



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 27 409 T2 2007.04.12

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 151 102 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 27 409.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US00/03652

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 911 784.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/047741

(86) PCT-Anmeldetag: 11.02.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 17.08.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 07.11.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 19.04.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 12.04.2007

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/16 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 5/48 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

249675 12.02.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Amgen Inc., Thousand Oaks, Calif., US

(72) Erfinder:

MARTIN, H., Frances, Newbury Park, CA 91320,
US; ELLIOTT, G., Steven, Newbury Park, CA 91320,
US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(54) Bezeichnung: GLYKOSYLIERTE LEPTINZUSAMMENSETZUNGEN UND ZUGEHÖRIGE VERFAHREN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf glykosylierte Leptin-Zusammensetzungen und damit in Beziehung stehende Verfahren. Umfaßt sind glykosylierte Leptin-Proteine, welche einen Stokes Radius haben, welcher verbesserte Wirkungen ermöglicht, als auch glykosylierte Leptin-Proteine, welche ausgewählte Stellen für die Glykosylierung haben, Nukleinsäuren, welche solche Proteine kodieren, in Beziehung stehende Wirtszellen, Vektoren, Verfahren für die Herstellung und Methoden der Verwendung solcher Zusammensetzungen. Neue Verfahren der Herstellung glykosylierter Proteine werden auch bereitgestellt.

Hintergrund

[0002] Obwohl die molekulare Grundlage für Obesität weitgehend unbekannt ist, hat die Identifikation des „OB-Gens“ und des kodierten Proteins („OB-Protein“, hierin auch als Leptin bezeichnet) Aufschluß über den Mechanismus gegeben, den der Körper verwendet, um Körperfettablagerungen zu regulieren. Zhang et al., *Nature* 372: 425–432 (1994), durch Bezugnahme hierin aufgenommen; siehe auch *The Correction at Nature* 374: 479 (1995), auch durch Bezugnahme hierin aufgenommen. Das OB-Protein ist *in vivo* sowohl in ob/ob mutanten Mäusen (Mäuse werden aufgrund eines Defekts in der Herstellung des OB-Genprodukts fettleibig) aktiv, als auch in normalen, Wildtyp-Mäusen. Die biologische Aktivität äußert sich unter anderem in einem Gewichtsverlust. Siehe im Allgemeinen Barinaga, „Obese“ Protein Slims Mice, *Science* 269: 475–476 (1995). Siehe die internationale PCT Veröffentlichungsnummer WO 96/05309, „Modulators of Body Weight, Corresponding Nucleic Acids and Proteins, and Diagnostic and Therapeutic Uses Thereof“, hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen. Siehe auch die internationale PCT Veröffentlichungsnummer WO 96/40912, WO 97/06816, WO 97/18833, WO 97/38014, WO 98/08512, und WO 98/28427, welche alle OB Verfahren und Zusammensetzungen detaillierter beschreiben und die alle hierin durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit aufgenommen werden.

[0003] Die anderen biologischen Effekte von dem OB-Protein sind nicht sehr gut charakterisiert. Siehe im Allgemeinen Friedman et al., *Nature* 395: 763–770 (Oktober 1998) als eine wissenschaftliche Abhandlung von Leptin und der Regulation des Körbergewichts in Säugetieren, hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Es ist zum Beispiel bekannt, daß in ob/ob mutanten Mäusen die Verabreichung von OB-Protein eine Abnahme der Mengen an Serum-Insulin zur Folge hat und der Menge an Serum-Glukose. Es ist auch bekannt, daß die Verabreichung von OB-Protein zu einer Abnahme des Körperfetts führt. Das wurde sowohl in ob/ob mutanten Mäusen, als auch in nicht-fettsüchtigen, normalen Mäusen beobachtet. Pelleymounter et al., *Science* 269: 540–543 (1995); Halaas et al., *Science* 269: 543–546 (1995). Siehe auch Campfield et al., *Science* 269: 546–549 (1995) (Die periphere und die zentrale Verabreichung von einer Mikrogramm Dosis des OB-Proteins reduzierten die Nahrungsaufnahme und das Körbergewicht von ob/ob und Diät-induzierten fettsüchtigen Mäusen, aber nicht in db/db fettsüchtigen Mäusen). In keinem dieser Berichte sind Toxizitäten beobachtet worden, sogar bei den höchsten Dosierungen.

[0004] Rekombinantes Leptin ist in Menschen dahingehend wirksam, daß es eine Gewichtsabnahme zur Folge hat. Greenberg AS, Heymsfield SB, Fujioka K, et al., Preliminary safety and efficacy of recombinant methionyl human leptin (rL) administered by SC injection in lean and obese subjects. Poster präsentiert auf dem: 58. Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association; 14. Juni 1998; Chicago, IL, hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Wie gezeigt worden ist, hat die Verabreichung von rekombinantem humanen Methionyl Leptin an fettsüchtigen Menschen eine Gewichtsabnahme ohne Giftstoffe zur Folge. Ferner ist das Gewicht, das verloren wird, hauptsächlich Fett. Heymsfield et al., Weight and body composition changes in lean and obese subjects treated with recombinant methionyl human leptin. Poster präsentiert auf dem: International Congress on Obesity; 29. August–3. September 1998; Paris, Frankreich, hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

[0005] Natives humanes Leptin ist dafür bekannt, eine relativ kurze Halbwertszeit im Menschen zu haben. Lau et al., Pharmacokinetics of recombinant methionyl human leptin and the effect of antibody formation in lean and obese subjects following subcutaneous dosing. Poster präsentiert auf dem: International Congress on Obesity; 29. August–3-September 1998, Paris, Frankreich, hierin durch Bezugnahme aufgenommen. In dem Körperlukkreislauf kann eine Akkumulation entweder durch die Gabe großer Dosierungen oder durch häufigere Dosierungen des Testproteins erreicht werden. Berichte weisen darauf hin, daß exogenes, als auch endogenes Leptin aus dem Kreislauf durch die Niere entfernt werden, zumindest teilweise. Siehe zum Beispiel Cumin et al., *Journal of Endocrinology*, 155: 577–585 (1997) und Cumin et al., *Internal Journal of Obesity* 21: 495–504

(1997), beide hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

[0006] Im Allgemeinen arbeitet die Niere, um das Blutplasma von verschiedenen Substanzen durch ihre Konzentrierung im Urin zu klären. Siehe zum Beispiel Harth, The Function of the Kidneys, In: Human Physiology, Schmidt et al., Hrsg., Springer-Verlag New York, Heidelberg, Berlin, 1983 auf S. 610–642, hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Die Menge oder das Ausmaß in welchem ein Serumprotein die Niere durchlaufen kann, ist schwer zu schätzen, aber im Allgemeinen ermöglicht die Anatomie der Niere die freie Passage von Wasser und kleinen gelösten Stoffen, aber bildet für die Passage von Plasmaproteinen eine Barriere. Die verschiedenen Substanzen zeigen eine unterschiedliche „Filtrierbarkeit“, die Nieren-Clearance-Raten, siehe Anderson et al., Renal and Systemic Manifestations of Glomerular Disease, in: The Kidney, Brenner et al., Hrsg., Harcourt Brace Joanovich, Inc., Philadelphia, PA 1991 auf S. 1831–1843, hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

[0007] Leptin kann im Körperkreislauf durch eine konstante Verabreichung angehäuft werden, wie zum Beispiel durch osmotische Pumpen oder durch chemische Derivatisierung des Proteins, so daß die Zirkulationszeit erhöht ist. Siehe auch zum Beispiel PCT WO 96/40912, veröffentlicht am 19. Dezember 1996 und hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen. Die chemische Derivatisierung eines rekombinant hergestellten Proteins erfordert im Allgemeinen jedoch ein Zwei(oder mehr)-Schritt-Verfahren: Schritt eins, die Herstellung des Proteins; Schritt zwei, Zugabe eines chemischen Teils (wie zum Beispiel ein Polyethylen Glykol oder Dextran Rest), siehe auch zum Beispiel PCT WO 96/40912, supra, auf S. 8 und folgende Seiten für die Beschreibung einer N-terminalen Derivatisierung von Leptin (darin als OB-Protein bezeichnet).

[0008] Für ein „Ein-Schritt“-Verfahren kann man in einem rekombinanten DNA-System ein Fusionsprotein kodieren (wahlweise als „chimerisches“ Protein bezeichnet), wobei eine zusätzliche Polypeptid-Hälfte zusammen mit dem gewünschten Protein kodiert wird, so daß beide exprimiert werden. Die Verlängerung des Proteins kann auch die Zirkulationszeit erhöhen. Polypeptide, wie zum Beispiel der „Fc“-Teil eines Antikörpers oder Albumin sind in dieser Hinsicht verwendet worden. Siehe zum Beispiel PCT WO 98/28427, hierin durch Bezugnahme aufgenommen, mit dem Titel „OB Fusion Protein Compositions and Methods.“ Der übliche Nachteil bei der Herstellung ist, daß größere Expressionsprodukte sich manchmal schwieriger in die geeignete Konformation falten, und die Ausbeute geringer ist, als bei jenen von kleineren Produkten. Ferner ist der Gesamt-Proteinload pro Dosis erhöht und der Anteil des therapeutischen Proteins ist mit der Verwendung von zunehmend großformatigen Fusionsproteinen vermindert.

[0009] Das Vorhandensein von Kohlenhydraten auf einem Protein kann seine Clearance-Rate beeinflussen und kann seine Wirksamkeit in vivo verbessern, während sie gleichzeitig die intrinsische Aktivität, Löslichkeit, Stabilität und Immunogenität des Proteins beeinflussen. Siehe zum Beispiel europäische Patentveröffentlichung 0 640 619, veröffentlicht am 1. März 1995, mit dem Titel „Erythropoietin analogs with additional glycosylation sites,“ hierin durch Bezugnahme aufgenommen, und PCT-Patentveröffentlichung WO 96/25498, veröffentlicht am 22. August 1996, mit dem Titel „MPL Ligand Analogs“, beide hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

[0010] Des Weiteren können Kohlenhydrate durch die Herstellung durch eine eukaryotische Zelle zugefügt werden, ohne das Erfordernis eines Zwei-Schritt-Verfahrens. Zum Beispiel schlägt die PCT/US96/06609, veröffentlicht am 14. November 1996, hierin durch Bezugnahme aufgenommen, verschiedene Säugetier-Signalsequenzen für die Sekretion eines ob-Proteins aus einer Säugetierzelle vor (zum Beispiel auf den Seiten 11–12.). Siehe auch PCT WO 97/20933, veröffentlicht am 12. Juni 1997, mit dem Titel „Mutational Variants of Mammalian OB Gene Proteins“, insbesondere auf S. 11, welche Änderungen der OB-Protein Glykosilierung vorschlägt. Glykosilierungen erfolgen an spezifischen Orten entlang der Polypeptidhauptkette. Üblicherweise gibt es zwei Arten von Glykosilierungen: O-verknüpfte Oligosaccharide sind an Serin- oder Threoninreste gebunden, während N-verknüpfte Oligosaccharide an Asparaginreste gebunden sind, wenn sie Teil einer Asn-X-Ser/Thr sind, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann. Die Strukturen von N-verknüpften und O-verknüpften Oligosacchariden und den Zuckerresten, welche in jeder Variante gefunden werden, sind unterschiedlich. Eine Art eines Zuckers, die häufig in beiden gefunden wird, ist N-Acetylneuraminsäure (nachstehend als Sialinsäure bezeichnet). Sialinsäure ist üblicherweise der terminale Rest von sowohl N-verknüpften als auch O-verknüpften Oligosacchariden in Säugetierzellen und kann aufgrund seiner negativen Ladung dem Glycoprotein Säureeigenschaften verleihen. Die vorherrschende Form von natürlich vorkommendem humanen Leptin (in humanen Zellen bereitgestellt) ist glykosiliert. Eine Variante eines natürlich vorkommenden Proteins, welche ein Glutamin an der Stelle 28 des reifen Proteins fehlt (SEQ ID NO. 2, infra), enthält zwei Stellen für die Glykosilierung. Diese Stellen sind beide für O-verknüpfte Glykosilierungen. Jedoch wird davon ausgegangen, daß diese Form in Menschen nur in Spuren hergestellt wird und nicht die vorherrschende aktive Form in vivo ist.

[0011] Es ist wünschenswert, ein Verfahren zu haben, welches ein Leptin ergibt, welches eine erhöhte systemische Zirkulationszeit hat, welches nicht solche zweite Derivatisierungsschritte, wie oben beschrieben, erfordert. Es ist weiterhin wünschenswert, die intrinsische Aktivität und die Löslichkeit von Leptin zu erhöhen, ohne eine Immunogenität hervorzurufen oder zu erhöhen oder andere nachteiligen Effekte. Die WO-A-9720933 offenbart veränderliche Varianten von Säugetier OB-Genproteinen. Die WO-A-9505465 offenbart Erythropoietin-Analoge. Die WO-A-9726916 offenbart analoge Verbindungen des Obesitätproteins und Formulierungen davon.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Die vorliegende Erfindung röhrt von der Beobachtung her, daß, im Vergleich zu unverändertem nativem rekombinantem humanen Leptin, glykosiliertes Leptinprotein in vivo funktional ist und ferner, daß einige Formen des glykosilierten Leptinproteins in vivo längere systemische Zirkulationszeiten haben, ohne Toxizitäten aufzuweisen.

[0013] Es ist überraschenderweise und bedeutenderweise gefunden worden, daß ein glykosiliertes humanes Leptin, welches eine einzelne N-verknüpfte Glykosilierungsstelle hat, sowohl in vitro als auch in vivo eine biologische Aktivität aufweist. Ferner ist seine biologische Aktivität gleich der, oder leicht wirksamer als die von rekombinantem humanen Leptinprotein. Wie oben darauf hingewiesen wird, wird davon ausgegangen, daß der Effekt von Leptin auf Obesität teilweise auf seine Wirkung im Gehirn zurückzuführen ist. Wie oben angezeigt, ist Leptin normalerweise kein glykosiliertes Molekül (in der Q + 28 Form, SEQ ID NO. 1, infra, welche als die vorherrschende Form im humanen Serum gewähnt wird). Des Weiteren können glykosilierte Proteine (Glykoproteine) aufgrund ihrer Unfähigkeit die Hirnschranke zu überwinden, im Allgemeinen nicht in das Gehirn eindringen. Die Demonstration gleicher (oder geringfügig besserer) biologischer Aktivität durch glykosiliertes Leptin zeigt entweder, daß (a) das glykosilierte Leptin in das Gehirn eindringt, oder (b) wenn es dies nicht macht, daß das glykosilierte Leptin biologisch effektiver in den peripheren Geweben (wie zum Beispiel die visceralen Gebiete von Fettgewebe) ist, als das native rekombinante humane Leptin.

[0014] Es ist weiterhin beobachtet worden, daß ein humanes Leptin, welches an drei Stellen N-glykosiliert ist, eine weitaus längere Zirkulationszeit und Wirksamkeit hat, als rekombinantes natives humanes Leptin oder Leptin, das an einer einzigen Stelle N-glykosiliert ist. Wie in den nachstehenden Ausführungsbeispielen dargelegt wurde, sind verschiedene an zwei, drei, vier und fünf Stellen glykosilierte Leptine hergestellt worden und auf ihre in vitro, und in einigen Fällen in vivo Aktivität hin getestet worden.

[0015] Die vorliegenden glykosilierten Leptine können eine erwünschte, relativ lange Plasma-Halbwertszeit haben. Die vorliegenden glykosilierten Leptine, welche einen Stokes Radius größer als oder gleich 30 Å haben, zeigen ein vermindertes Maß an Filtrierbarkeit durch die Membranen, und somit eine verminderte Rate des Abbaus in den Nieren.

[0016] Obwohl die Stokes Radii auf eine Vielzahl von Arten und Weisen bestimmt werden können, ist die hierin bevorzugte Art und Weise die Verwendung von Gelfiltrationschromatographie. Siehe im Allgemeinen Le Maire et al., Analytical Biochemistry 154: 525–535 (1986), hierin durch Bezugnahme aufgenommen, für Gelfiltrationschromatographie zur Bestimmung der Stokes Radii von verschiedenen Proteinen für die Verwendung als Standards. Somit sind die vorliegenden glykosilierten Leptine jene, welche Stoke Radii von ungefähr 30 Å haben, wenn diese durch Verwendung der Gelfiltrationschromatographie bestimmt wurden.

[0017] Es ist bevorzugt, daß die vorliegenden glykosilierten Leptine auch im Wesentlichen die Clearance in der Leber vermeiden. Die Leber ist bekannt dafür Rezeptoren zu haben, welche Galaktose binden. Galaktose ist ein Zucker und kann ein Bestandteil der Kohlenhydratreste der vorliegenden glykosilierten Leptine sein. Sialinsäure wird üblicherweise den Galaktoserest „bedecken“ und seine Reaktivität mit den Galaktoserezeptoren in der Leber verhindern. Darüber hinaus verleiht ein Sialinsäurerest eine negative Ladung. Je stärker die vorliegenden glykosilierten Leptine negativ geladen sind, desto stärker werden sie die negativ geladenen Membranen der Leber und Niere „abstoßen“. Daher sind die vorliegenden glykosilierten Leptinproteine bevorzugt jene, welche zumindest eine Vielzahl von Galaktoseresten haben, die nicht für eine Bindung an ein Galaktoserezeptor verfügbar sind, und noch bevorzugter einen Sialinsäurerest haben, der sich zumindest an einer Vielzahl von Stellen befindet, die für die Sialisierung verfügbar sind.

[0018] Wie hierin diskutiert wird, zeigten die rekombinanten humanen Leptine, die derart modifiziert sind, daß sie Stellen für N-verknüpfte Glykosilierung an einer Stelle oder an drei Stellen haben, daß glykosilierte Leptinproteine funktionell sein können und so funktionell sein können, wie natürlich humanes. Die Glykosilierung wur-

de via der Wirtszellmaschinerie in der Zellkultur durchgeführt und erforderte daher keinen zusätzlichen Verfahrensschritt (wie benötigt, um Proteine zu derivatisieren), um die gewünschten Charakteristika der längeren Serum-Halbwertszeit zu erreichen.

[0019] Somit bezieht sich die vorliegende Erfindung in einer Hinsicht auf ein glykosiliertes Leptinprotein gemäß der beigefügten Ansprüche, welches einen Stokes Radius hat, der größer ist als der von natürlich vorkommendem glykosiliertem humanem Leptin der SEQ ID NO. 2 (im Folgenden rHu-Leptin 1–145). In einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein glykosiliertes Leptinprotein, welches ein Stokes Radius hat, der größer ist als der eines glykosilierten Leptinproteins, welches einen N-verknüpften Glykosilierungsrest hat. Und in einem noch weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein glykosiliertes Leptinprotein, das einen Stokes Radius gleich oder größer als 30 Å hat, wie zum Beispiel durch Gelfiltration bestimmt.

[0020] Die vorliegende beanspruchte Erfindung bezieht sich auch auf Leptinproteine, welche zumindest eine zusätzliche Glykosilierungsstelle haben. In einer noch anderen Art und Weise bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein glykosiliertes Leptinprotein, welches fünf oder mehr als fünf Sialinsäurereste hat. Die natürlich vorkommende humane Leptinvariante (SEQ ID NO. 2, unten) umfasst 2 Stellen für die O-verknüpfte Glykosilierung und kann daher 4 Sialinsäurereste enthalten. Die vorliegenden Ausführungsbeispiele zeigen, daß noch stärker glykosiliertes Leptin Protein eine im Wesentlichen verbesserte Zirkulationszeit hat. Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein glykosiliertes Leptinprotein, das fünf, sechs oder sieben Sialinsäurereste aufweist.

[0021] In weiteren Aspekten bezieht sich die vorliegende Erfindung auf eine Nukleinsäure, die ein glykosiliertes Leptinprotein, wie hierin dargelegt, kodiert, als auch auf einen Vektor, welcher eine Nukleinsäure entält, die für ein glykosiliertes Leptinprotein gemäß der Offenbarung hierin kodiert.

[0022] Daher bezieht sich die vorliegende Erfindung in noch anderen Aspekten auf eine Wirtszelle, welche eine Nukleinsäure enthält, die für ein glykosiliertes Leptinprotein gemäß der vorliegenden Offenbarung kodiert.

