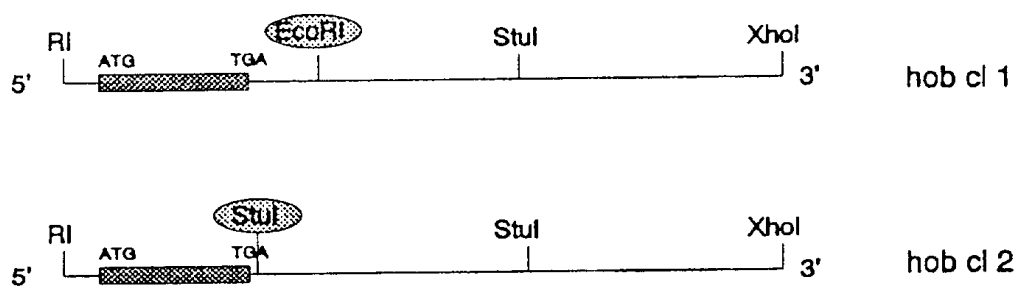


图 2

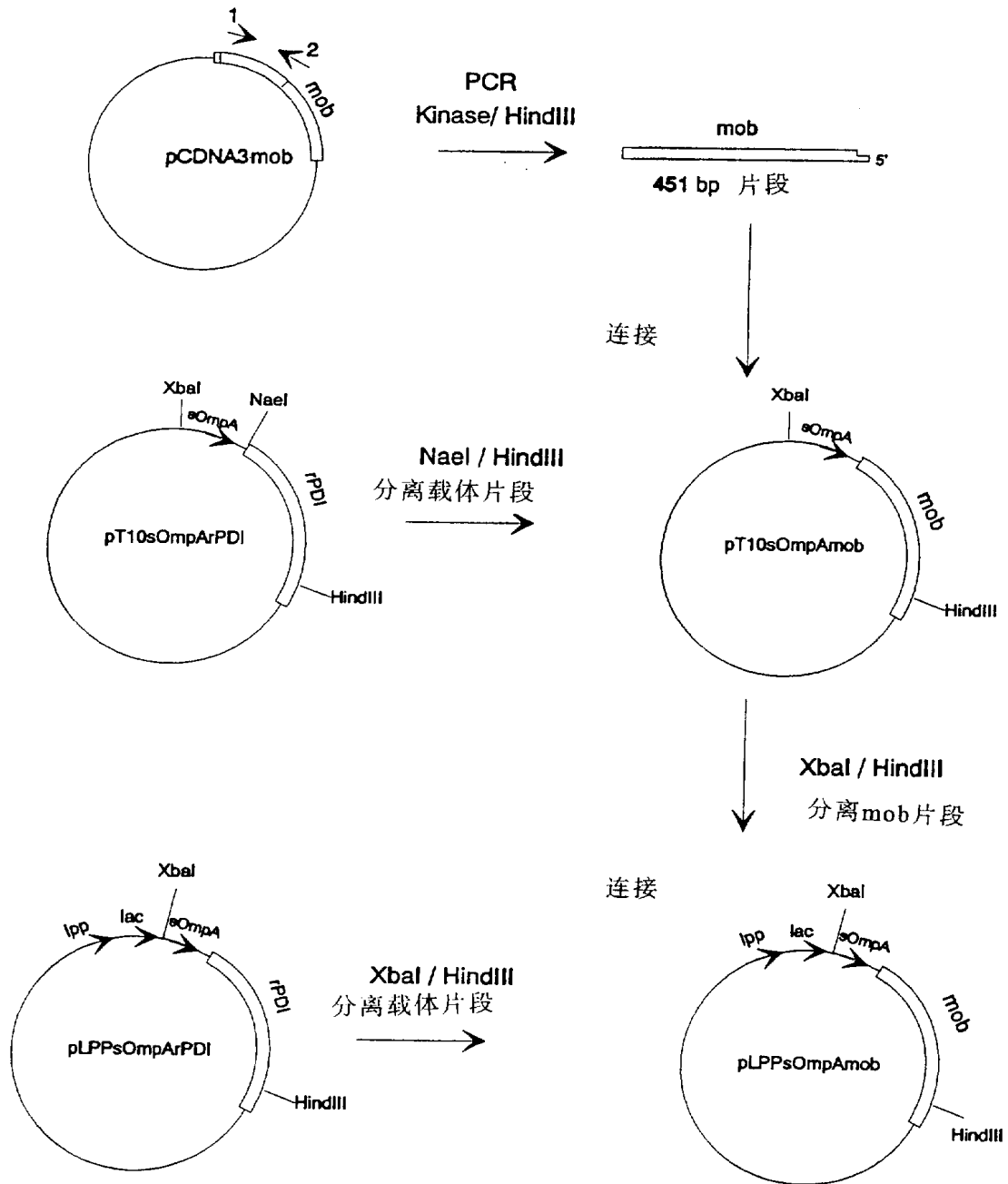


图 3