[0023] Die vorliegende Offenbarung bezieht sich auch auf die Verwendung der vorliegenden Nukleinsäuren für die Gentherapie. Weiterhin bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren für die Herstellung eines glykosilierten Leptinproteins.

[0024] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf selektiv-bindende Moleküle, wie zum Beispiel Antikörper, welche selektiv die vorliegenden glykosilierten Leptinproteine binden.

[0025] In anderen Aspekten, vollständiger im Folgenden beschrieben, bezieht sich die vorliegende Erfindung auf eine pharmazeutische Zusammensetzung(en), welche ein erfindungsgemäßes glykosiliertes Leptinprotein in einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt. Die vorliegende Offenbarung bezieht sich auch auf ein Verfahren zur Behandlung eines Menschen in einem Zustand, der unter anderem ausgewählt ist aus Obesität, Diabetes und Effekten hoher Blutlipid Werten; besagte Verfahren umfassen die Verabreichung einer wirksamen Menge eines erfindungsgemäßigen glykosilierten humanen Leptins.

[0026] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf verbesserte Verfahren der Herstellung von glykosilierten Leptinproteinen, als auch der Herstellung glykosierter Proteine im Allgemeinen. Die vorliegenden Ausführungsbeispiele zeigen für die vorliegenden glykosilierten Leptinproteine, daß die Verwendung eines anderen Signalpeptids als des Signalpeptids des nativen humanen Leptins, die Glykosilierungseffizienz verbessert. In diesem Fall führt die verbesserte Glykosilierungseffizienz zu der gewünschten Eigenschaft von sowohl einer erhöhten Anzahl, als auch Stellen zusätzlicher Kohlenhydratketten. Auf diese Weise umfassen die vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren die Verwendung von anderen Signalpeptiden, als dem nativen Signalpeptid von Leptin. Außer dem nativen humanen Leptinsignal, sind besondere Signalpeptide unten dargelegt, beide als jene bekannt, die natürlich gefunden werden (d.h. natürliche Signalpeptide sind jene, welche nicht genetisch durch Menschen manipuliert worden sind, durch irgendein Mittel, einschließlich homologe Rekombination, rekombinante DNA-Techniken oder anderen Mitteln, welche bekannt dafür sind, oder von denen erwartet wird, die Bestandteile der Nukleinsäuresequenz zu verändern, obwohl die Zelle, die diese umfaßt, kultiviert worden sein kann oder anderweitig aus seiner natürlichen in vivo-Umgebung entfernt worden sein kann), als auch jene, die nicht in der Natur gefunden werden (d.h. nicht natürliche Signalpeptide sind jene, welche durch Menschen wie oben beschrieben wurde genetisch manipuliert worden sind).

[0027] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf die Beobachtung, daß die Modifikation von Signal-

peptiden, als auch anderen Peptiden, welche aus den reifen Proteinen abgetrennt werden, den Ertrag glykoserter Proteine verbessern. Modifikationen von Signalpeptiden umfassen die Veränderung der Peptidase-Schnittstelle, um die Schnittgenauigkeit zu verbessern (und auf diese Weise eine größere Ausbeute von den gewünschten glykosilierten Proteinen zu bewirken, welche die vorhergesagte N-terminale Aminosäuresequenz haben). Signalpeptidmodifikationen können auch, oder hilfsweise, in hohem Maße die Glykosilierungseffizienz verbessern, auch in der Abwesenheit einer „korrekten“ Spaltung des reifen Proteins aus der Vorläufersequenz. („Korrekt“ zeigt an, daß die erste Aminosäure des N-Terminus eine des vorhergesagten reifen Proteins ist, welches keine Aminosäuren hat, die in dem Signalpeptid oder anderen Pre-Sequenzen gefunden werden). Andere Modifikationen umfassen die Hinzufügung von „Prosequenzen“, welche auch abgespalten werden, aber auch eine verbesserte Glykosilierungseffizienz erzeugen. Natürliche als auch nicht natürlich vorkommende Signalpeptide können als solche modifiziert werden. Spezielle Beispiele werden hierin gegeben.

[0028] Daher bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf ein verbessertes Verfahren zur Herstellung eines glykosilierten Proteins, umfassend:

- (a) Kultivierung einer Zelle, welche eine DNA-Sequenz umfaßt, die in der 5' nach 3'-Richtung (i) ein Signalpeptid kodiert und (ii) eine DNA, die ein glykosiliertes Protein kodiert, unter geeigneten Bedingungen für die Expression und Glykosilierung; und
- (b) Erhalten des besagten glykosilierten Proteins, wobei die besagte Verbesserung die Verwendung eines Signalpeptids umfaßt, welches eine Peptidasespaltungsstelle hat, die für die Maximierung der Ausbeute des besagten glykosilierten Proteins optimiert ist und, wahlweise, die Hinzufügung einer Prosequenz.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0029] [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, welches den Gewichtsverlust relativ zur Pufferkontrolle von Tieren zeigt, die mit verschiedenen Dosierungen eines an einer Stelle glykosilierten Leptins („glykosiliertes CHO Leptin“) und nicht-glykosiertem rmetHu-Leptin 1–146 („Leptin“) dosiert worden sind.

[0030] [Fig. 2](#) ist ein Western Blot, wie weiter in den nachstehenden Beispielen 5 und 6 beschrieben wird, welcher zeigt, daß Veränderungen der Aminosäuresequenz der Glykolsierungsstelle die Art und Weise oder die Menge der Glykosilierung verändern kann.

[0031] [Fig. 3](#) ist ein Diagramm der Serumleptinkonzentrationen nach einer subkutanen Verabreichung von 1,0 mg/kg rmetHu-Leptin oder eines an drei Stellen glykosilierten Leptinproteins an eine männliche CD-1-Maus, wie weiter in Beispiel 7 beschrieben wird.

[0032] [Fig. 4](#) ist ein Diagramm der Serumleptinkonzentration nach einer intravenösen Verabreichung von 1,0 mg/kg rmetHu-Leptin oder eines Drei-Stellen-glykosilierten Leptinproteins an eine männliche CD-1-Maus, wie weiter in Beispiel 7 beschrieben wird.

[0033] [Fig. 5](#) ist ein Diagramm des Gewichtsverlustes nach Verabreichung eines an drei Stellen glykosilierten Leptinproteins („GE-Leptin“), wie weiter in Beispiel 8 beschrieben wird.

[0034] [Fig. 6](#) ist ein Diagramm der Nahrungsaufnahme nach Verabreichung eines an drei Stellen glykosierten Leptinproteins („GE-Leptin“), wie weiter in Beispiel 9 beschrieben wird.

[0035] [Fig. 7](#) ist ein Western Blot, der die Effekte von verschiedenen Signalpeptiden auf die Expression und Glykosilierung eines an drei Stellen glykosilierten Leptinproteins darstellt, wie weiter in Beispiel 14 beschrieben wird.

[0036] [Fig. 8](#) ist ein Western Blot, der die Effekte von verschiedenen Signalpeptiden und anderen Peptiden auf die Glykosilierung eines an drei Stellen glykosilierten Leptins darstellt, wie weiter in Beispiel 14 beschrieben wird.

[0037] [Fig. 9](#) ist ein Western Blot, der die Effekte der Peptidasespaltungsstelle auf die Glykosilierung eines an drei Stellen glykosilierten Leptinproteins darstellt, wie weiter in Beispiel 14 beschrieben wird.

[0038] [Fig. 10](#) ist ein Western Blot, der die Effekte von verschiedenen Signalpeptiden und anderen Peptiden auf die Glykosilierung eines an drei Stellen glykosilierten Leptins darstellt, wie weiter in Beispiel 14 beschrieben wird.

[0039] Fig. 11 ist ein Western Blot, wie in Beispiel 15 unten beschrieben wird, und zeigt, daß die Zunahme der Anzahl an Glykosilierungsstellen, zumindest bis zu fünf Stellen, die Menge an Glykosilierung erhöht, die auf dem Leptinprotein gefunden werden kann, wenn es in CHO-Zellen exprimiert wird.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0040] Wie oben angezeigt, bezieht sich die vorliegende Erfindung in einem Aspekt auf glykosilierte Leptinproteine, welche einen Stokes Radius haben, der größer ist als der von natürlich vorkommendem glykosiliertem humanen Leptin. Bevorzugt ist, für die Erhöhung der Halbwertszeit einer therapeutischen Zusammensetzung in dem Körperkreislauf, der Stokes Radius von ausreichender Größe, um die Filtrierbarkeit in den Nieren zu reduzieren. Der Effekt eines Stokes Radius von dieser Größe ist, das glykosilierte Leptinprotein in dem Körperkreislauf eine für längere Zeitdauer zu halten, als sie für ein glykosiliertes oder anderes Leptinprotein sein würde, welches nicht diese effektive Größe hat. Nach der empirischen Bestimmung des Stokes Radius des vorliegenden glykosilierten Leptinproteins muß die Größe größer oder gleich ungefähr 30 Å sein, wie durch die hierin, im Detail weiter unten beschriebenen Verfahren bestimmt wurde. Der Begriff „ungefähr“ bedeutet, wenn er mit Bezug auf ein einzelnes glykosiliertes Leptinproteinmolekül verwendet wird, den durchschnittlichen Stokes Radius über eine Zeitdauer für das einzelne glykosilierte Leptinproteinmolekül.

[0041] Wie hierin zur Verfügung gestellt wird, haben die glykosilierten Leptinproteine, welche einen größeren Stokes Radius haben als natürlich vorkommende Leptinproteine, verbesserte Eigenschaften. Der bevorzugte Stokes Radius für eine Population von glykosilierten Leptinproteinmolekülen, wie zum Beispiel in einer therapeutisch wirksamen Dosis vorhanden ist, ist derjenige, welcher größer als, oder gleich ungefähr 30 Å ist. Der Begriff „ungefähr“ zeigt hier an, daß von jeder Population von glykosilierten Leptinproteinmolekülen einige einen größeren Stokes Radius haben können, einige einen kleineren Stokes Radius haben können, aber der durchschnittliche Stokes Radius einer gegebenen Population von glykosiliertem Leptinprotein größer als oder gleich 30 Å ist.

[0042] Je höher der Stokes Radius oberhalb von 30 Å ist, desto größer ist die effektive Größe von dem/den glykosilierten Leptinproteinmolekül(en). Je größer die effektive Größe ist, d.h., je größer der hydrodynamische Umfang ist, der durch die Hinzufügung von Oligosacchariden erreicht wird, desto langsamer ist die effektive Bewegung durch die Basalmembranen überall im Körper. Damit das Leptin die Nierentubuli erreicht, wo es degradiert wird, muß es zunächst die Basalmembranen des Glomerulus passieren. Auf diese Weise verlangsamt die Erhöhung des hydrodynamischen Umfangs die Filtrierung durch die glomeruläre Membran und verlangsamt folglich den Abbau, und somit die endgültige Clearance, des Polypeptids in den proximalen Tubuli. Zum Beispiel hat das vorliegende Drei-Glykosilierungsstellen-Leptin, rHu-Leptin 1–146 mit Glykosilierungsstellen an den Positionen 47, 69 und 102 (d.h. das einen substituierten Asparaginrest an den Stellen 47, 69 und 102 hat und einen substituierten Threoninrest an den Positionen 29, 71 und 104) einen durchschnittlichen Stokes Radius von 32,1 Å (basiert auf zwei Gelfiltrationsmessungen von 31,9 Å und 32,3 Å). Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele zeigen, daß dieses glykosilierte Leptin im Vergleich zu rmetHu-Leptin eine vier- bis fünf-fache Abnahme in der systemischen Clearance aufweist und eine Erhöhung der Halbwertszeit.

[0043] Wie auch oben angedeutet wurde, gibt es einige Arten und Weisen, um den Stokes Radius von einem Molekül zu bestimmen. Der vorliegende Stokes Radius, für die Zwecke der vorliegenden glykosilierten Leptinproteine, wird durch Verwendung der Gelfiltration bestimmt, siehe Le Maire et al., supra, siehe auch, Kyte, Structure in Protein Chemistry, Garland Publishing, Inc., New York und London, 1995 auf den Seiten 293–316, hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Zurzeit besteht die zur Bestimmung des Stokes Radius verwendete Gelfiltration aus Polymer (Agarose) Beads, welche an Dextran kovalent gebunden sind. Kommerzielle Herstellungen umfassen Superdex™ 200 HR 10/30 (Pharmacia) und Sephacryl®S-200 high resolution (Pharmacia). Diese zwei Herstellungen werden alternativ verwendet, um den Stokes Radius der vorliegenden glykosilierten Leptinproteine zu bestimmen.

[0044] Eine Säule kann von jeder Größe sein, aber eine Größe von annähernd 1 × 30 cm ist für die einfache Handhabung bevorzugt. Die Bedienungsanleitungen für die Herstellung der Säule für jede der obigen Gelfiltrationssubstanzen sind hierin durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit aufgenommen (Dokument Nr. 71-7059-00 Edition AB für Superdex™ und 52-2086-00-03 für Sephacryl®).

[0045] Der zu verwendende Puffer sollte ziemlich nah am physiologischen Puffer sein, der nicht die Konformation des Moleküls in Lösung signifikant verändert und mit der Größentrennung der Proteinmoleküle interferiert. Phosphat-gepufferte Saline wird bevorzugt und ist verwendet worden, um den Stokes Radius der vorliegenden glykosilierten Leptinproteine zu bestimmen.

[0046] Das Verfahren für die Durchführung der Gelfiltration sollte im Allgemeinen den Bedienungsanleitungen entsprechen, wie oben aufgenommen. Das ausgewählte glykosilierte Leptinprotein, für welches der Stokes Radius zu bestimmen ist, sollte auf die Säule geladen werden. Im Folgenden wurde zum Beispiel eine Konzentration von 0,4 A280/ml, was in etwa 0,45 mg/ml entspricht, für ein an drei Stellen glykosiliertes Leptin verwendet (47, 49, 102). Der hierfür verwendete Puffer war PBS, aber andere Puffer können verwendet werden. Der Puffer für die Beladung sollte mit den guten Gelfiltrationsmethoden kompatibel sein und kann theoretisch einen hohen Anteil an Salzen enthalten und anderen Materialien, welche im Einklang sind mit dem was ein Fachmann als angemessen erachtet. Der Beladungs- oder Lagerpuffer sollte nicht mit der Bestimmung des Stokes Radius interferieren (weder durch Präzipitation, weil er auf die Säule trifft, noch durch Denaturierung und dem Erfordernis der Neufaltung, weil er eluiert). Eine Säule mit Gelfiltrationssubstanzen, welche noch nicht zuvor verwendet worden ist, ist bevorzugt. Der Waschpuffer, wie zum Beispiel Phosphat-gepufferte Saline, sollte in einer Menge von 0,25 ml/min oder einer linearen Durchflußrate von 0,3 cm/min aufgebracht werden. Dieser Wert wird durch die Eigenschaften von dem Gel bestimmt werden und im Grunde genommen durch die Bedienungsanleitungen. Die eluierten Fraktionen enthalten die glykosilierten Leptinproteinmoleküle, welche nicht in der Gelfiltrationssubstanz eingeschlossen sind.

[0047] Um den Stokes Radius zu bestimmen ist es notwendig, das zu testende glykosilierte Leptinprotein mit bekannten Proteinen zu vergleichen, welche verwendet worden sind, um die Gelfiltrationssäule zu kalibrieren. Die Verfahren sind wie in dem Gelfiltrationskalibrationskit-Bedienungshandbuch (Pharmacia Biotech Paper 11-B-033-07, Rev. 2), hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Im Allgemeinen werden ausgewählte Proteine mit bekanntem Stokes Radius durch die Säule filtriert und die Fraktion, in welcher jedes eluiert wird, wird notiert. Die Fraktion, welche das zu testende glykosilierte Leptinprotein enthält, wird mit der Fraktion der kalibrierten Proteine verglichen.

[0048] Somit sind die glykosilierten Leptinproteine jene, welche ein Stokes Radius (des glykosilierten Leptinproteins alleine, keine chemische Derivatisierung beinhaltend, welche, wie unten angezeigt, weiter durchgeführt werden kann) größer oder gleich als 30 Å haben, wie durch Gelfiltration bestimmt worden ist. Die Gelfiltration kann ausgeführt werden, indem Dextran-beschichtete Agarose-Gelfiltrationssubstanzen verwendet werden, wie zum Beispiel Superdex™ oder Sepharcryl®, wie oben beschrieben wurde. Der Puffer kann Phosphat-gepufferte Saline sein.

Leptin-Aminosäuresequenzen

1. Glykosilierungsstellen.

[0049] Um die vorliegende glykosilierte Leptinzusammensetzung herzustellen, beginnt man im allgemeinen mit einer ausgewählten Aminosäuresequenz und modifiziert diese Sequenz durch die Hinzufügung von Stellen für N-verknüpfte oder O-verknüpfte Glykosilierungen. Die folgende Formel ist für die Hinzufügung von Stellen für die N-verknüpfte Glykosilierung bevorzugt (siehe im allgemeinen Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company, N. Y., (1984) S. 498, plus Index auf den Seiten 76–78, hierin durch Bezugnahme aufgenommen):

N-X-T/S

wobei „N“ Asparagin ist, „X“ jede Aminosäure außer Prolin und „T/S“ Threonin oder Serin ist. Bevorzugt ist die Formel „N-X-T“, wobei die Änderung in Bezug auf eine Start-Leptin-Aminosäuresequenz die ist, daß „X“ das gleiche bleibt, wie das in der Start-Leptinsequenz (bevorzugt SEQ ID NO. 1 oder 2, infra) und die Aminosäure unmittelbar downstream (in Richtung des C-Terminus) Threonin ist. N-verknüpfte Stellen an der äußeren Oberfläche von dem Protein sind bevorzugt. Oberflächenreste, welche für die Glykosilierung geeignet sind, können durch die Untersuchung einer dreidimensionalen Struktur oder Modells identifiziert werden, oder durch Kernspinresonanz oder der Kristallstruktur (wie unten diskutiert). Auch ist bestimmt worden, daß ein Prolin an der Position –1 in Bezug auf den Asparaginrest (d.h. in Richtung des N-Terminus) in einigen Glykosilierungsstellen schädlich sein kann und man danach streben muß, einen Prolinrest an solch einer Stelle zu vermeiden. Die Ausführungsbeispiele 5 und 6 zeigen den Effekt der Belegung der Glykosilierungsstelle von N-X-S versus N-X-T und benachbarten Aminosäuren.

[0050] O-verknüpfte Glykosilierungsstellen werden auf der äußeren Oberfläche von Proteinen im Allgemeinen nahe oder angrenzend an Prolinresten gefunden werden. O-verknüpfte Stellen können nahe oder angrenzend an Prolinresten gefunden werden oder durch die Einfügung von Serin- oder Threoninresten eingefügt werden. Im Allgemeinen sind Threoninreste bevorzugt. Zum Beispiel hat SEQ ID NO. 1 (unten) ein Prolin an der Position 99 und ein Threonin ist an der Position 100 ist eingefügt worden. Dieses Leptin ist in CHO-Zellen

und COS-Zellen exprimiert worden und war O-verknüpft glykosiliert.

[0051] Darüber hinaus kann man wählen, N-verknüpfte und O-Glykosilierungsstellen in den vorliegenden glykosierten Leptinproteinen zu kombinieren. Wie oben beschrieben wurde, kann man eine oder mehrere O-verknüpfte Glykosilierungsstellen hinzufügen und des weiteren eine oder mehrere N-verknüpfte Glykosilierungsstellen hinzufügen.

2. Stellen für die Glykosilierung.

[0052] Im allgemein wird man das Proteinrückgrat unter Verwendung der obigen Formeln modifizieren, um eine N-verknüpfte oder O-verknüpfte Glykosilierungsstelle hinzuzufügen.

[0053] Um eine Stelle entlang des Rückgrats für die N-Glykosilierung auszuwählen, ist die allgemeine Regel, daß der Asparaginrest auf einer äußeren Oberfläche des Proteins lokalisiert sein muß, um für die Hinzufügung des Kohlenhydratrestes verfügbar zu sein. Zum Beispiel sollte, in Bezug auf die dreidimensionale Struktur des Leptins, der Asparaginrest auf einem Loop sein, einem β -Turn oder auf einer äußeren Oberfläche einer Alpha-Helix. Diese Analyse basiert auf der derzeitigen Struktur des Leptins und der Strukturfunktionsbeziehung einiger Cytokine.

[0054] Bei der Auswahl der Stelle für die Glykosilierung kann man die dreidimensionale Konformation des Leptins in Betracht ziehen. Die ersten paar Aminosäuren des Leptins sind ungeordnet, was auf eine bestimmte Höhe an Flexibilität hinweist. Topologisch ist die Leptinstruktur (siehe Zhang et al., Nature 387: 206–209 (1997) (die über die Kristallstruktur des obese protein leptin E-100 berichten, hierin durch Bezugnahme aufgenommen)) ähnlich der Struktur des Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor (cytokins granulocyte colony stimulating factor; „G-CSF“) (siehe z.B. das US Patent Nr. 5,581,476, Osslund, offenbart die 3-D-Struktur des kristallinen rmetHuG-CSF).

[0055] In Anbetracht der scheinbaren Flexibilität und dem scheinbaren Mangel an biologischer Bedeutung der Helix A, kann man es vorziehen die SEQ ID NO: 1 so zu modifizieren, das Glykosilierungsstellen an den Resten Val1 oder Pro2 enthalten sind.

[0056] Asp23 (der SEQ ID NO: 1) ist auf dem letzten Turn der Helix A und wird als eine gute Wahl in Betracht gezogen, da sich die Seitenkette zumindest teilweise auf der äußeren Oberfläche von dem Protein befindet.

[0057] Der Prolinrest an Position 47 und der Isoleucinrest an der Position 48 (der SEQ ID NO: 1) befinden sich an dem Ende des AB-Loop, nur ein paar Reste von der beginnenden Helix B. Sie sind auf der Oberfläche des Proteins und können für die Einführung der Glykosilierungsstelle geeignet sein.

[0058] Der Prolinrest an der Position 69 ist auf der Oberfläche des Proteins, was eine gute Position für die Glykosilierung ist.

[0059] Der Phenylalaninrest an der Position 92 befindet sich an dem Ende der C-Helix und seine Seitenkette ist der gegenüberliegenden Seite zugewandt, welche die Oberfläche der Rezeptorbindung sein kann. Dies gibt wahrscheinlich das beste Ergebnis dahingehend, daß es dort die geringste Interferenz eines jeden Glykosilierungsrestes mit der Rezeptorbindung gibt.

[0060] Das Serin an Position 102 ist auf der Proteinoberfläche in der Mitte des CD-Loops und sollte zusammen mit den Positionen 101 (Alanin) und 103 (Glycin) in einem relativ flexiblen Teil der Struktur sein.

[0061] Somit bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein glykosiliertes Leptinprotein, welches die SEQ ID NO: 1 (rHu-Leptin 1–146, unten) oder SEQ ID NO: 2 (rHU-Leptin 1–145, unten) umfaßt, welche eine oder mehrere Sequenzänderungen als Stellen der Glykosilierung haben. Besagte Sequenzänderungen können ausgewählt sein unter:

01V → N 02P → A 03I → T oder S (d.h. Änderung der ersten Aminosäure der nachstehenden SEQ ID NO: 1, welche ein Valin ist, nach Asparagin, Änderung der zweiten Aminosäure von Prolin zu irgendeiner der anderen 19 Aminosäuren (wie zum Beispiel Alanin), und Änderung der dritten Aminosäure von Isoleucin zu Threonin oder Serin);

02P → N 03I 04Q → T oder S (d.h. Änderung der zweiten Aminosäure der nachstehenden SEQ ID NO: 1, welche ein Prolin ist, zu Asparagin, Aufrechterhaltung der dritten Aminosäure als Isoleucin, und Änderung der vierten Aminosäure von Glutamin zu Threonin oder Serin);

23D → N 24I 25S → T oder Aufrechterhaltung als S (d.h. Änderung der 23. Aminosäure der nachstehenden SEQ ID NO: 1, welche eine Asparaginsäure ist, zu Asparagin, Aufrechterhaltung der 24. Aminosäure als Isoleucin, und für die 25. Aminosäure entweder Aufrechterhaltung als Serin oder Änderung zu Threonin);
 47P → N 48I 49L → T oder S (d.h. Änderung der 47. Aminosäure von Prolin zu Asparagin, Aufrechterhaltung der 48. Aminosäure als Isoleucin und Änderung der 49. Aminosäure von Leucin zu Threonin oder Serin);
 48I → N 49L 50T oder T → S (d.h. Änderung der 48. Aminosäure von Isoleucin zu Asparagin, Aufrechterhaltung der 49. Aminosäure als Leucin und Aufrechterhaltung der 50. Aminosäure als Threonin, oder Änderung zu Serin);

69P → N 70S 71R → T oder S (d.h. Änderung der 69. Aminosäure der nachstehenden SEQ ID NO: 1, von Prolin zu Asparagin, Aufrechterhaltung der 70. Aminosäure als Serin und Änderung der 71. Aminosäure von Arginin zu Threonin);

92F → N 93S 94K → T oder S (d.h. Änderung der 92. Aminosäure der nachstehenden SEQ ID NO: 1, von Phenylalanin zu Asparagin, Aufrechterhaltung der 93. Aminosäure als ein Serin und Änderung der 94. Aminosäure von Lysin zu Threonin oder Serin);

101A → N 102S 103G → T oder S (d.h. Änderung der 101. Aminosäure der nachstehenden SEQ ID NO: 1, von Alanin zu Asparagin, Aufrechterhaltung der 102. Aminosäure als Serin und Änderung der 103. Aminosäure zu Glycin zu Threonin oder Serin).

102S → N 103G 104L → T oder S (d.h. Änderung der 102. Aminosäure der nachstehenden SEQ ID NO: 1, von Tryptophan zu Asparagin, Aufrechterhaltung der 103. Aminosäure als Glycin und Änderung der 104. Aminosäure von Leucin zu Threonin oder Serin).

103G → N 104L 105E → T oder S (d.h. Änderung der 103. Aminosäure der nachstehenden SEQ ID NO: 1, von Glycin zu Asparagin, Aufrechterhaltung der 104. Aminosäure als Leucin und Änderung der 105. Aminosäure von Glutaminsäure zu Threonin oder Serin).

[0062] Auf diese Weise zeigen die obigen Steno-Schreibweisen den Aminosäureort im Hinblick auf SEQ ID NO: 1 und die Änderung von einer Aminosäure → zu einer anderen Aminosäure an. Wie unten angezeigt, ist die Änderung der dritten Aminosäure (die Aminosäure in Richtung des C-Terminus des Proteins) zu Threonin für die Erleichterung in der kommerziellen Herstellung, insbesondere der Glykosilierungseffizienz, bevorzugt, obwohl, wie oben angezeigt, auch ein Serin an dieser Stelle verwendet werden kann. Konventionelle Ein-Buchstaben-Symbole werden für die Aminosäuren verwendet, wie zum in Stryer, Biochemistry, Dritte Auflage (1988), W. H. Freeman and Company, New York, innen liegende Rückseite, hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

[0063] Im Hinblick auf das Obige, bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf ein glykosiliertes Leptinprotein, welches die SEQ ID NO: 1 (rHu-Leptin 1–146, unten) umfaßt, welche eine oder mehrere Sequenzänderungen als eine Stelle der Glykosilierung aufweist, ausgewählt unter (wobei „T/S“ Threonin oder Serin bedeutet):

- (a) 01V → N 02P → X (wobei X jede Aminosäure außer Prolin ist) 03I → T/S
- (b) 02P → N 03I 04Q → T/S
- (c) 23D → N 24I 25S → T/S
- (d) 47P → N 48I 49L → T/S
- (e) 48I → N 49L 50T/S
- (f) 69P → N 70S 71R → T/S
- (g) 92F → N 93S 94K → T/S
- (h) 101A → N 102S 103G → T/S
- (i) 102S → N 103G 104L → T/S
- (j) 103G → N 104L 105E → T/S

[0064] Die nachstehenden Ausführungsbeispiele zeigen die biologische Aktivität von Einzel- oder Doppelglykosilierungsstellen-Leptinproteinen, welche mindestens annähernd gleich der von nicht-glykosiliertem rHu-Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1) ist. Darüber hinaus haben besonders Leptinproteine mit drei, vier und fünf Glykosilierungsstellen eine erhöhte biologische Aktivität gezeigt. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch bestimmte glykosilierte Leptinproteine, wie in den Ausführungsbeispielen dargestellt:

- Ein glykosiliertes Leptinprotein, welches die Aminosäuren 1–146 der SEQ ID NO: 1 umfaßt, welches eine Glykosilierungsstelle hat, die an einer Position lokalisiert ist, ausgewählt aus (im Hinblick auf die Numerierung der SEQ ID NO: 1): 1, 2, 4, 8, 23, 44, 47, 48, 69, 70, 93, 97, 100, 101, 102, 103, 118 und 141.
- Ein glykosiliertes Leptinprotein, welches die Aminosäuren 1–146 der SEQ ID NO: 1 umfaßt, welches zwei Glykosilierungsstellen hat, besagte zwei Stellen ausgewählt sind unter (im Hinblick auf die Numerierung der SEQ ID NO: 1):

47 + 69;

48 + 69;
 69 + 101;
 69 + 102;
 69 + 103;
 69 + 118; und
 100 + 102.

– Ein glykosiliertes Leptinprotein, welches die Aminosäuren 1–146 der SEQ ID NO: 1 umfaßt, welches drei Glykosilierungstellen hat, besagte drei Stellen ausgewählt sind aus (im Hinblick auf die Numerierung von SEQ ID NO: 1):

2 + 47 + 69;
 23 + 47 + 69;
 47 + 69 + 100;
 47 + 69 + 102;
 48 + 69 + 118;
 69 + 102 + 118; und
 69 + 103 + 118.

– Ein glykosiliertes Leptinprotein, welches die Aminosäuren 1–146 von SEQ ID NO: 1 umfaßt, welches vier Glykosilierungsstellen hat, besagte vier Stellen ausgewählt sind aus (im Hinblick auf die Numerierung von SEQ ID NO: 1):

2 + 47 + 69 + 92;
 2 + 47 + 69 + 102;
 23 + 47 + 69 + 92;
 23 + 47 + 69 + 102; und
 47 + 69 + 100 + 102.

– Ein glykosiliertes Leptinprotein, welches die Aminosäuren 1–146 von SEQ ID NO: 1 umfaßt, welches fünf Glykosilierungsstellen hat, besagte fünf Stellen ausgewählt sind aus (im Hinblick auf die Numerierung von SEQ ID NO: 1):

2 + 23 + 47 + 69 + 92
 2 + 47 + 69 + 92 + 102
 23 + 47 + 69 + 92 + 102.

[0065] Insbesondere umfaßt die vorliegende Erfindung die folgenden glykosilierten Leptinprotein-Aminosäuresequenzen, DNAs, welche solche Sequenzen kodieren, und spezifische DNAs, wie unten dargestellt:
 Glykosiliertes Leptin 2, 47, 69 (SEQ ID NO: 25, DNA):

```

1  GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCCTCA TCAAGACAAT
51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAAG
201 TATGAATTCC ACAAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCTTCTCTA AGAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAGTGGCC TGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTAAGCC CTGGGTGC

```

Glykosiliertes Leptin 2, 47, 69 (SEQ ID NO: 26, Protein)

```

1  VNITKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTLGLD FIPGLHNIT
51  LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL AFSKSCHLPW
101 ASGLETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

```

Glykosiliertes Leptin 2, 47, 69, 92 (SEQ ID NO: 27, DNA)

1 GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCCTCA TCAAGACAAT
 51 TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
 101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
 151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
 201 TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
 251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCAACTCTA CCAGCTGCCA CTTGCCCTGG
 301 GCCAGTGGCC TGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
 351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
 401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

Glykosiliertes Leptin 2, 47, 69, 92 (SEQ ID NO: 28, Protein)

1 VNITKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTLGD FIPGLHNITT
 51 LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL ANSTSCHLPW
 101 ASGLETLDL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

Glykosiliertes Leptin 2, 47, 69, 102 (SEQ ID NO: 29, DNA)

1 GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCCTCA TCAAGACAAT
 51 TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
 101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
 151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
 201 TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
 251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCTTCTCTA AGAGCTGCCA CTTGCCCTGG
 301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
 351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
 401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

Glykosiliertes Leptin 2, 47, 69, 102 (SEQ ID NO: 30, Protein)

1 VNITKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTLGD FIPGLHNITT
 51 LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL AFSKSCHLPW
 101 ANGTELDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

Glykosiliertes Leptin 47, 69, 102 (SEQ ID NO: 31, DNA)

1 GTGCCCATCC AAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCCTCA TCAAGACAAT
 51 TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
 101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
 151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
 201 TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
 251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCTTCTCTA AGAGCTGCCA CTTGCCCTGG
 301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
 351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
 401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

Glykosiliertes Leptin 47, 69, 102 (SEQ ID NO: 32, Protein)

```

1  VPIQKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT
51  LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL AFSKSCHLPW
101 ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

```

Glykosiliertes Leptin 2, 47, 69, 92, 102 (SEQ ID NO: 33, DNA)

```

1  GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAAC CCTCA TCAAGACAAT
51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAAG
201 TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCAACTCTA CCAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

```

Glykosiliertes Leptin 2, 47, 69, 92, 102 (SEQ ID NO: 34, Protein)

```

1  VNITKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT
51  LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL ANSTSCHLPW
101 ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

```

Glykosiliertes Leptin 47, 69, 92, 102 (SEQ ID NO: 35, DNA)

```

1  GTGCCCATCC AAAAAGTCCA AGATGACACC AAAAC CCTCA TCAAGACAAT
51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAAG
201 TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCAACTCTA CCAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

```

Glykosiliertes Leptin 47, 69, 92, 102 (SEQ ID NO: 36, Protein)

```

1  VPIQKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT
51  LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL ANSTSCHLPW
101 ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

```

[0066] Dieses waren die spezifischen Aminosäuresequenzen und die korrespondierenden DNAs, die in den nachstehenden Ausführungsbeispielen verwendet werden.

Charakterisierung durch Sialinsäurereste

[0067] Des Weiteren können die vorliegenden glykosilierten Proteine durch ihre Anzahl an Sialinsäurereste

charakterisiert werden. Im Allgemeinen können null bis vier Sialinsäurereste an einer N-verknüpften Glykosilierungsstelle und null bis zwei Sialinsäurereste an einer O-verknüpften Glykosilierungsstelle sein. An eine typische Zubereitung von glykosiertem Protein wird ein Gemisch von vollständig (d.h. einen Sialinsäurerest haben, welcher alle verfügbaren Stellen belegt) und teilweise (d.h. einen Sialinsäurerest haben, welcher weniger als alle verfügbaren Stellen belegt) sialisierten glykosierten Proteinmolekülen enthalten.

[0068] Die Anzahl an Sialinsäureresten kann durch Methoden bestimmt werden, welche jenen auf dem Fachgebiet bekannt sind. Zum Beispiel kann man das molekulare Gewicht des Proteins, oder der Herstellung davon, vor und nach Behandlung mit Enzymen bestimmen, welche Sialinsäure entfernen und das molekulare Gewicht der Bestandteile ermitteln. Wahlweise kann man eine isoelektrische Fokussierung oder andere Methoden verwenden, um den Sialinsäuregehalt zu bestimmen.

[0069] Zum Beispiel enthält humanes Leptin 1–145 (SEQ ID NO: 2, unten) zwei O-verknüpfte Glykosilierungsstellen und somit, wenn es vollständig sialisiert ist, vier Sialinsäurereste. Die vorliegenden Ausführungsbeispiele mit einer einzigen N-verknüpften Glykosilierungsstelle enthalten vier Sialinsäurereste, wenn vollständig sialisiert ist. Die nachstehenden, an zwei Stellen glykosilierten Leptinproteine enthalten, wenn sie vollständig glykosiert sind, acht Sialinsäurereste, die an drei Stellen 12 Sialinsäurereste, die an vier Stellen 16 Sialinsäurereste und die an fünf Stellen glykosilierten Leptine 20 Sialinsäurereste. Die vorliegende Erfindung umfaßt somit Zubereitungen von glykosiertem Leptinprotein, worin jedes glykosilierte Leptinproteinmolekül in besagter Zubereitung fünf oder mehr Sialinsäurereste hat. Noch bevorzugter, für die Zwecke der Erhöhung des Effektes einer verzögerten Freisetzung eines therapeutischen Proteins, umfaßt die vorliegende Erfindung auch eine Zubereitung von glykosiertem Leptinprotein, worin jedes glykosilierte Leptinproteinmolekül in besagter Herstellung 8 bis 20 Sialinsäurereste hat. Man kann es auch vorziehen, zusätzliche Glykosilierungsstellen hinzuzufügen und den Sialinsäuregehalt entsprechend oberhalb von 20 zu erhöhen.

3. Leptinproteinrückgrat.

[0070] Die Art des Leptins, welches für die pharmazeutischen Zusammensetzungen des glykosilierten Leptins verwendet wird, kann ausgewählt werden aus jenen, welche in der internationalen PCT Veröffentlichungsnummer WO 96/05309, wie oben zitiert, beschrieben sind und hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen wurde. [Fig. 3](#) der Publikation (wie dort als SEQ ID NO: 4 zitiert) stellt die vollständige abgeleitete Aminosäuresequenz dar, welche für das humane Leptin abgeleitet wurde (auch als das humane „OB“-Protein bezeichnet). Die Aminosäuren sind von 1 bis 167 numeriert. Eine Signalsequenzspaltungsstelle ist nach der Aminosäure 21 (Ala) lokalisiert, so daß das reife Protein sich von der Aminosäure 22 (Val) bis Aminosäure 167 (Cys) erstreckt. Für die vorliegende Offenbarung wird eine andere Numerierung verwendet, wobei die Aminosäure an Position 1 der Valinrest ist, welcher sich zu Begin des reifen Proteins befindet.

[0071] Die Aminosäuresequenz des reifen, rekombinanten humanen Leptins wird hierin als SEQ ID NO: 1 präsentiert, wobei die erste Aminosäure des reifen Proteins Valin ist (an Position 1) (hierin als rHu-Leptin 1–146, SEQ ID NO: 1), bezeichnet:

V	P	I	Q	K	V	Q	D	D	T	K	T	L	I	K	T	I	V		
T	R	I	N	D	I	S	H	T	Q	S	V	S	S	K	Q	K	V	T	G
L	D	F	I	P	G	L	H	P	I	L	T	L	S	K	M	D	Q	T	L
A	V	Y	Q	Q	I	L	T	S	M	P	S	R	N	V	I	Q	I	S	N
D	L	E	N	L	R	D	L	L	H	V	L	A	F	S	K	S	C	H	L
P	W	A	S	G	L	E	T	L	D	S	L	G	G	V	L	E	A	S	G
Y	S	T	E	V	V	A	L	S	R	L	Q	G	S	L	Q	D	M	L	W
Q	L	D	L	S	P	G	C												

[0072] Wahlweise kann man eine natürliche Variante des humanen Leptins verwenden, welche 145 Aminosäuren hat und dem im Vergleich zu rHu-Leptin 1–146 ein Glutamin an Position 28 fehlt, unten dargestellt (hierin als rHu-Leptin 1–145, SEQ ID NO: 2, bezeichnet, wobei die Leerstelle („__“) keine Aminosäure anzeigt:

	V	P	I	Q	K	V	Q	D	D	T	K	T	L	I	K	T	I	V	
T	R	I	N	D	I	S	H	T	_	S	V	S	S	K	Q	K	V	T	G
L	D	F	I	P	G	L	H	P	I	L	T	L	S	K	M	D	Q	T	L
A	V	Y	Q	Q	I	L	T	S	M	P	S	R	N	V	I	Q	I	S	N
D	L	E	N	L	R	D	L	L	H	V	L	A	F	S	K	S	C	H	L
P	W	A	S	G	L	E	T	L	D	S	L	G	G	V	L	E	A	S	G
Y	S	T	E	V	V	A	L	S	R	L	Q	G	S	L	Q	D	M	L	W
Q	L	D	L	S	P	G	C												

[0073] Zum Beispiel kann man für die hierin rezipierten bestimmten glykosilierten Leptinproteine wählen, die „Q-“Version des humanen Leptin (1–145, SEQ ID NO: 2) zu verwenden und die korrespondierenden Stellen, welche für das 1–146 Aminosäuren humane Leptin aufgezählt sind, zu modifizieren, um Glykosilierungsstellen einzufügen.

[0074] Im Allgemeinen wird das Leptinprotein für die Verwendung hierin von therapeutischem Nutzen in Menschen geeignet sein (siehe auch tierische Leptine, unten). Deshalb kann man die Aktivität empirisch testen, um zu bestimmen, welche Form des Leptinproteins verwendet werden kann. Wie in WO 96/05309 dargestellt, können alle, das Leptinprotein in seiner nativen Form oder Fragmente (wie zum Beispiel Enzymspaltungsprodukte) oder andere verkürzte Formen und Analoge die biologische Aktivität beibehalten. Jede solcher Formen kann verwendet werden, um die vorliegenden glykosilierten Leptinzusammensetzungen herzustellen, obwohl solche veränderten Formen getestet werden sollten, um die gewünschten Charakteristika zu bestimmen. Siehe auch die internationalen PCT Veröffentlichungsnummern WO 96/40912, WO 97/06816, WO 97/18833, WO 97/38014 und WO 98/08512, alle hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

[0075] Man kann ein Analog des rekombinanten humanen Leptins durch Veränderung der Aminosäurereste in der rekombinanten humanen Sequenz herstellen, wie zum Beispiel durch Substituierung der Aminosäuren, welche von der Mäusesequenz abweichen. Das murine Leptin ist im wesentlichen zu dem humanen Leptin homolog, insbesondere als ein reifes Protein und weiter, insbesondere am N-Terminus. Da das rekombinante humane Protein in Mäusen eine biologische Aktivität hat, wird solch ein Analog in Menschen wahrscheinlich aktiv sein. Zum Beispiel kann man in der Aminosäuresequenz des nativen humanen Leptins, wie in SEQ ID NO: 1 dargestellt, eine oder mehrere der Aminosäuren an den Positionen 32, 35, 50, 64, 68, 71, 74, 77, 89, 97, 100, 105, 106, 107, 108, 111, 118, 136, 138, 142 und 145 mit anderen Aminosäuren substituieren. Man kann die Aminosäure an der korrespondierenden Position des Mäuseproteins (SEQ ID NO: 3) oder eine andere Aminosäure auswählen.

[0076] Man kann weiterhin, auf der Ratten Leptinsequenz, bezeichnet als OB-Protein, basierend synthetische Moleküle herstellen. Murakami et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 209: 944–52 (1995), hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Das Ratten OB-Protein unterscheidet sich von dem humanen OB-Protein an den folgenden Positionen (Verwendung der Numerierung von SEQ ID NO: 1): 4, 32, 33, 35, 50, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 101, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 118, 136, 138 und 145. Man kann mit einer anderen Aminosäure eine oder mehrere dieser Aminosäuren an diesen divergenten Positionen substituieren. Die Positionen im Fettdruck sind jene, in welchen das murine OB-Protein, als auch das Ratten OB-Protein divergent von dem humanen OB-Protein sind und somit besonders für Änderungen geeignet sind. An einer oder mehreren dieser Stellen kann man eine Aminosäure von dem korrespondierenden Ratten OB-Protein substituieren, oder eine andere Aminosäure.

[0077] Die Positionen von sowohl dem Ratten, als auch dem murinen OB-Protein, welche von dem reifen humanen OB-Protein divergent sind, sind: 4, 32, 33, 35, 50, 64, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 118, 136, 138, 142 und 145. Ein OB-Protein gemäß der Sequenz SEQ ID NO: 1, welches eine oder mehrere der obigen Aminosäuren mit einer anderen Aminosäure ersetzt hat, wie zum Beispiel die Aminosäure, welche in der korrespondierenden Ratten oder murinen Sequenz gefunden wird, kann auch wirksam sein.

[0078] Des Weiteren sind die Aminosäuren, welche im OB-Protein von Rhesus-Affen gefunden werden, welche von dem reifen humanen OB-Protein divergent sind (die Identitäten sind in Klammern in der Ein-Buchstaben-Aminosäure Abkürzung notiert): 8 (S), 35 (R), 48 (V), 53 (Q) 60 (I), 66 (I), 67 (N), 68 (L), 89 (L), 100 (L),

108 (E), 112 (D) und 118 (L). Da das rekombinante humane OB-Protein in cynomologen Affen aktiv ist, kann ein humanes OB-Protein gemäß der Sequenz SEQ ID NO: 1, welches ein oder mehrere der von Rhesusaffen divergenten Aminosäuren mit einer anderen Aminosäure ersetzt hat, wie zum Beispiel die Aminosäuren in Klammern, wirksam sein. Es sollte beachtet werden, daß bestimmte Rhesus divergente Aminosäuren auch jene sind, die in der obigen Mäusespezies gefunden wird (Positionen 35, 68, 89, 100 und 112). Somit kann man ein murines/Rhesus/humanes Konsensusmolekül herstellen (unter Verwendung der Numerierung von SEQ ID NO: 1), bei welchem eine oder mehrere der Aminosäuren an den Positionen durch eine andere Aminosäure ersetzt ist: 4, 8, 32, 33, 35, 48, 50, 53, 60, 64, 66, 67, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142 und 145.

[0079] Andere Analoge können durch die Entfernung eines Teils der Protein-Aminosäuresequenz hergestellt werden. Zum Beispiel fehlt dem reifen Protein eine Signalsequenz (–22 bis –1). Man kann einen Teil des reifen Proteins entfernen und diese Beseitigung kann ein Vorgang der Herstellung sein, zum Beispiel Spaltung des Signalpeptids oder anderer Pre-Sequenzen vor der ersten N-terminalen Aminosäure des reifen Proteins. Auch kann der N-Terminus eine oder mehrere zusätzliche Aminosäuren enthalten, welche mit der Verwendung solcher Pre-Sequenzen verbunden sind, wie beispielsweise die Spaltung in der Mitte einer Signalpeptid Spaltungsstelle, so daß ein Teil der Aminosäuren der Spaltungsstelle angefügt ist.

[0080] Man kann die folgenden verkürzten Formen des humanen Leptinprotein Moleküls herstellen (Verwendung der Numerierung von SEQ ID NO: 1):

- (a) Aminosäuren 98–146;
- (b) Aminosäuren 1–99 und (verbunden mit) 11–146;
- (c) Aminosäuren 1–99 und (verbunden mit) 112–146, welche eine oder mehrere der Aminosäuren 100–111 sequentiell zwischen den Aminosäuren 99 und 112 plaziert hat.

[0081] Darüber hinaus können die verkürzten Formen auch eine oder mehrere der Aminosäuren, welche (in dem murinen, Ratten oder Rhesus OB-Protein) zu dem humanen OB-Protein divergent sind, verändert haben. Des Weiteren können jegliche Veränderungen in Form von geänderten Aminosäuren sein, wie zum Beispiel Peptidomimetika oder D-Aminosäuren.

[0082] Eingeschlossen sind jene Proteine, wie oben mit Aminosäuresubstitutionen dargestellt, welche „konservativ“ im Hinblick auf die Acidität, die Ladung, die Hydrophobizität, die Polarität, die Größe oder jede der anderen Eigenschaften sind, welche jenen auf dem Fachgebiet bekannt sind. Diese sind in der Tabelle 1 unten dargestellt. Siehe im allgemeinen Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company, N. Y., (1984) S. 498, plus Index, passim. Siehe im allgemeinen Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95–107, 1991, welche durch Bezugnahme hierin aufgenommen sind.

Tabelle 1

Konservative Aminosäure Substitutionen

Basisch:	Arginin Lysin Histidin
Acidisch:	Glutaminsäure Asparaginsäure
Polar	Glutamin Asparagin
Hydrophob:	Leucin Isoleucin Valin
Aromatisch:	Phenylalanin Tryptophan Tyrosin
Kleine:	Glycin Alanin Serin Threonin Methionin

[0083] Daher können die vorliegenden glykosilierten humanen Leptinproteine hergestellt werden, indem zunächst mit einer Sequenz gestartet wird, ausgewählt aus (gemäß der Aminosäure-Sequenz, wie hierin in SEQ ID NO: 1 dargestellt):

- (a) die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1, welcher wahlweise ein Glutaminrest an der Position 28 fehlt;
- (b) eine Aminosäuresequenz des Teilstücks (a), bei welcher eine unterschiedliche Aminosäure in einer oder mehrere der folgenden Positionen substituiert ist: 4, 8, 32, 33, 35, 48, 50, 53, 60, 64, 66, 67, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142 und 145;
- (c) ein verkürztes Leptinprotein Analog ausgewählt aus: (Verwendung der Numerierung des obigen Unterteils (a)):
 - (i) Aminosäuren 98–146
 - (ii) Aminosäuren 1–99 und 112–146
 - (iii) Aminosäuren 1–99 und 112–146, bei welchen eine oder mehrere der Aminosäuren 100–111 sequentiell zwischen die Aminosäure 99 und 112 plaziert sind; und
 - (iv) das verkürzte Leptinanalог des Teilstücks (i), bei welchem eine oder mehrere der Aminosäuren 100, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142 und 145 mit einer anderen Aminosäure substituiert ist;
 - (v) das verkürzte Leptinanalог des Teilstücks (ii), bei welchem eine oder mehrere der Aminosäuren 4, 8, 32, 33, 35, 48, 50, 53, 60, 64, 66, 67, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 112, 118, 136, 138, 142 und 145 mit einer anderen Aminosäure ersetzt ist;
 - (vi) das verkürzte Leptinanalог des Teilstücks von (iii), bei welchem eine oder mehrere der Aminosäuren 4, 8, 32, 33, 35, 48, 50, 53, 60, 64, 66, 67, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142 und 145 mit einer anderen Aminosäure ersetzt ist; und
- (d) Ein Leptinprotein irgendeines Teilstücks von (a)–(c), welches eine oder mehrere konservierte Aminosäure Substitutionen hat und dann die Auswahl einer Stelle, bevorzugt aus der äußeren Oberfläche einer Alpha-Helix, um durch Addition oder Substitution eine Glykosilierungsstelle einzufügen. Besondere Glykosi-

lierungsstellen sind oben rezitiert.

[0084] Leptinproteine, Analoge und ähnliche Moleküle sind auch in den folgenden Publikationen berichtet; jedoch ist keine Darstellung gemacht worden im Hinblick auf die Aktivität irgendeiner der berichteten Zusammensetzungen:

US-Patente Nr. 5,521,283; 5,525,705; 5,532,336; 5,552,522; 5,552,523; 5,552,524; 5,554,727; 5,559, 208; 5,563,243; 5,563,244; 5,563,245; 5,567,678; 5,567,803; 5,569,743; 5,569,744; 5,574,133; 5,580,594; 5,594,101; 5,594,104; 5,605,886; 5,614,379; 5,691,309; 5,719,266; (alle Eli Lilly und dem Konzern zugeordnet)

PCT WO96/23513; WO96/23514; WO96/23515; WO96/23516; WO96/23517; WO96/23518; WO96/23519; WO96/23520; WO96/23815; WO96/24670; WO96/27385; EP 725078; EP 725079; (alle Eli Lilly und dem Konzern zugeordnet)

PCT WO96/22308; (ZymoGenetics zugeordnet)

PCT WO96/29405 (Ligand Pharmaceuticals, Inc. zugeordnet)

PCT WO96/31526 (Amylin Pharmaceuticals, Inc. zugeordnet)

PCT WO96/34885 (Smithkline Beecham zugeordnet)

PCT WO96/35787 (Chiron zugeordnet)

EP 736599 (Takeda zugeordnet)

EP 741187 (F. Hoffman LaRoche zugeordnet)

[0085] Bis zu dem Ausmaß, zu dem diese Referenzen verwendbare Leptinproteine oder Analoge bereitstellen, oder zugehörige Zusammensetzungen oder Verfahren, können solche Zusammensetzungen und/oder Verfahren in Verbindung mit den vorliegenden pharmazeutischen Zusammensetzungen der glykosilierter Leptine verwendet werden, wie zum Beispiel für die Co-Verabreichung (zusammen oder separat, in einem ausgewählten Dosierungsplan). Mit den obigen Vorbehalten werden diese Publikationen hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

Nukleinsäuren, Vektoren, Wirtszellen und andere Expressionssysteme

[0086] Auch sind durch die vorliegende Erfindung Nukleinsäuren umfaßt, welche die vorliegenden glykosilierten Leptinproteine kodieren. Solche Nukleinsäuren können durch die zielgerichtete Mutagenese einer vorhandenen Nukleinsäuresequenz oder durch künstliche Mittel hergestellt werden, oder durch andere Mittel, wie sie jenen auf dem Fachgebiet verfügbar sind. Die Verfahren, wie sie in den Referenzbeispielen unten offenbart sind, sind veranschaulichend.

[0087] Vektoren umfassen Plasmide, als auch virale Vektoren, wie sie jenen auf dem Fachgebiet verfügbar sind. Vektoren können für die Klonierung oder Expression sein und umfassen Plasmide, Cosmide und prokaryotische oder eukaryotische zellinfizierende Viren. Für die Expression von glykosiliertem Protein werden Vektoren für die Expression in einer eukaryotischen Zelle nützlich sein. Das Expressionssystem kann konstitutiv oder induzierbar sein, wie zum Beispiel Systeme, welche einen induzierbaren Mouse Mammary Tumor Virus LTR Promoter umfassen. Enhancer, Transkriptions-Terminatoren, Splice-Donoren und Akzeptorenstellen und andere Elemente können in dem Gesamtsystem umfaßt sein, wie es jenen auf dem Fachgebiet bekannt ist.

[0088] Die in den nachfolgenden Referenzbeispielen offenbarten Vektoren sind veranschaulichend. In den vorliegenden Ausführungsbeispielen wurde eine modifizierte Form von pDSRa2 verwendet, um glykosilierte Leptinproteine zu exprimieren.

[0089] Die Wirtszellen können prokaryotisch sein, wie zum Beispiel Bakterien, die zum Beispiel für die Klonierung der vorliegenden Nukleinsäuren verwendet werden. Andere Wirtszellen können eukaryotisch sein. Eukaryotische Wirtszellen können ausgewählt sein aus Phylum Chordata, wie zum Beispiel jene in der Klasse der Mammalia. Primatenzellen, einschließlich humane Zellen (wie zum Beispiel Namalwa, HeLa, humane hepatozellulär Karzinoma, wie zum Beispiel Hep G2 Zellen, humane embryonale Nierenzellen, humane Leberzellen, humane Lungenzellen oder Zellen, welche aus humanen Quellen kultiviert worden sind) und COS-Zellen, oder andere Säugetierzellen, wie zum Beispiel Baby Hamster Kidney Zellen („BHK“-Zellen), Chinese Hamster Ovary Cells („CHO“) Zellen, Maus Sertoli Zellen, Hunde Nierenzellen, Buffaloratten Leberzellen, Maus Mammary Tumor Zellen können verwendet werden. Insektenzellen können auch verwendet werden. Unbedeutendere Wirtszellorganismen, wie zum Beispiel Hefen und Pilze sind auch umfaßt. Siehe im Allgemeinen Margulis, Five Kingdoms, 2. Auflage (1988) W. H. Freeman & Co., New York, zur Klassifizierung der Organismen.

[0090] Man kann erstreben, mehr als ein gewünschtes Protein zu co-exprimieren. Zum Beispiel können die

vorliegenden glykosilierten Leptinproteine zusammen mit einem oder mehreren anderen erwünschten Proteinen in einer eukaryotischen Wirtszelle exprimiert werden. Die Proteine können getrennt werden, indem eine Anzahl von verfügbaren Separationstechniken verwendet werden, in Abhängigkeit von den Charakteristiken von dem Protein. Zum Beispiel kann man in einer einzigen Wirtszelle, wie zum Beispiel einer CHO-Zelle, ein glykosiliertes Leptinprotein exprimieren, als auch ein anderes Protein, wie zum Beispiel ein anderes glykosiliertes Protein, welches für die therapeutische Verwendung erwünscht ist. Man kann zum Beispiel das Molekulargewicht verwenden, um die Proteine für die Reinigung zu trennen. Auf diese Weise können Einspaarungen in der Herstellung erreicht werden, indem zwei verschiedene Proteine von einer einzigen Zellkultur hergestellt werden.

[0091] Man kann auch transgene Tiere verwenden, um das vorliegende glykosillierte Leptinprotein zu exprimieren. Zum Beispiel kann man ein transgenes Milch-produzierendes Tier (zum Beispiel eine Kuh oder eine Ziege) verwenden und die vorliegende glykosillierte Leptinprotein in der hergestellten Milch erhalten. Man kann Pflanzen verwenden, um die vorliegenden glykosilierten Proteine herzustellen, jedoch ist im Allgemeinen die in Pflanzen erfolgende Glykosilierung verschieden von der in Säugetierzellen erzeugten und kann ein glykosiliertes Produkt zur Folge haben, welches nicht für die humane therapeutische Verwendung geeignet ist.

Gentherapie

[0092] Die hierin zur Verfügung gestellte DNA (oder korrespondierenden RNAs) können auch für die Gentherapie verwendet werden. Ein Übersichtsartikel über Gentherapie ist Verma, Scientific American, November 1990, Seiten 68–84, welcher hierin durch Bezugnahme aufgenommen ist.

[0093] Somit sieht die vorliegende Erfindung eine Population von Zellen vor, welche die vorliegenden glykosilierten Leptinproteine exprimieren. Solche Zellen sind für die Transplantation oder Implantation in ein Individuum für therapeutische Zwecke geeignet. Man kann dann solche Zellen in ein Individuum implantieren. Solche Zellen können zum Beispiel Leberzellen sein, Knochenmarkzellen, oder Zellen, welche aus der Nabelschnur erhalten worden sind. Wahlweise kann man wünschen, zirkulierende Zellen zu verwenden, wie zum Beispiel Blutvorläuferzellen, T-Zellen oder andere Blutzellen. Für Menschen können humane Zellen verwendet werden. Zellen können in der Form von Gewebe sein. Solche Zellen können vor der Transplantation oder Implantation kultiviert werden.

[0094] Die auf den Empfänger zu übertragenen Zellen können kultiviert werden, indem einer oder mehrere Faktoren, die das Wachstum oder die Proliferation von solchen Zellen beeinflussen, wenn erforderlich verwendet werden. Hematopoietische Faktoren können in der Kultur von hematopoietischen Zellen verwendet werden. Solche Faktoren umfassen G-CSF, EPO, MGDF, SCF, Flt-3 Ligand, Interleukine (z.B. IL1–IL13), GM-CSF, LIF und Analoge und Derivate davon, wie sie jenen auf dem Fachgebiet verfügbar sind.

[0095] Nervenzellen, wie zum Beispiel Neurone oder Glia, können auch verwendet werden, und diese können mit neurotrophischen Faktoren, wie zum Beispiel BDNF, CNTF, GDNF, NT3 oder anderen kultiviert werden.

[0096] Techniken für die Einkapselung von lebenden Zellen sind jenen auf dem Fachgebiet geläufig und die Herstellung von eingekapselten Zellen und ihre Implantation in Patienten kann ohne unangemessenen Aufwand ausgeführt werden. Zum Beispiel beschreiben Baetge et al. (internationale Veröffentlichungs Nr. WO 95/05452; internationale Anmeldungs Nr. PCT/US94/09299, die Offenbarung ist hierin durch Bezugnahme aufgenommen) Membrankapseln, welche genetisch manipulierte Zellen für die wirksame Zufuhr von biologisch aktiven Molekülen enthalten. Die Kapseln sind biokompatibel und einfach wieder auffindbar. Die Kapseln kapseln Zellen ein, welche mit rekombinanten DNA-Molekülen transfiziert sind, welche DNA-Sequenzen umfassen, die für biologisch aktive Moleküle kodieren, die funktionell an Promotoren geknüpft sind, die nicht einer Runterregulation in vivo aufgrund der Implantation in einen Säugetier-Wirt unterworfen sind. Die Mittel gewährleisten die Zufuhr von Molekülen aus lebenden Zellen an bestimmte Zellen innerhalb eines Empfängers. Darüber hinaus siehe US Patent Nummern 4,892,538, 5,011,472 und 5,106,627, jede von ihnen ist besonders hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Ein System für die Einkapselung von lebenden Zellen ist in der PCT-Anmeldung WO 91/10425 von Aebischer et al. beschrieben, hierin besonders durch Bezugnahme aufgenommen. Siehe auch PCT Anmeldung WO 91/10470 von Aebischer et al., Winn et al., Exper. Neurol. 113: 322–329 (1991), Aebischer et al., Exper. Neurol. 111: 269–275, (1991); Tresco et al., ASAIO 38: 17–23 (1992), jede wird besonders durch Bezugnahme hierin aufgenommen.

[0097] Auch die Zufuhr der vorliegenden glykosilierten Leptinproteine in der in vivo und in vitro Gentherapie ist vorgesehen. Die in vivo Gentherapie kann ausgeführt werden, indem die Nukleinsäure, welche das vorlie-

gende glykosilierte Leptinprotein kodiert, in Zellen via einer lokalen Injektion eines Polynukleotidmoleküls eingeführt werden, oder anderer geeigneter Zuführungsvektoren (Hefti, J. Neurobiology, 25: 1418–1435, 1994). Zum Beispiel kann ein Polynukleotidmolekül, welches ein glykosiliertes Leptinprotein kodiert, in einem Adeno-assoziierten Virus Vektor für die Zufuhr in Zielzellen enthalten sein (zum Beispiel Johnson, internationale Veröffentlichungs Nummer WO 95/34670; internationale Anmeldungs Nummer PCT/US95/07178, die Offenbarung wird hierin durch Bezugnahme aufgenommen). Das rekombinante Adeno-assoziierte Virus (AAV) Genom enthält AAV-invertierte terminale Repeats, welche eine DNA-Sequenz flankieren, die den neurotrophischen Faktor kodiert, der funktional an einen funktionellen Promotor und Polyadenylierungssequenzen verknüpft ist.

[0098] Alternative virale Vektoren umfassen, sind aber nicht limitiert auf diese, Retrovirus, Adenovirus, Herpes Simplex Virus und Papilloma Virus Vektoren. Die US 5,672,344 (erteilt am 30. September 1997, Kelley et al., University of Michigan), deren Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, beschreibt ein in vivo viral-vermitteltes Gentransfersystem, welches einen rekombinanten neurotrophischen HSV-1 Vektor einbezieht. Die US 5,399,346 (erteilt am 2. März 1995, Anderson et al., Department of Health and Human Services), deren Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, stellt Beispiele eines Verfahrens für die Versorgung eines Patienten mit einem therapeutischen Protein, durch Zufuhr von humanen Zellen, welche in vitro behandelt worden sind, um ein DNA-Segment einzufügen, welches ein therapeutisches Protein kodiert, zur Verfügung. Zusätzliche Verfahren und Materialien für die Ausführung von Gentherapie Techniken sind in US 5,631,236 (erteilt am 20. Mai 1997, Woo et al., Baylor College of Medicine) Einbindung von adenoviralen Vektoren; US 5,672,510 (erteilt am 30. September 1997, Eglitis et al., Genetic Therapy, Inc.) Einbindung von retroviralen Vektoren; und US 5,635,399 (erteilt am 3. Juni 1997, Kriegler et al., Chiron Corporation) welche retrovirale Vektoren einbeziehen, die Cytokine exprimieren, beschrieben, die Offenbarung wird hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

[0099] Nicht-virale Zuführmethoden umfassen den Liposomen vermittelten Transfer, die Zufuhr nackter DNA (direkte Injektion), den Rezeptor vermittelten Transfer (Liganden-DNA Komplex), die Elektroporation, die Kalziumphosphatpräzipitation und den Mikropartikelbeschluß (zum Beispiel die Genkanone). Gentherapie-Materialien und Verfahren können auch induzierbare Promotoren, gewebespezifische Enhancerpromotoren, DNA-Sequenzen, die für die ortspezifische Integration entworfen worden sind, DNA-Sequenzen, welche in der Lage sind einen selektiven Vorteil über die Elternzelle zu verleihen, Kennzeichnungen, um die transformierten Zellen zu identifizieren, negative Selektionssysteme und Expressionskontrollsysteme (Sicherheitsmessungen), zellspezifische Bindungsmittel (für das Zell-Targeting), zellspezifische Internalisierungsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, um die Expression durch einen Vektor zu erhöhen, als auch Verfahren der Vektorherstellung umfassen. Solche zusätzlichen Verfahren und Materialien für die Ausübung der Gentherapie Techniken werden beschrieben in, die Offenbarungen werden durch Bezugnahme hierin aufgenommen, US 4,970,154 (erteilt am 13. November 1990, D. C. Chang, Baylor College of Medicine) Elektroporations Techniken; WO 9640958 (veröffentlicht 961219, Smith et al., Baylor College of Medicine) Nucleare Liganden; US 5,679,559 (erteilt am 21. Oktober 1997, Kim et al., University of Utah Research Foundation) in Bezug auf ein Lipoprotein enthaltendes System für die Gen Zufuhr; US 5,676,954 (erteilt am 14. Oktober 1997, K. L. Brigham, Vanderbilt University) Einbindung von Liposomen-Trägern; US 5,593,875 (erteilt am 14. Januar 1997, Wurm et al., Genentech, Inc.) in Bezug auf Verfahren der Calcium Phosphat Präzipitation; und US 4,945,050 (erteilt am 31. Juli 1990, Sanford et al., Cornell Research Foundation), worin biologisch aktive Teilchen mit einer Geschwindigkeit an Zellen angetrieben werden, wobei die Teilchen die Oberfläche der Zellen durchdringen und in das Innere der Zellen aufgenommen werden. Expressionskontrolltechniken umfassen die chemisch induzierte Regulation (zum Beispiel WO 96/41865 und WO 97/31899), die Verwendung eines Progesteron-Antagonisten in einem modifizierten Steroidhormonrezeptor System (zum Beispiel US 5,364,791), Ecdysone-Kontrollsysteme (zum Beispiel WO 96/37609) und positive Tetracyclin-regulierbare Transaktivatoren (zum Beispiel US 5,589,362; US 5,650,298; und US 5,654,168).

[0100] Es ist auch vorgesehen, daß die vorliegenden Gentherapie oder Zelltherapie ferner die Zufuhr einer zweiten therapeutischen Zusammensetzung umfassen kann. Zum Beispiel kann die Wirtszelle so modifiziert werden, daß sie sowohl ein glykosiliertes Leptinprotein als auch ein natives humanes Leptin exprimiert und freigesetzt. Wahlweise können sie von separaten Zellen exprimiert und freigesetzt werden. Solche Zellen können einzeln in einen Patienten eingeführt werden oder die Zellen können in einem einzigen implantierbaren Mittel enthalten sein, wie zum Beispiel die oben beschriebenen einkapselnden Membranen.

Selektiv bindende Moleküle

[0101] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf selektiv bindende Reste der vorliegenden glykosilierten

ten humanen Leptinproteine. Ein „selektiv bindender Rest“ bezeichnet eine Substanz, welche selektiv an die vorliegenden glykosilierten humanen Leptinproteine bindet, in glykosierter oder unglykosierter Form. Die Selektivität wird dadurch bestimmt, ob der Bindungsrest an das Testleptinprotein über den Hintergrundlevel (nicht selektiv) bindet. Die selektiv bindenden Moleküle sind Antikörper, wie zum Beispiel monoklonale, polyklonale, monospezifisch polyklonale, welche zum Beispiel durch die Hybridoma-Technologie oder durch Verwendung rekombinanter Nukleinsäuremittel hergestellt sind. Siehe z.B. Huse et al., Science 246: 1275 (1989). Auch hierin umfaßt sind Nukleinsäuren, Vektoren, Wirtszellen und andere Materialien und Verfahren, die in der rekombinanten Nukleinsäureexpression eines selektiv bindenden Rests verwendet werden, wie zum Beispiel ein rekombinanter Antikörper. Man kann eine detektierbare Markierung an einen solch selektiv bindenden Rest anfügen, wie zum Beispiel chemilumineszente, fluoreszente, kolorimetrische oder radioaktive, indem Materialien und Methoden verwendet werden, die jenen auf dem Fachgebiet verfügbar sind. Man kann Assays oder Kits herstellen, welche ein oder mehrerer dieser selektiv bindenden Moleküle enthalten, zur Detektion oder Messung der vorliegenden Leptinproteine. Veranschaulichend umfaßt ein Kit monoklonale Antikörper, welche für ein bestimmtes glykosiliertes Leptinprotein selektiv sind, und Mittel, um die selektive Bindung der besagten monoklonalen Antikörper an das besagte glykosillierte Leptinprotein zu detektieren. Andere Materialien und Methoden für solche Kits stehen jenen auf dem Fachgebiet zur Verfügung.

Formulierungen und Derivate

[0102] In einem noch anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden pharmazeutische Zusammensetzungen der vorliegenden glykosilierten Leptin Zusammensetzungen und Derivate (siehe unten) bereitgestellt. Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen können für die Zufuhr durch Injektion sein, oder für die orale, intrathekale, pulmonare, nasale, transdermale oder andere Formen der Zufuhr. Im Allgemeinen sind durch die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen umfaßt, welche wirksame Mengen von einem Protein oder Derivatprodukten der Erfindung zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmitteln, Konservierungsmitteln, Lösungsmitteln, Emulgatoren, Adjuvantien und/oder Trägern umfaßt. Solche Zusammensetzungen umfassen Verdünnungsmittel mit verschiedenen Pufferinhalten (z.B. Tris-HCl, Azetat, Phosphat), pH und Ionenstärke; Zusatzstoffen, zum Beispiel Detergenzien und Lösungsmittel (z.B. Tween 80, Polysorbat 80), Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure, Natriummetabisulfat), Konservierungsstoffe (z.B. Thimersol, Benzylalkohol) und Massensubstanzen (z.B. Laktose, Mannitol); die Beifügung von Materialien in die Teilchenherstellung von polymeren Verbindungen, wie zum Beispiel Polymilchsäure, Polyglykolsäure, etc. oder in Liposomen. Siehe auch z.B. PCT WO 96/29989, Collins et al., „Stable protein: phospholipid compositions and methods," veröffentlicht am 3. Oktober 1996, hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Hyaluronsäure kann auch verwendet werden, und das kann den Effekt der Förderung einer anhaltenden Zirkulations-Dauer haben. Solche Zusammensetzungen können den physikalischen Zustand, die Stabilität, die Rate der in vivo Freisetzung und die Rate der in vivo Cleaxance der vorliegenden Proteine und Derivate beeinflussen. Siehe z.B. Remington's Pharmaceutical Science, 18. Ausgabe (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) Seiten 1435–1712, welche hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird. Die Zusammensetzungen können in liquider Form hergestellt werden oder können ein Trockenpuder sein, wie zum Beispiel in lyophilisierter Form. Implantierbare verzögerte Freisetzungsformulierungen sind auch umfaßt, wie transdermale Formulierungen.

[0103] Speziell vorgesehen sind orale Dosierungsformen der obigen derivatisierten Proteine. Das Protein kann chemisch modifiziert sein, so daß die orale Zufuhr des Derivats wirksam ist. Im Allgemeinen besteht die vorgesehene chemische Modifizierung in der Anfügung von zumindest einem Rest an das Protein (oder Peptid) Molekül selbst, wobei der besagte Rest (a) die Inhibition der Proteolyse ermöglicht; und (b) die Aufnahme in den Blutkreislauf aus dem Magen oder dem Darm. Auch erwünscht ist die Erhöhung der Gesamtstabilität des Proteins und die Erhöhung der Zirkulationszeit in dem Körper. Siehe PCT WO95/21629, Habberfield, „Oral Delivery of Chemically Modified Proteins" (veröffentlicht am 17. August 1995), hierin durch Bezugnahme aufgenommen, und US Patent Nr. 5,574,018, Habberfield et al., „Conjugates of Vitamin B12 and Proteins", erteilt am 12. November 1996, hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Die dort offenbarten Materialien und Verfahren sind auf die vorliegenden glykosilierten Leptin Zusammensetzungen und Verfahren anwendbar.

[0104] Hierin ist auch die pulmonare Zufuhr des vorliegenden Proteins, oder Derivate davon vorgesehen. Das Protein (Derivat) wird während der Inhalation der Lunge des Säugetiers zugeführt und durchquert das auskleidende Lungeneipithel in den Blutstrom. Siehe PCT WO94/20069, Niven et al., „Pulmonary administration of granulocyte colony stimulating factor", veröffentlicht am 15. September 1994, hierin durch Bezugnahme aufgenommen, und PCT WO96/05309, zuvor durch Bezugnahme aufgenommen, zum Beispiel auf S. 83 und folgende Seiten. Die vorliegenden glykosilierten Leptinproteine können in Teilchen spraygetrocknet sein, welche eine durchschnittliche Größe von weniger als 10 Mikron, oder noch bevorzugter 0,5 bis 5 Mikron haben. Größer eingestellte Teilchen können, in Abhängigkeit von der Dichte eines jeden Partikels, verwendet werden.

[0105] Die nasale Zufuhr des Proteins (oder eines Analogs oder eines Derivates) ist auch vorgesehen. Die nasale Zufuhr ermöglicht die Passage des Proteins in dem Blutstrom, direkt nach der Verabreichung des therapeutischen Produkts in die Nase, ohne Notwendigkeit der Ablagerung des Erzeugnisses in der Lunge. Formulierungen für die nasale Zufuhr umfassen jene, die die Absorption erhöhende Mittel enthalten, wie zum Beispiel Dextran oder Cyclodextran. Die Zufuhr via Transport über andere Schleimhautmembranen ist auch vorgesehen.

[0106] Die vorliegenden glykosilierten Leptinproteine können auch durch die Anfügung von einem oder mehreren chemischen Resten an den Proteinrest derivatisiert werden. Es ist gefunden worden, daß chemische Modifizierungen von biologisch aktiven Proteinen zusätzliche Vorteile unter bestimmten Bedingungen verleihen, wie zum Beispiel die Erhöhung der Stabilität und Zirkulationsdauer des therapeutischen Proteins und die Abnahme der Immunogenität. Siehe US Patent Nr. 4,179,337, Davis et al., erteilt am 18. Dezember 1979. Als ein Review siehe Abuchowski et al., in Enzymes as Drugs (J. S. Holcerberg und J. Roberts, Hrsg. S. 367–383 (1891)). Ein Übersichtsartikel, welcher Proteinmodifikationen und Fusionsproteine beschreibt, ist Francis, Focus on Growth Factors 3: 4–10 (Mai 1992) (veröffentlicht durch Mediscript, Mountview Court, Friern Barnet Lane, London N20, OLD, UK). Man kann wünschen, die vorliegenden glykosilierten Leptinzusammensetzungen weiter zu modifizieren, wie zum Beispiel durch die Addition, durch chemische Modifikation, eines wasserlöslichen Polymers. Die Addition eines chemischen Restes wird wahrscheinlich einen zusätzlichen Herstellungs-schritt erfordern, aber kann weitere Vorteile im Hinblick auf verbesserte Produktcharakteristika zur Folge haben (unter dem Vorbehalt, daß unter einigen Bedingungen die chemische Derivatisierung das Produkt weniger wünschenswert macht, wie zum Beispiel durch Induktion der Bildung von Nierenvacuolen, siehe oben). Die chemischen Reste sollten an das Protein unter Berücksichtigung der Effekte auf die funktionalen oder antigenen Domänen des Proteins hinzugefügt werden. Eine Vielzahl von Anfügungsmethoden steht jenen auf dem Fachgebiet zur Verfügung. Zum Beispiel PCT WO96/11953, „N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods“, veröffentlicht am 25. April 1996, hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen, und EP 0 401 384, hierin durch Bezugnahme aufgenommen (Kopplung von PEG an G-CSF). Die in den oben stehenden Publikationen offenbarten Verfahren und Polymere sind auf die vorliegenden glykosilierten Leptinzusammensetzungen anwendbar, wenn eine Derivatisierung erwünscht ist, um zum Beispiel die Charakteristika einer therapeutischen Zusammensetzung weiter zu verbessern.

[0107] Fusionsproteine können durch die Hinzufügung von Polyaminosäuren an glykosilierte Leptinproteinreste hergestellt werden. Zum Beispiel kann die Polyaminosäure ein Trägerprotein sein, welches dazu dient, die Zirkulationshalbwertszeit des Proteins weiter zu erhöhen. Für die vorliegenden therapeutischen oder kosmetischen Zwecke sollten besagte Polyaminosäuren jene sein, welche keine neutralisierende antigenen Antwort erzeugen, oder andere nachteilige Reaktionen. Solche Polyaminosäuren können ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Serumalbumin (wie zum Beispiel humanes Serumalbumin), ein Antikörper, oder ein Teil davon (wie zum Beispiel die konstante Domäne eines Antikörpers, manchmal „F_c“ genannt) oder andere Polyaminosäuren. Die Stelle der Anhaftung der Polyaminosäure kann an dem N-Terminus des glykosilierten Leptinproteinrestes sein, oder an einer anderen Stelle, und kann auch durch einen chemischen „Linker“-Rest mit dem Protein verbunden werden. Siehe z.B. PCT WO 98/28427, veröffentlicht am 2. Juli 1988, mit dem Titel „Ob Fusion Protein Compositions and Methods“, hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen. Die Polyaminosäure kann verwendet werden, um zur Detektion oder Reinigung beizutragen, wie zum Beispiel durch Verwendung einer „FLAG“-Markierung, einer „his“-Markierung, einer „myc“-Markierung oder anderen Polyaminosäure-Markierungen, welche jenen auf dem Fachgebiet bekannt sind.

[0108] Verwandte, detektierbare Markierungen können den vorliegenden glykosilierten Leptinproteinen angefügt werden. Radioisotope, Licht-emittierende (z.B. fluoreszente oder chemilumineszente Verbindungen), enzymatisch spaltbare Verbindungen, detektierbare Antikörper (oder Modifikationen davon) oder andere Substanzen können für solche Markierungen der vorliegenden Proteine verwendet werden. Die Detektion des Proteins via der Verwendung einer Markierung kann für die Identifikation des Vorhandenseins oder der Menge des vorliegenden Proteins nützlich sein, oder einer Verbindung, welche solche Proteine enthält (wie z.B. ein Antikörper/Protein Komplex).

Dosierungen

[0109] Der Fachmann wird in der Lage sein, die wirksamen Dosierungen durch Verabreichung und Beobachtung des erwünschten therapeutischen Effektes zu bestimmen. Kürzlich ist für unmodifiziertes rmetHu-Leptin 1–146 gezeigt worden, dass es bei Dosierungen von 0,3 mg Protein/kg Körpergewicht/Tag wirksam ist, und es ist herausgefunden worden, daß es bei einer Dosierung von 0,1 mg Protein/kg Körpergewicht/Tag weniger wirksam ist. Greenberg et al., Preliminary safety and efficacy of recombinant methionyl human Leptin adminis-

tered by SC injection in lean and obese subjects. Poster präsentiert auf dem: Annual Meeting der American Diabetes Association; 16. Juni 1998, Chicago, IL. Der gewünschte Dosierungsbereich, um Vorteile über das vorhandene rmetHu-Leptin 1–146 zu haben, ist der gleiche oder niedriger als der obige. Auch kann ein gewünschter Dosierungsbereich einer sein, in welchem die gleiche (oder weniger) Proteinkonzentration weniger häufig verabreicht wird. Die wirksamen Dosierungen können bestimmt werden, indem diagnostische Werkzeuge im Zeitablauf verwendet werden. Zum Beispiel kann eine Diagnose für das Messen der Mengen von Leptin im Blut (oder Plasma oder Serum) zuerst verwendet werden, um die endogenen Mengen von Leptin zu bestimmen. Solch ein diagnostisches Mittel kann in der Form eines Antikörper-Assays sein, wie zum Beispiel ein Antikörper-Sandwich-Assay. Die Menge von endogenem Leptin wird anfangs quantifiziert und eine Grundlinie wird bestimmt. Die therapeutischen Dosierungen werden bestimmt indem die Quantifizierung von endogenem und exogenem Leptin (d.h. Protein, Analog oder Derivative, welche innerhalb des Körpers gefunden werden, entweder selbst hergestellt oder verabreicht) über den Verlauf der Therapie fortgeführt wird. Die Dosierungen können daher im Verlauf der Therapie variieren, mit einer relativ hohen Dosierung, welche anfangs verwendet wird, bis ein therapeutischer oder kosmetischer Nutzen zu erkennen ist, und niedrigere Dosierungen können verwendet werden, um die therapeutischen oder kosmetischen Vorteile aufrechtzuerhalten.

[0110] Während des anfänglichen Verlaufs einer Therapie einer fettsüchtigen Person können die Dosierungen verabreicht werden, durch die eine Gewichtsabnahme und eine gleichzeitige Fettgewebeabnahme erreicht wird. Sobald eine Gewichtsabnahme erreicht ist, kann eine Dosierung verabreicht werden, welche ausreichend ist, um eine erneute Zunahme von Gewicht zu verhindern, die dennoch ausreichend ist, um das gewünschte Gewicht oder die Fettmenge aufrechtzuerhalten. Diese Dosierungen können empirisch bestimmt werden, da die Effekte von Leptin reversibel sind. Zum Beispiel Campfield et al., Science 269: 546–549 (1995) auf S. 547. Somit würde man, wenn eine Dosierung einen zu beobachtenden Gewichtsverlust zur Folge hat, obwohl ein Gewichtsverlust nicht erwünscht ist, eine geringere Dosierung verabreichen, um so das gewünschte Gewicht aufrecht zu erhalten.

Methoden der Verwendung

Therapeutisch.

[0111] Therapeutische Verwendungen umfassen die Gewichtsmodulation, die Behandlung oder die Prävention von Diabetes, Reduktion von Blut-Lipid (und die Behandlung von ähnlichen Zuständen), Erhöhung der mageren Körpermasse und Erhöhung der Sensitivität gegenüber Insulin. Darüber hinaus können die vorliegenden Zusammensetzungen für die Herstellung eines oder mehrerer Medikamente für die Behandlung oder Verbesserung der obigen Zustände verwendet werden.

Kosmetisch.

[0112] Für jene, die lediglich eine Verbesserung des äußeren Erscheinungsbildes wünschen, können die vorliegenden Zusammensetzungen für die Gewichtsabnahme verwendet werden, oder für die Aufrechterhaltung des Gewichtes, das keine begleitenden Effekte auf einen nachteiligen medizinischen Zustand hat. Darüber hinaus können die vorliegenden Zusammensetzungen für die Herstellung einer oder mehrere Zubereitungen für kosmetische Zwecke verwendet werden.

Gewichtsmodulation.

[0113] Die vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren können für die Gewichtsreduktion verwendet werden. Auf eine andere Art und Weise betrachtet können die vorliegenden Zusammensetzungen für die Aufrechterhaltung eines gewünschten Gewichtes oder Menge an Adipositas verwendet werden. Wie in Mäusemodellen gezeigt worden ist (siehe oben), hat die Verabreichung der vorliegenden glykosilierten Leptinproteine einen Gewichtsverlust zur Folge. Die verloren gegangene Körpermasse ist hauptsächlich Fettgewebe, oder Fett. Solch ein Gewichtsverlust, oder die Aufrechterhaltung eines bestimmten Gewichtes, kann mit der Prävention oder der Behandlung von Begleitumständen verbunden sein, wie zum Beispiel jene unten, und stellen daher eine therapeutische Anwendung dar.

Behandlung von Diabetes.

[0114] Die vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren können in der Vorbeugung oder Behandlung von Typ I oder Typ II Diabetes verwendet werden. Da der Typ II Diabetes mit Obesität verbunden sein kann, kann die Verwendung der vorliegenden Erfindung zur Gewichtsreduktion (oder Aufrechterhaltung eines ge-

wünschten Gewichtes, oder Reduktion oder Aufrechterhaltung in der Menge an Adipositas) auch die Ausprägung von Diabetes vermindern oder vorbeugen. Darüber hinaus können die vorliegenden Zusammensetzungen sogar in Abwesenheit von Dosierungen, welche ausreichend sind, um einen Gewichtsverlust zur Folge zu haben, verwendet werden, um Diabetes vorzubeugen oder zu vermindern.

[0115] Die Verabreichung der vorliegenden Zusammensetzungen kann eine erhöhte Sensitivität auf endogenes oder exogenes Insulin zur Folge haben und einem Individuum ermöglichen, die Menge an Zugabe von exogenem Insulin, welche erforderlich ist, um Typ II Diabetes zu behandeln, zu reduzieren oder zu vermeiden. Es ist weiterhin vorgesehen, daß die vorliegenden Zusammensetzungen für die Behandlung, Prävention oder Minderung von Typ I Diabetes verwendet werden können.

Modulation des Blutlipids.

[0116] Die vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren können für die Modifikation der Mengen an Blutlipid verwendet werden. Idealerweise wird die Dosierung in Situationen, wo lediglich die Reduktion der Mengen an Blutlipid erwünscht ist, oder wo die Aufrechterhaltung der Mengen an Blutlipid erwünscht ist, ungenügend sein, um eine Gewichtsabnahme zur Folge zu haben. Somit können während eines anfänglichen Verlaufs einer Therapie eines fettleibigen Patienten Dosierungen verabreicht werden, durch die ein Gewichtsverlust und eine gleichzeitige Reduzierung der Menge an Blutlipid erreicht werden. Sobald ein ausreichender Gewichtsverlust erreicht ist, kann eine Dosierung verabreicht werden, die ausreichend ist, um eine erneute Gewichtszunahme zu verhindern, dennoch ausreichend ist, um die gewünschten Mengen an Blutlipid aufrechtzuhalten, oder andere Zustände, wie zum Beispiel hierin dargestellt. Demnach würde man, wenn eine Dosierung einen zu beobachtenden Gewichtsverlust zur Folge hat, wenn ein Gewichtsverlust nicht erwünscht ist, eine geringere Dosierung verabreichen, um die gewünschten Mengen an Blutlipid zu erhalten, dennoch das gewünschte Gewicht aufrechterhalten. Siehe zum Beispiel PCT Veröffentlichung WO 97/06816, hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

Erhöhung der Magermasse oder der Insulinsensitivität.

[0117] Idealerweise wird in Situationen, wo lediglich eine Erhöhung der mageren Körpermasse erwünscht ist, die Dosierung unzureichend sein, um einen Gewichtsverlust zur Folge zu haben. Somit können während des anfänglichen Verlaufs einer Therapie einer fettleibigen Person Dosierungen verabreicht werden, durch die ein Gewichtsverlust und gleichzeitige Abnahme des Fettgewebes/Erhöhung der Magermasse erreicht wird. Sobald ausreichend Gewichtsverlust erreicht ist, kann eine Dosierung, welche ausreichend ist, um erneute Gewichtszunahme zu verhindern, dennoch ausreichend ist, um die gewünschte Erhöhung der Magermasse aufrechtzuhalten (oder Prävention der Depletion der Magermasse) verabreicht werden. Für die Erhöhung der Sensitivität eines Individuums gegenüber Insulin können ähnliche Dosierungsüberlegungen in Betracht gezogen werden. Die Erhöhung der Magermasse ohne Gewichtsverlust kann ausreichend erreicht werden, um die Menge an Insulin (oder möglicherweise Amylin, Amylin Antagonisten oder Agonisten, oder Thiazolidinediones, oder andere potentielle Mittel zur Behandlung von Diabetes) zu erniedrigen, welche einem Individuum zur Behandlung von Diabetes verabreicht werden würde. Für die Erhöhung der Gesamt-Kraft (overall strength) können ähnliche Dosierungsüberlegungen angestellt werden. Die Erhöhung der Magermasse (lean mass) und die gleichzeitige Erhöhung der Gesamt-Kraft kann mit Dosierungen erreicht werden, die ungenügend sind, um eine Gewichtsabnahme zur Folge zu haben. Andere Vorteile, wie zum Beispiel eine Erhöhung der roten Blutzellen (und Oxygenierung in dem Blut) und eine Abnahme der Knochenresorption oder Osteoporose können auch ohne Gewichtsverlust erreicht werden. Zum Beispiel PCT WO97/18833, veröffentlicht am 29. Mai 1997, hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen.

Kombinationstherapien.

[0118] Die vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren können zusammen mit anderen Therapien verwendet werden, wie zum Beispiel einer geänderten Diät und Belastung. Andere Medikamente, wie zum Beispiel jene, die in der Behandlung von Diabetes verwendbar sind (z.B. Insulin oder möglicherweise Amylin, Antagonisten oder Agonisten davon, Thiazolidinediones, oder andere mögliche Arzneimittel zur Behandlung von Diabetes), Cholesterin und Blutdruck senkende Medikamente (wie zum Beispiel jene, welche die Blutlipidmengen senken oder andere kardiovaskuläre Medikamente), die Aktivität erhöhende Medikamente (z.B. Amphetamine), Diuretiker (für die Flüssigkeitselimination) und Appetitzügler (wie zum Beispiel Mittel, welche auf die Neuropeptid- γ -Rezeptoren wirken, Inhibitoren der Wiederaufnahme von Serotonin oder Magenfett-Wiederaufnahme Inhibitoren). Solch eine Verabreichung kann simultan sein oder kann nacheinander sein. Darüber hinaus können die vorliegenden Verfahren in Verbindung mit chirurgischen Verfahren verwendet werden, wie zum

Beispiel kosmetischen Operationen, die die Änderung der Gesamterscheinung des Körpers vorsehen (z.B. Liposuktion oder Laseroperationen, die die Abnahme von Körpermasse vorsehen, oder Implantatoperationen, die den Zuwachs der Erscheinung an Körpermasse vorsehen). Die gesundheitlichen Vorteile von Herzoperationen, wie zum Beispiel Bypass-Operationen oder anderer Operationen, welche die Erleichterung eines schlimmen Zustandes vorsehen, welcher durch die Blockierung von Blutgefäßen durch Fettablagerungen verursacht worden sind, wie zum Beispiel arterielle Plaque, können mit gleichzeitiger Verwendung der vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren erhöht werden. Verfahren zur Eliminierung von Gallensteinen, wie zum Beispiel Ultraschall oder Laserverfahren, können auch verwendet werden, entweder vor, während oder nach dem Verlauf der vorliegenden therapeutischen Verfahren. Darüber hinaus können die vorliegenden Verfahren als Zusatz zu Operationen oder Therapien von gebrochenen Knochen, verletzten Muskeln oder anderen Therapien verwendet werden, welche durch eine Erhöhung der Magergewebemasse verbessert werden.

Verfahren zur Herstellung

[0119] Wie oben angedeutet, ist auch beobachtet worden, daß bestimmte Konstrukte von Signalsequenzen und Sequenzen von reifem Protein die Glykosilierungseffizienz verbessern können. In diesem Zusammenhang wird der Begriff „Signalsequenz“ (manchmal auf dem Fachgebiet als „Signalpeptid“ bezeichnet) verwendet, um ein Peptid zu bezeichnen, das am oder in der Nähe des N-Terminus des reifen Proteins gefunden wird, üblicherweise ungefähr 15 bis ungefähr 30 Aminosäuren lang ist, reich an hydrophoben Aminosäuren ist, welche die Sekretion des reifen Proteins in das endoplasmatische Retikulum erleichtert. Die anfängliche Glykosilierung des Proteins erfolgt im endoplasmatischen Retikulum oder der Zellmembranregion. Die Signalsequenzen werden von der reifen Sequenz vor der Sekretion des reifen Proteins abgespalten. Siehe Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4. Ausgabe, 1987, auf S. 731, (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, Kalifornien), hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Insbesondere sind verschiedene Signalsequenzen, welche nicht natürlicherweise funktionell an ein natürlicherweise vorkommendes Leptinprotein geknüpft sind, verwendet worden und es ist gefunden worden, dass sie die Glykosilierungseffizienz von multiplen glykosilierten Leptinproteinen verbessern.

[0120] Zum Beispiel ist gefunden worden, daß im Vergleich zu der nativen humanen Leptin Signalsequenz, die Signalsequenz, die normalerweise an der Tissue-Plasminogen-Aktivatorsequenz gebunden gefunden wird, wenn diese zusammen mit der Expression von verschiedenen hierin beschriebenen multiplen glykosilierten Leptinproteinen verwendet wird, höhere Mengen an Glykosilierung resultieren (z.B. Glykosilierungsreste an allen möglichen Stellen in einem höheren Anteil des exprimierten Moleküls des reifen Proteins).

[0121] Deswegen bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf ein Verfahren zur Herstellung eines 1 glykosilierten Leptinproteins. umfassend:

- (a) Kultivieren einer Wirtszelle unter geeigneten Bedingungen für die Expression, die eine DNA-Sequenz enthält, die in der 5' nach 3' Richtung (i) eine Signalsequenz kodiert und (ii) eine DNA, welche ein glykosiliertes Leptinprotein kodiert; und
- (b) Erhalten des besagten glykosilierten Leptinproteins.

[0122] Ferner, wie oben diskutiert, bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung eines glykosilierten Leptinproteins, wobei besagtes Signal ausgewählt ist unter:

- a) (SEQ ID NO. 3) (natives humanes Leptin Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVQA

- b) (SEQ ID NO. 4) (modifiziertes humanes Leptin Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVSPS

- c) (SEQ ID NO. 5) (modifiziertes humanes Leptin Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVSP

- d) (SEQ ID NO. 6) (modifiziertes humanes Leptin Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVSPA

- e) (SEQ ID NO. 7) (modifiziertes humanes Leptin Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVSNS

- f) (SEQ ID NO. 8) (modifiziertes humanes tPA Signalpeptid)

MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPS

g) (SEQ ID NO. 9) (modifiziertes humanes tPA Signalpeptid)

MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSP

h) (SEQ ID NO. 10) (modifiziertes tPA Signalpeptid)

MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSNS

i) (SEQ ID NO. 11) (modifiziertes tPA Signalpeptid)

MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPA

j) (SEQ ID NO. 12) (Leptin/tPA Signalpeptid)

MHWGTLCCVLLLCGAVFVSPS

k) (SEQ ID NO. 13) (Leptin/tPA Signalpeptid)

MHWGTLCCVLLLCGAVFVSP

[0123] In ähnlicher Weise kann man Nukleinsäuresequenzen verwenden, die solche Signalpeptide kodieren. Die nachfolgenden DNA-Sequenzen sind, mit Ausnahme der modifizierten humanen Leptin Signalpeptid Signalsequenz (d, SEQ ID NO. 6), welche nicht gemacht wurde, wie in den nachstehenden Ausführungsbeispielen beschrieben verwendet worden, um die korrespondierenden Signalpeptide, wie oben dargestellt, zu kodieren.

SEQ ID NO. 14 (native humane Leptin Signalpeptid-DNA)

**ATGCATTGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTGGCCCTATCTTTCTATG
TCCAAGCT**

SEQ. ID NO: 15 (modified human leptin signal peptide DNA)

**ATGCATTGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTGGCCCTATCTTTCTATG
TTTCGCCAGC**

SEQ. ID NO: 16 (modified human leptin signal peptide DNA)

**ATGCATTGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTGGCCCTATCTTTCTATG
TTTCGCC**

SEQ. ID NO: 17 (modified human leptin signal peptide DNA)

**ATGCATTGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTGGCCCTATCTTTCTATG
TTTCGCCGCT**

SEQ. ID NO: 18 (modified human leptin signal peptide DNA)

**ATGCATTGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTGGCCCTATCTTTCTATG
TTTCGAACAGC**

SEQ. ID NO: 19 (native human tPA signal peptide DNA)

**ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGCTGCTGTGGAGCAGTCT
TCGTTTCGCCAGC**

SEQ. ID NO: 20 (native human tPA signal peptide DNA)

**ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGCTGCTGTGGAGCAGTCT
TCGTTTCGCC**

SEQ. ID NO: 21 (modified human tPA signal peptide DNA)

**ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGCTGCTGTGGAGCAGTCT
TCGTTTCGAACAGC**

SEQ. ID NO: 22 (modified human tPA signal peptide DNA)

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTTGCTGTGCTGCTGTGGAGCAGTCTCGTTT
TCGTTTCGCCCGCT

SEQ. ID NO: 23 (Leptin/tPA Signal peptide DNA)

ATGCATTGGGAACCTGTGCTGTGCTGCTGTGGAGCAGTCTTCGTTT
CGCCCAGC

SEQ. ID NO: 24 (Leptin/tPA signal peptide DNA)

ATGCATTGGGAACCTGTGCTGTGCTGCTGTGGAGCAGTCTTCGTTT
CGCCC

[0124] Man kann Signalsequenzen auswählen, für die bekannt ist, daß sie mit stark glykosilierten Proteinen verknüpft sind. Signalsequenzen, welche verwendet werden können, sind jene native von Erythropoietin, Factor VIII, Beta-Interferon, Serumalbumin, Insulin, von Willebrand Faktor, CD11 α , IgG, Follistatin, der intrinsische Faktor, G-CSF, Ceruloplasmin, LAMP-1, abgesonderte Hormone, Wachstumsfaktoren und andere Proteine, humane oder nicht-humane (wie zum Beispiel andere Primaten, Maus, Ratte oder andere Säugetiere), welche in eukaryotischen Zellen abgesondert werden. Für Hefezellen kann der Hefe α -Faktor und andere verwendet werden. Auch haben verschiedene andere Gene Leader-Sequenzen, welche die Sekretion von Proteinen in Säugetierzellsystemen erleichtern, wie zum Beispiel humanes Influenzavirus A, humanes Preproinsulin und Rinderwachstumshormon.

[0125] Man kann auch die Zusammensetzungen der Aminosäuren der Signalsequenzen auf der Basis von Versuch und Irrtum optimieren, um die Glykosilierungseffizienz zu verbessern und nicht natürlich vorkommende Signalsequenzen herstellen. Zum Beispiel kann man die Anzahl von hydrophoben Aminosäureresten erhöhen oder die Signalpeptidasespaltungsstellen verändern, um die Zeitdauer, welche das Protein in der Membran verbringt, zu erhöhen, um die Zeitdauer, in welcher das Protein der zellulären „Maschinerie“ ausgesetzt ist, welche die Glykosilierung bewerkstelligt, zu verlängern („Maschinerie“ ist ein Kurzschriftbegriff für jene Enzyme und andere Reste, welche die Glykosilierung innerhalb der Membranregion der Zelle durchführen).

[0126] Es ist auch gefunden worden, daß die Substitution einer bestehenden Spaltungsstelle (die Stelle am Carboxy-terminalen Ende eines Signalpeptids, an welcher das Signalpeptid enzymatisch abgespalten wird, um das reife Protein zu bilden) mit unterschiedlichen Spaltungsstellen Herstellungsvorteile verleihen kann, insbesondere in Säugetierzellsystemen und die Glykosilierungseffizienz erhöht. Bisher standen dem Fachmann in Bezug auf Signalpeptide veränderte Enzymspaltungsstellen von Prosequenzen (siehe unten) zur Verfügung.

[0127] Wie in den Ausführungsbeispielen unten gezeigt werden wird, hat die Verwendung des Signalpeptids des Gewebe-Plasminogenaktivators, um ein an drei Stellen glykosiliertes Leptinprotein zu exprimieren, eine höhere Glykosilierungseffizienz zur Folge, als die Verwendung des nativen humanen Leptin Signalpeptids. Es ist weiterhin gefunden worden, daß die Spaltungsstelle des tPA (Serin-Prolin-Serin) Signalpeptids, wenn sie in das native humane Leptin Signalpeptid substituiert worden ist, eine über die Verwendung des nicht modifizierten nativen humanen Leptin Signalpeptids verbesserte Glykosilierungseffizienz verleiht.

[0128] Für bestimmte Proteine kann die Stelle Serin-Asparagin-Serin („SNS“) funktionieren, um die Glykosilierungseffizienz zu verbessern. Zum Beispiel, wie hierin beschrieben, hat die Substitution der natürlichen humanen tPA Signalpeptidspaltungsstelle mit einer „SNS“-Stelle eine hohe Ausbeute von korrekt gespaltenen glykosilierten Leptinprotein zur Folge (welches Glykosilierungsstellen an den Positionen 2, 47, 69 und 92 hat). Andere Spaltungsstellen umfassen Serin-Prolin-Serin („SPS“), Serin-Asparagin-Serin („SNS“), Serin-Prolin („SP“) und Serin-Prolin-Alanin („SPA“). Eine neue Spaltungsstelle kann in jedes Signalpeptid durch bekannte Verfahren substituiert werden, einschließlich der ortspezifischen Mutagenese der kodierenden DNA, der DNA-Synthese und Veränderung der genomischen DNA innerhalb einer Zelle. Man kann es vorziehen ein Signalpeptid herzustellen, insbesondere ein Signalpeptid, welches nicht mit irgendeinem bekannten abgesonderten Protein verbunden gefunden wird, wie zum Beispiel natürliche Signalpeptide, und eine Spaltungsstelle wie oben einzufügen, um die Glykosilierungseffizienz zu optimieren oder maximieren.

[0129] Einige Spaltungsstellen, wie zum Beispiel die Serin-Prolin-Serin Spaltungsstelle des natürlichen humanen Gewebe-Plasminogenaktivators („tPA“), werden unvollständig von der N-terminalen Region des reifen Proteins gespalten. Auf diese Weise verbleibt ein Serinrest am N-Terminus des reifen Proteins, hierin als die -1 Position bezeichnet. Die vorliegende Erfindung umfaßt auch die vorliegenden Leptin glykosilierten Proteine, welche eine oder mehrere Aminosäurereste am N-Terminus der reifen Proteinsequenz haben, oder wahlweise

haben, wenn man es vorzieht, eine Testspaltungsstelle zu verwenden.

[0130] Die vorliegende Erfindung umfasst, noch spezifischer, auch glykosilierte Leptinproteine, welche ein Serin-, Arginin-, Prolin- oder Alaninrest an der -1 Position haben, ein Serin an der -1 Position und ein Prolin an der -2 Position, eine Serin-Prolin-Serin Sequenz an den -1, -2 und -3 Positionen, ein Serin an der -1 Position und ein Arginin an der -2 Position, ein Serin an der -1 Position, ein Arginin an der -2 Position und ein Serin an der -3 Position, ein Arginin an der -1 Position und ein Serin an der -2 Position; und ein Alanin an der -1 Position und Prolin an der -2 Position.

[0131] Darüber hinaus können Signalpeptid Spaltungsstellen vorhanden sein, welche einen Teil von dem reifen Protein spalten. Auf diese Weise, wie oben angezeigt, umfaßt die vorliegende Erfindung verkürzte Formen des glykosilierten Leptinproteins, wie zum Beispiel jenen, welchen bis zu und einschließlich fünf Aminosäurenreste von dem N-Terminus des reifen Proteins entfernt worden ist, wie zum Beispiel ein Leptinprotein der SEQ ID NO: 1 oder 2, welche die Testglykosilierungsstellen haben.

[0132] Daher bezieht sich die folgende Erfindung auch auf ein verbessertes Verfahren zur Herstellung eines glykosilierten Proteins umfassend:

- (a) Kultivieren einer Wirtszelle unter geeigneten Bedingungen für die Expression und Glykosilierung, die eine DNA-Sequenz enthält, die in 5' nach 3' Richtung (i) ein Signalpeptid kodiert, und (ii) eine DNA, die für ein glykosiliertes Protein kodiert; und
- (b) Erhalten des besagten glykosilierten Proteins, wobei die besagte Verbesserung die Verwendung eines Signalpeptids umfaßt, welches eine Peptidasespaltungsstelle hat, die für die Glykosilierungseffizienz optimiert wurde.

[0133] Die nicht natürlich vorkommende Spaltungsstelle kann ausgewählt sein unter SPS, SP, SNS und SPA. Die wie in der Beschreibung dargestellten Signalpeptide und glykosilierten Leptinproteine, einschließlich der Ausführungsbeispiele, sind veranschaulichend, obwohl diese Verfahren und Zusammensetzungen auf eine Vielzahl von Proteinen anwendbar sind, welche vorgesehen sind, durch eine eukaryotische Zelle abgesondert und/oder glykosiliert zu werden. Solche Proteine umfassen, sind aber nicht limitiert auf den Gewebe Plasminogen Aktivator, Faktor VIII und andere Blutgerinnungsfaktoren, Erythropoietin und Analoge davon und andere glykosilierte Proteine.

[0134] Es ist auch gefunden worden, daß, in Verbindung mit der Verwendung der nativen Leptin-Leader-Sequenz, die Verwendung einer „Prosequenz“ auch die Glykosilierungseffizienz verbessern kann. Eine „Prosequenz“ ist eine Aminosäuresequenz, die optimalerweise das Motiv R-X-R/K-R hat, wobei „X“ jede Aminosäure ist (und die Ein-Buchstaben-Abkürzungen sind jene, die üblicherweise verwendet werden, siehe infra). Die Prosequenz ist mit Furin-ähnlichen Proteasen spaltbar (nach dem finalen R), die normalerweise in CHO Zellen vorhanden sind. Watanabe et al., FEBS letters, 320: 215–218 (1993) (hierin durch Bezugnahme aufgenommen). Es ist gezeigt worden, daß die Fähigkeit von CHO Zellen, solche Prosequenzen zu spalten, verbessert werden kann, wenn Furin-Expressionsplasmide in die Zellen transfiziert werden. Yanagita et al., Endocrinology 133: 639–644 (1993) (hierin durch Bezugnahme aufgenommen). Zum Beispiel beginnt die reife humane Leptinsequenz mit einem Valin, welches auf die Entfernung der Prosequenz durch Furin Auswirkungen hat. Eine bessere Entfernung der Prosequenz kann durch einen Austausch dieses Valins durch eine noch bevorzugtere Aminosäure erreicht werden, wie zum Beispiel Serin oder Alanin, oder durch Insertion solch einer Aminosäure vor dem Valin (durch z.B. ortspezifisch gerichtete Mutagenese oder andere Verfahren, welche jenen auf dem Fachgebiet verfügbar sind). Daher umfassen die vorliegenden Verfahren optional auch die Verwendung von solchen Prosequenzen in Verbindung mit dem natürlichen Leptin Signalpeptid oder mit anderen Signalpeptiden.

[0135] Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Zusammensetzungen, wie zum Beispiel Nukleinsäuren, Vektoren und Wirtszellen, wie zum Beispiel jene, die oben rezipiert wurden und hierin durch Referenz aufgenommen worden sind, welche Nukleinsäuren umfassen, die die vorliegenden veränderten Signalpeptide und/oder Prosequenzen kodieren.

Beispiele

[0136] Die folgenden Beispiele werden geboten, um die Erfindung noch vollständiger darzustellen, sind aber nicht als Einschränkung des Umfangs davon auszulegen.

[0137] Beispiel 1 zeigt die Messung des Stokes Radius von verschiedenen glykosilierten Leptinen.

[0138] Beispiel 2 zeigt die biologische in vivo Aktivität eines einfach (an einer Stelle) glykosilierten Leptins, bezeichnet als „N48T50“. Dieses Beispiel zeigt, daß dieses glykosilierte Leptin eine Aktivität hat, die zumindest gleich dem von nativem rekombinantern humanen Leptin ist, welches keine Glykosilierung aufweist.

[0139] Beispiel 3 zeigt die biologische in vitro Aktivität eines an einer zusätzlichen Stelle glykosilierten Leptins.

[0140] Beispiel 4 zeigt die biologische in vitro Aktivität eines zweifach (an zwei Stellen) glykosilierten Leptinproteins im Hinblick auf Rezeptor-Bindungssassays.

[0141] Beispiel 5 zeigt den Effekt der Verwendung eines Threoninrestes, eher als eines Serinrestes in der Glykosilierungs-Konsensussequenz auf die Glykosilierungseffizienz.

[0142] Beispiel 6 zeigt, daß die Aminosäuren, die an die Konsensussequenz angrenzen, die Glykosilierungseffizienz beeinflussen.

[0143] Beispiel 7 zeigt, daß ein dreifach (an drei Stellen) glykosiliertes Leptinprotein eine wesentlich längere systemische Zirkulationszeit hat, als ein nicht glykosiliertes Leptin.

[0144] Beispiel 8 zeigt in ob/ob-Mäusen, daß ein dreifach (an drei Stellen) glykosiliertes Leptinprotein im Vergleich zu nicht glykosiertem Leptin eine verbesserte biologische Aktivität hinsichtlich des Gewichtsverlustes hat.

[0145] Beispiel 9 zeigt in ob/ob-Mäusen, daß ein dreifach (an drei Stellen) glykosiliertes Leptinprotein im Vergleich zu nicht glykosiertem Leptin eine verbesserte biologische Aktivität hinsichtlich der Appetitzügelung hat.

[0146] Beispiel 10 zeigt in ob/ob-Mäusen, daß die intermittierende Verabreichung von einem dreifach (an drei Stellen) glykosiertem Leptin im Vergleich zu nicht glykosiertem Leptin eine verbesserte biologische Aktivität in Bezug auf den Gewichtsverlust hat.

[0147] Beispiel 11 stellt zusätzliche Dosierungs-Wirkungs Studien unter Verwendung eines dreifach (an drei Stellen) glykosilierten Leptins in Wildtyp Tieren zur Verfügung, beweisend, daß eine weit geringere Dosierung des an drei Stellen glykosilierten Leptins einen beträchtlichen Gewichtsverlust im Vergleich zu nicht glykosiertem Leptin zur Folge hat.

[0148] Beispiel 12 stellt Dosierungs frequenz Studien unter Verwendung von einem an drei Stellen glykosiertem Leptin in einer Wildtyp Maus zur Verfügung, und zeigt, daß ein an drei Stellen glykosiliertes Leptin weniger häufig dosiert werden kann, als ein nicht glykosiertes Leptin, um die gleiche Gewichtsverlust Reaktion der Tiere zu erhalten.

[0149] Beispiel 13 stellt zusätzliche Leptinproteine mit multiplen Glykosilierungsstellen dar, und Daten der biologischen in vitro Aktivität.

[0150] Beispiel 14 stellt die Expression und Glykosilierungseffizienz eines an drei Stellen glykosilierten Leptinproteins unter Verwendung einer Vielzahl von Signalpeptiden und anderen Sequenzen, welche die Glykosilierung oder die Ausbeute beeinflussen, dar.

[0151] Beispiel 15 stellt zusätzliche Expressionsdaten einer Vielzahl von Leptinproteinen mit multiplen Glykosilierungsstellen dar, in denen verschiedene Signalpeptide und andere Sequenzen, welche die Glykosilierung oder Ausbeute beeinflussen, verwendet werden.

[0152] Referenzbeispiele der hierin verwendeten Verfahren folgen.

Beispiel 1

Stokes Radius verschiedener Leptine

[0153] Die vorliegenden Beispiele zeigen, daß verschiedene Leptine unterschiedliche Stokes Radii haben, wie durch Gelfiltration bestimmt worden ist. Das vorliegende Beispiel zeigt auch die Steigung der Gelfiltrations-

methode für die Bestimmung des Stokes Radius eines einzelnen glykosierten Leptinproteins, denn wenn wiederholte Messungen vorgenommen werden, variieren die Messungen weniger als 2 Å.

Methoden:

[0154] Die Gelfiltrationsexperimente sind in einem Pharmacia FPLC-System durchgeführt worden, welches mit einem Unicorn Controller für die Systemkontrolle, Datenakquisition und Analyse, einem UV-1-Detektor und einem 280 nm-Filter ausgestattet war. Die Separation ist bei 4°C und einer Flußrate von 0,25 ml/min auf einer SuperDex 200 (HR10/30)-Säule durchgeführt worden, welche mit Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline äquilibriert war. Die Proteinproben, welche in Elutionspuffer gelöst waren, sind in einem Volumen von 0,25-ml aufgetragen worden, enthaltend 0,1 A280, wie durch ein Hewlett Packard Modell 8435 Spectrophotometer bestimmt worden ist.

[0155] Die Standardproteine, welche in dem Pharmacia Gelfiltrationskalibrationskits vorgefunden wurden, sowohl mit einem hohen Molekulargewicht als auch mit einem Niedermolekulargewicht, sind, wie vom Hersteller empfohlen verwendet worden, um die Säulen zu kalibrieren. (Wie vom Hersteller empfohlen wurde, wurde Catalase nicht als Standard verwendet). Zusätzliche Standards, einschließlich humanes Transferrin (36 Å), Soja Trypsin-Inhibitor (22 Å), Pferdemuskelmyoglobin (19 Å) sind von Sigma Chemicals gekauft worden. Blue Dextran (Pharmacia Gel Filtration Calibration Kit) ist verwendet worden, um das Hohlraumvolumen zu definieren. Die Werte für den Stokes Radius (Rs) für jedes der verschiedenen Leptinformen sind von einer graphischen Darstellung von $\sqrt{-\log(Kav)}$ vs Rs bestimmt worden, wobei $Kav = (Ve - Vo)/Vt - Vo$ und Ve ist das Elutionsvolumen des Proteins ist, Vo das Hohlraumvolumen ist und Vt das Gesamtladevolumen der Säule ist.

Ergebnisse:

[0156] Indem die obigen Methoden und SuperDex 200™ als Gelfiltrationsmaterial verwendet wurden, sind die folgenden Stokes Radii für rHu-Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1, unten) bestimmt worden, welche die folgenden Glykosilierungsstellen haben:

Tabelle 1.1: Stokes Radius der verschiedenen Leptine

rmetHu-Leptin 1-146	18,1Å
rHu-Leptin 1-146 N48T50	23Å
rHu-Leptin 1-146 N33T35	24Å
rHu-Leptin 1-146 N47, 69, 102	31,9Å
rHu-Leptin N47, 69, 102	32,3Å

[0157] Wie daraus ersichtlich ist, hat eine Population von an drei Stellen glykosilierten Leptinprotein Molekülen einen Stokes Radius von mehr als 30 Å, wie durch die Gelfiltration bestimmt worden ist. Der durchschnittliche Stokes Radius ((31,9 + 32,3)/2) ist 32,1 Å. Die vorliegende Gelfiltrationsmethode zeigt weiterhin eine Stetigkeit bis einem Angström. Zum Vergleich, das gleiche glykosierte Leptinprotein hatte einen Stokes Radius von 31,2 Å, wenn dieser durch die Sedimentationsgeschwindigkeit bestimmt worden ist (unter Verwendung von Standardmethoden, die hier nicht beschrieben worden sind).

[0158] Das unglykosulierte Leptinprotein (rmetHu-Leptin), als auch die zwei an einer Stelle glykosilierten Leptinproteine, hatten Stokes Radii von weniger als 30 Å. Wie in den nachstehenden Ausführungsbeispielen gezeigt werden wird, hatte das N48T50 glykosulierte Leptinprotein eine biologische Aktivität, die der vergleichbar ist von rmetHu-Leptin. Das an drei Stellen glykosulierte Protein (47, 69, 102) hatte eine deutlich verbesserte biologische Aktivität in Hinblick auf eine erhöhte Zirkulationszeit (und daher eine erhöhte *in vivo* Exposition durch das Arzneimittel). Das veranschaulicht das Prinzip, daß die Vergrößerung der effektiven Größe (hier als Stokes Radius ausgedrückt) die Zirkulationsdauer durch Abnahme der Filtrierbarkeit und den endgültigen Abbau in der Niere verlängert.

Beispiel 2

Die biologische in vivo Aktivität und Serumzirkulationsdauer eines an einer Stelle glykosilierten Leptins, N48T50

[0159] Dieses Beispiel zeigt, daß ein an einer Stelle glykosiliertes Leptin eine biologische Aktivität annährend gleich oder moderat verbessert der von rmetHu-Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1) hat. Die Glykosilierung hat nicht die Aktivität behindert oder die Rezeptorbindung verhindert. Ferner wird dort veranschaulicht, daß die Serumzirkulationsdauer eines an einer Stelle glykosilierten Leptins die gleiche, oder bescheiden länger ist als die von rmetHu-Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1).

[0160] Den Tieren ist das an einer Stelle glykosilierte Leptin oder rmetHu-Leptin in der gleichen Dosis täglich 7 Tage lang verabreicht worden. Am Ende der 7 Tage sind die Tiere getötet worden und der Fettgehalt ist bestimmt worden. Im Vergleich zu rmetHu-Leptin hatte die Verabreichung des an einer Stelle glykosilierten Leptins einen 25%igen zusätzlichen Fettverlust zur Folge. Das zeigt, daß die vorliegenden glykosilierten Leptin Zusammensetzungen, welche eine nicht natürlich vorkommende Glykosilierungsstelle haben, die biologische Aktivität beibehalten.

Methoden:

1. Verwendete Leptin Zusammensetzungen.

[0161] Dieses glykosilierte Leptin, „N48T50“ hatte die Aminosäuresequenz des nativen humanen Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1), wobei das Isoleucin („I“) an Position 48 mit Asparagin („N“) substituiert war, und die nächsten zwei Aminosäuren (Leucin („L“) und Threonin („T“)) ohne Substitution verblieben. Für die täglichen Dosierungsgruppen (100 µl Injektionsvolumen für alle): 0,2 mg/ml für die 1 mg/kg Dosisgruppe, 2,0 mg/ml für die 10 mg/kg Dosisgruppe. Für die nur-am Tag-0 Dosierungsgruppen: 5 mg/ml Konzentration, 400 µl injiziert, 100 mg/kg Dosis.

2. Tiere:

Anzahl und Typ.

5 weibliche C57BL/6 Mäuse, von Charles River Laboratories (Wilmington, MA)

Alter und Gewicht:

[0162] Die Tiere waren 8 bis 10 Wochen alt und jedes wog annähernd 20 g.

3. Verabreichung.

[0163] Zu Beginn jeder Studie sind die Mäuse gewogen worden und dann mit einer Probe im Bolus subkutan injiziert worden.

Wiegen:

[0164] Die Gewichtsgrundlinie ist für Tiere bestimmt worden, welchen ermöglicht worden war, in den Tieranlagen 1 Woche vor der Studie zu akklimatisieren. Die Gewichtsgrundlinie ist kurz vor Erhalt der ersten Dosis bestimmt worden. Die Gewichte sind täglich während der ganzen Studie überwacht worden. Nachdem die endgültigen Gewichte verzeichnet worden sind, sind die Tiere getötet worden und die Menge an abdominalem Fett wurde von 0 bis 3 eingestuft, wobei 0 kein verbleibendes sichtbares Fett bedeutet und ein Score von 3 die Menge an sichtbarem Fett in normalen Tieren wiedergibt.

Ergebnisse:

[0165] Mäuse, die täglich mit rmetHu-Leptin (1–146), welches in E. Coli exprimiert wurde, behandelt worden sind, verloren relativ zur Pufferkontrolle Gewicht, wie in [Fig. 1](#) gezeigt. Überraschenderweise verloren auch die mit dem glykosilierten Leptin (N48T50 Leptin) behandelten Mäuse Gewicht. Die Höhe des Gewichtsverlusts nahm mit Erhöhung der Dosis (1 mg/kg und 10 mg/kg) bei beiden Formen von Leptinen zu. Wenn einzelne Injektionen von 100 µg/kg durchgeführt worden sind, verloren die mit dem glykosilierten Leptin behandelten

Mäuse mehr Gewicht, als die mit rmetHu-Leptin (1–146) behandelten Mäuse. Darüber hinaus dauert der Gewichtsverlust bei den mit dem glykosilierten Leptin behandelten Mäusen länger an, als bei rmetHu-Leptin behandelten Mäusen. Die optische Untersuchung von rmetHu-Leptin und N48T50 Leptin behandelten Mäusen zeigte, daß Mäuse, die mit beiden Formen von Leptin behandelt worden sind, erniedrigte Mengen an abdominalem Fett hatten und, daß die Menge an abdominalem Fett mit erhöhter Dosis reduziert war. Das weist darauf hin, daß das glykosilierte Leptin wirksam in der Reduktion des Fettgehalts ist und weniger häufig als unglykosiliertes rmetHu-Leptin verabreicht werden kann.

Pharmacokinetische Studien eines an einer Stelle glykosilierten Leptins

[0166] Diese Studie zeigt, daß die intravenöse Verabreichung eines an einer Stelle glykosilierten Leptins eine längere Halbwertszeit hat, als nicht glykosiliertes Leptin. Bei der subkutanen Verabreichung war die Zirkulationsdauer für beide, das glykosilierte und nicht glykosilierte Leptin, gleich.

Materialien:

1. Leptin.

[0167] Ein an, wie oben, einer Stelle glykosiliertes Leptin (Stellen N48T50) wurde verwendet, zu 10 mg/ml in Dubleccos's Phosphat-gepufferter Saline, ohne Kalziumchlorid, ohne Magnesiumchlorid, formuliert. Rekombinante Methionyl humanes Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1 mit einem Methionylrest an Position –1), exprimiert in E. Coli, wurde als Kontrolle verwendet, zu 2,0 mg/ml in Puffer formuliert.

2. Tiere.

Verwendete Anzahl/Typ:

32 (für glykosiliertes Leptinprotein) und 81 (für r-metHu-Leptin) männliche CD-1 Mäuse (Charles River Laboratories, Hollister, CA)

Alter/Gewicht:

[0168] Die Tiere waren ungefähr 6–9 Wochen alt und wogen ungefähr 30 Gramm.

Behandlung/Handhabung:

[0169] Die Tiere wurden einzeln gehalten und mit einer Diät eines Labornagetierzitters ad libitum gefüttert. Alle Tiere wurden in Übereinstimmung mit guten Tierhaltungspraktiken behandelt.

3. Verabreichung.

[0170] Den Tieren wurde glykosiliertes Leptin in einer Dosis von 1,0 mg/kg Körpergewicht intravenös (IV) oder subkutan (SC) injiziert.

4. Probenentnahme.

[0171] Die Tiere sind anästhesiert worden und Blutproben sind unter Verwendung von Standard-Herpunktions Techniken zu vorgesehenen Zeitpunkten gesammelt worden. Die Serumkonzentration von glykosiliertem Leptin sind unter Verwendung eines Immunoassays bestimmt worden (wie nachstehend beschrieben).

5. Vergleich.

[0172] Die Daten der Zirkulationszeit sind mit zuvor erhobenen Daten für rmetHu-Leptin, in gleicher Dosis, in ähnlich großen Tieren, unter Verwendung der gleichen Routen der Verabreichung, verglichen worden.

Ergebnisse:

[0173] Die Tabelle 2.1 zeigt die pharmacokinetischen Parameter von glykosiliertem Leptin und rmetHu-Leptin in Mäusen. Beim Vergleich der IV Daten zeigt glykosiliertes Leptin eine geringere systemische Clearance (500 ml/h/kg vs. 676 ml/h/kg) und eine längere terminale Halbwertszeit (1,24 h vs. 0,733 h). Die Verteilungs-Mengen

im Steady-state (V_{ss}) waren zwischen glykosiliertem Leptin und rmetHu-Leptin ähnlich. Diese Daten weisen darauf hin, daß das glykosulierte Leptin langsamer aus dem Körperkreislauf entfernt worden ist, als rmetHu-Leptin, dadurch die Halbwertszeit und die Exposition (AUC-Schätzungen von 2000 ng·h/ml vs. 1480 ng·h/ml) erhöht war. Im Anschluß an die SC Dosis sind zwischen glykosiliertem Leptin und rmetHu-Leptin (1230 ng/ml vs. 1380 ng/ml) ähnliche Peak Serumkonzentrationen (C_{max}) erhalten worden, obwohl eine Verzögerung der Peakzeit (t_{max}) für glykosiliertes Leptin vorhanden war. Ähnliche Expositionsschätzungen (basierend auf AUC) sind für beide Moleküle erhalten worden. Die subkutane Bioverfügbarkeit war annähernd 60,5% glykosiliertes Leptin vs. 79,6% für rmetHu-Leptin.

Tabelle 2.1

Pharmacokinetische Parameter des glykosulierten Leptins (N48, T50) und rmetHu-Leptin nach IV- und SC-Verabreichung

	Glykosuliertes Leptin	Leptin	Ratio (glykosuliertes Leptin/Leptin)
<u>SC-Dosis</u>			
t_{max} (h)	0,5	0,167	---
C_{max} (ng/mL)	1230	1380	0,89
AUC (ng·h/mL)	1210	1180	1,03
$t_{1/2, lz}$ (h)	0,552	0,541	0,96
F (%Dosis)	60,5	79,6	0,760
<u>IV-Dosis</u>			
AUC (ng·h/mL)	2000	1480	1,35
$t_{1/2, lz}$ (h)	1,24	0,733	1,69
CL (mL/h/kg)	500	676	0,74
V_{ss} (mL/kg)	149	150	0,99

Beispiel 3

Die biologische in vitro Aktivität von anderen an einer Stelle glykosulierten Leptinen

[0174] In Tabelle 3.1, unten, basiert die Lokalisierung der Aminosäuresequenz für die Änderung, um eine Glykosulierungsstelle einzufügen, auf der Numerierung von SEQ ID NO: 1 oben, welche rHu-Leptin ist.

[0175] Das Protein ist wie in den nachstehenden Referenzbeispielen exprimiert worden, in dem das natürliche humane Leptin Signalpeptid und COS Zellen verwendet wurden. Die Expressionsprodukte sind dann vier Arten von Analysen unterworfen worden (die verwendeten Methoden sind nachfolgend beschrieben):

1. Expression relativ zum Wildtyp.

[0176] Die Ausbeute an Protein ist bezüglich zu rHu-Leptin 1–146 verglichen worden, wie es in COS Zellen exprimiert wurde. Der Menge an rHu-Leptin 1–146 wurde die Zahl von „1,00“ unter den unten definierten Bedingungen zugewiesen.

2. Prozentglykosulierung.

[0177] Die Menge an vollständig glykosuliertem Protein ist als Prozent von Gesamt-Leptinprotein durch visuelle Untersuchung eines Western Blots, wie unten beschrieben, bestimmt worden.

3. Bindung, Leptin-R, relativ zum Wildtyp.

[0178] In einem in vitro Kompetitionsassay ist unter Verwendung einer Aufbereitung eines Leptinrezeptors die Strenge der Bindung der hergestellten radio-markierten glykosilierten Leptinproteine an den Leptinrezeptor mit radio-markiertem rHu-Leptin 1–146 gemäß der nachstehend beschriebenen Methoden verglichen worden.

4. In vitro Bioaktivität relativ zum Wildtyp.

[0179] In einem in vitro Assay, welcher einen chimären Leptinrezeptor verwendet, wie unten beschrieben, sind hergestellte glykosilierte Leptinproteine mit rHu-Leptin 1–146 gemäß der nachstehend beschriebenen Methode verglichen worden. „ND“ bedeutet, daß die Daten nicht verfügbar sind, da die Experimente nicht gemacht worden sind.

Tabelle 3.1

Zusammenfassung der COS Expression des an einer Stelle glykosylierten Proteins, der Bindung und die Glykosylierungsergebnisse					
Position der N-Glykosilierung 1/	Sequenzänderungen	Expression rel. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
keine	Wildtyp	1	0	1	1
4	QKV > NKV	1,7	0	1,7	0,73
5	KVQ > NVT	0,33	65	1,7	0,05
7	QDD > NDT	0,55	5	1,25	0,04
8	DDT > NDT	1,1	15	1,2	1,2
23a	DIS > NIT	7,8	60	ND	0,53
23b	DIS > NIS	ND	ND	ND	ND
25	SHT > NHT	0,13	80	0,4	0,02
26	HTQ > NTT	1,1	70	1,5	0,01
27	TQS > NQT	0,45	30	0,7	0,13
29	SVS > NVT	0,5	70	0,6	0,5
33	KQK > NQT	1,6	95	0,9	0,04
35	KVT > NVT	0,55	95	0,5	0,13

37	TGL > NGT	1,4	95	0,4	0,043
38	GLD > NLT	0,26	45	0,2	0,036
43	PGL > NGT	1,6	85	1,5	0,014
44	GLH > NLT	1,8	10	2	0,78
45	CHP > NHT	0,52	85	0,5	0,08
46	HPI > NPT	1,4	0	0,11	0,27
47	PIL > NIT	1,06	80	0,66	0,84
48	ILT > NLT	0,92	50	0,8	0,53
67	SMP > NMT	1,1	15	0,8	0,52
68	MPS > NAT	0,5	80	0,8	0,036
69	PSR > NST	0,8	75	0,6	1,1
70	SRN > NRT	1,07	10	1	1
71	RNV > NNT	1,84	60	1,9	0,3
72	NVI > NVT	1,4	70	1,7	0,26
73	VIQ > NIT	0,53	45	8	0,01
ESP77*	SND > NNT	0,14	10	2,2	<0,02
92	FSK > NST	4,8	45	ND	0,67
93	SKS > NKT	2,4	5	ND	1,1
97	HLP > NLT	2,6	10	ND	1,1
99	PWA > NWT	0,45	0	0,9	0,5
100a	PWAS > SNAT	0,43	35	0,6	0,9
100b	WAS > NAS	1,2	0	0,7	1,46
100c	WAS > NAT	0,5	20	0,45	0,81
100d	PWAS > ANAT	2,3	35	1,45	0,26
100e	WAS > TAS	1	60 (O- verknüpft)	> 1,9	0,83
101	ASG > NST	0,59	50	0,7	0,33
102	SGL > NGT	0,79	60	0,6	0,85
103	GLE > NLT	1,6	55	1	0,73
115	EAS > NAT	1,1	70	0,9	0,006
116	ASG > NST	1,1	0	0,9	0,56
117	SGY > NGT	1,33	50	1,9	0,01

118	GY S > NYT	1,44	15	0,8	3,8
119	YST > NST	0,61	70	0,8	0,02
120	STE > NTT	0,9	100	0,7	0,01
141	DLS > NLT	0,18	0	0,3	1

* ESP77 zeigt eine Glykosylierungsstelle an der Position 77 an und die Expression unter Verwendung des Signalpeptids von Erythropoietin, wie in näheren Einzelheiten infra beschrieben wurde
 Die 1/„Position“ zeigt die Aminosäureposition gemäß SEQ ID NO: 1 an, welche rHu-Leptin 1–146 ist. Die jeweilige aufgelistete Sequenz (z.B. „53“, „55“, etc.) zeigt die „N“-Position in der Konsensus-Glykosilierungssequenz von „N-X-S/T“ an.

Ergebnisse:

[0180] Wie ersichtlich ist, zeigen, im Vergleich von hergestellten, an einer Stelle glykosilierte Leptinproteine zu unglykosuliertem Leptin, die meisten an einer Stelle glykosulierten Leptinproteine eine erhebliche Zunahme in der biologischen Aktivität, wie durch die hierin verwendeten *in vitro* Assays bestimmt wurde, außer das Protein mit einer Glykosylierungsstelle an Position 118, welches den Anschein hat, eine erhöhte Aktivität zu haben. Einige dieser Analoge sind in normalen oder höheren Mengen ausgeschieden worden und die meisten hatten eine Rezeptorbindungsaktivität vergleichbar der von rHu-Leptin 1–146, welches in der gleichen Art und Weise exprimiert und analysiert wurde. Überraschenderweise hatten einige der glykosulierten Leptinproteine eine geringe biologische *in vitro* Aktivität, auch wenn sie die Rezeptorbindungsaktivität beibehielten. Somit konnten die glykosulierten Leptinproteine in zwei Klassen geteilt werden, in Anlehnung daran, ob sie eine *in vitro* biologische Aktivität beibehielten oder nicht. Die glykosulierten Leptinproteine, welche eine nur geringe biologische *in vitro* Aktivität hatten, können Leptinantagonisten sein.

Beispiel 4

Biologische *in vitro* Aktivität von an zwei Stellen glykosulierten Leptinen

[0181] Wie in Tabelle 4.1 dargestellt, sind auch verschiedene an zwei Stellen glykosulerte Leptinproteine hergestellt worden und wie die Ein-Stellen-Proteine oben getestet worden. Bezeichnungen und Abkürzungen sind die gleichen, wie jene für Tabelle 3.1 für die Ein-Stellen-Proteine.

[0182] Die Glykosylierungsbezeichnungen weisen auf ungefähren Prozente des Materials hin, welches eine Kette oder zwei Ketten hat, wie durch die optische Untersuchung eines Western Blots, wie nachstehend beschrieben, bestimmt wurde. Zum Beispiel für das glykosulierte Leptinprotein 25 + 29, hat 50% des Materials eine Kette und 5% des Materials hat zwei Ketten.

Tabelle 4.1

Zusammenfassung der COS Leptin Zwei-Stellen Expression, Bindung und Glykosylierungsergebnisse				
Position der N-Glykosilierung	Expression rel. zum WT	Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
keine	1	0	1	1
25+29	1	1'-50,2'-5	1	ND
25+33	1,2	1'-40,2'-60	1,6	ND
25+35	1,2	1'-70,2'-10	1	ND
26+33	0,46	ND	1,6	ND
26+35	0,59	1'-45,2'-35	1	ND
27+33	0,93	1'-60,2'-30	1	ND
27+35	1,1	1'-50,2'-40	0,7	ND
29+33	1,6	1'-50,2'-45	1,4	ND
29+35	0,33	1'-33,2'-33	0,6	ND
33+48	0,86	1'-35,2'-60	0,6	ND
33+120	0,27	1'-5,2'-95	0,89	<0,003
35+48	0,46	1'-30,2'-40	0,6	ND
47+69	1,3	1'-10,2'-50	1	0,69
47+102	2,7	1'-50,2'-30	0,86	0,42
48+69	1,63	1'-20,2'-50	0,87	0,81
69+101	1,2	1'-45,2'-20	0,42	0,66
69+102	1,7	1'-40,2'-30	0,5	0,63
69+103	2,6	1'-50,2'-15	1,7	0,67
69+118	2,9	1'-50,2'-5	2,2	2,3
102+100e	1,8	2'-60	0,62	0,97

[0183] Viele glykosilierte Leptinproteine, welche Kombinationen von zwei glykosilierten Stellen umfassen, können hergestellt werden, die eine Rezeptorbindung beibehalten und eine biologische Aktivität aufweisen.

Beispiel 5

Verbesserung der Glykosilierungseffizienz, indem eher ein Threonin als ein Serin in der Konsensussequenz verwendet wird

[0184] Dieses Beispiel zeigt, daß die Glykosilierungsstelleneffizienz verbessert wird, indem eher ein Threonin als ein Serin in der Glykosilierungskonsensussequenz verwendet wird. In diesem Beispiel basieren alle Ortsangaben der Aminosäuresequenz für die Änderungen, um Glykosilierungsstellen einzufügen, auf der Numerierung von SEQ ID NO: 1, welche rHu-Leptin 1–146 ist.

[0185] Glykosilierte Leptinproteine sind konstruiert, exprimiert und analysiert worden, indem die Verfahren der nachstehenden Referenzbeispiele verwendet wurden. Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) gezeigt. Die Einfügung einer einzelnen Glykosilierungsstelle durch die Doppelsubstitution W100, S102 zu N100, T102 hat die Hinzufü-

gung eines N-verknüpften Kohlenhydrates zur Folge, und der Anteil von Molekülen, welche Kohlenhydrate enthalten (durch SDS PAGE wie durch Western Blot bestimmt), war erheblich größer als mit einer W100, S102 zu N100, S102 Substitution. Das weist darauf hin, daß mehr Proteinmoleküle, welche ein Threonin in der Konsensussequenz haben, glykosiliert worden sind, als jene, welche ein Serin in der Konsensussequenz haben. Somit ist die Glykosilierungseffizienz in diesem Expressionssystem höher, indem eher die Konsensussequenz Asn-Xxx-Thr als Asn-Xxx-Ser verwendet wird. Somit ist die Verwendung von einem Threoninrest bevorzugt.

Beispiel 6

Die Glykosilierungseffizienz wird durch Upstream-Sequenzen beeinflußt

[0186] Dieses Beispiel zeigt, daß die Glykosilierungseffizienz sowohl durch die Aminosäure in der –1 Position (relativ zu dem substituierten Asparaginrest), als auch durch die Substitution eines Prolins unmittelbar „upstream“ (d.h., in Richtung des N-Terminus) von dem Asparaginrest in der Konsensussequenz beeinflußt wird.

[0187] Es wurde gefunden, daß rHu-Leptin 1–146 mit Änderungen von: S99, N100, S102 noch effizienter glykosiliert wurde, als mit den gleichen Änderungen, welchen die Substitution des Serins an Position 99 fehlte. Dies weist darauf hin, daß Substitutionen rund um die Konsensusglykosilierungsstelle eine zusätzliche Verbesserung der Belegung der Glykosilierungsstellen zur Folge haben kann.

[0188] Darüber hinaus, und überraschenderweise, hatte eine W100 zu T100 Substitution eine O-Glykosilierung des Leptins vermutlich an Position 100 zur Folge. Das weist darauf hin, daß entweder O-verknüpfte oder N-verknüpfe Kohlenhydrate an die gleiche Position gefügt werden können, in Abhängigkeit von der jeweiligen Substitution, die gemacht wird. [Fig. 2](#) ist ein Western Blot, welcher die N-verknüpfe Glykosilierungsstelle mit der O-verknüpften Glykosilierungsstelle, wie angezeigt, vergleicht. Wie dem entnommen werden kann, hat die Verwendung der Sequenz „TAS“ wie angezeigt (in Bezug auf SEQ ID NO: 1) eine O-verknüpfe Glykosilierung zur Folge.

Beispiel 7

Verbesserte systemische Zirkulationsdauer eines an drei Stellen glykosilierten Leptins

[0189] Dieses Beispiel zeigt, daß ein glykosiliertes Leptin, welches mehr als eine Glykosilierungsstelle hat, eine Zirkulationsdauer hat, welche erheblich länger ist, als die von nicht glykosiliertem rekombinantem humanen Leptin. Wie gesehen werden kann, zeigt glykosiliertes Leptin im Vergleich zu rmetHu-Leptin eine 4- bis 5-fache Abnahme der systemischen Clearance und eine Erhöhung der Halbwertszeit. Obwohl eine geringe Abnahme in der subkutanen Bioverfügbarkeit (ungefähr 10% Abnahme im Vergleich zu nicht glykosiliertem) vorhanden war, hatte glykosiliertes Leptin dennoch eine höhere Arzneimittelexposition im Anschluß an eine subkutane Dosierung zur Folge.

Materialien:

1. Leptin.

[0190] Ein an drei Stellen glykosiliertes Leptin, das wie nachstehend präpariert worden ist (Stellen 47, 69 und 102, SEQ ID NO: 32) ist verwendet worden, zu 1,76 mg/ml in Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline, ohne Kalziumchlorid, ohne Magnesiumchlorid (Gibco) formuliert. Rekombinantes Methionyl humanes Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1 mit einem Methionylrest an Position –1), exprimiert in E. Coli, ist als Kontrolle verwendet worden, zu 2,0 mg/ml in Puffer formuliert.

2. Tiere.

Verwendete Anzahl/Art:

27 (für glykosiliertes Leptinprotein) und 81 (für r-metHu-Leptin) männliche CD-1 Mäuse (Charles River Laboratories, Hollister, CA)

Alter/Gewicht:

[0191] Die Tiere waren ungefähr 6 bis 9 Wochen alt und wogen ungefähr 30 Gramm.

Haltung/Handhabung:

[0192] Die Tiere sind einzeln gehalten worden und mit einer Diät mit Labornagetierfutter ad libitum gefüttert worden. Alle Tiere sind in Übereinstimmung mit guten Tierhandhabungspraktiken gehandhabt worden.

3. Verabreichung.

[0193] Den Tieren ist glykosiliertes Leptin in einer Dosis von 1,0 mg/kg Körpergewicht intravenös (IV) oder subkutan (SC) injiziert worden.

4. Probenentnahme.

[0194] Die Tiere sind anästhesiert worden, Blutproben sind an bestimmten Zeitpunkten unter Verwendung von Standard-Herzpunktionen Techniken gesammelt worden. Die Serumkonzentrationen von glykosiliertem Leptin sind unter Verwendung eines Immunoassays (wie unten beschrieben) bestimmt worden.

5. Vergleich.

[0195] Die Daten der Zirkulationszeit sind mit zuvor erhaltenen Daten für rmet-Hu-Leptin, in gleicher Dosis, in ähnlich großen Tieren, in dem die gleichen Wege der Verabreichung verwendet wurden, verglichen worden.

Ergebnisse:

[0196] Die Ergebnisse sind in den [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) veranschaulicht. Die [Fig. 3](#) ist ein Diagramm, welches die Serumkonzentration von Leptin nach subkutaner Verabreichung darstellt, und [Fig. 4](#) ist ein Diagramm, welches die Serumkonzentration von Leptin nach intravenöser Verabreichung zeigt.

[0197] Im allgemeinen waren die Serumkonzentrationen, sowohl nach IV- als auch SC-Verabreichung eines glykosilierten Leptins, welches ein Stokes Radius hat, der größer als ungefähr 30 Å ist, höher als jene, welche für rmetHu-Leptin beobachtet worden sind, als auch die für an einer Stelle glykosiliertes Leptin (N48T50). Für rmetHu-Leptin sind die Serumkonzentrationen auf unterhalb 1,0 ng/ml innerhalb von 6 Stunden nach beiden Routen der Verabreichung zurückgegangen; wohingegen die Serumkonzentrationen von glykosiliertem Leptin oberhalb 1,0 ng/ml für 24 Stunden nach IV- oder SC-Verabreichung verblieben.

[0198] Tabelle 7.1 zeigt die pharmacokinetischen Parameter von glykosiliertem Leptin und rmetHu-Leptin in Mäusen.

Tabelle 7.1

Pharmacokinetische Parameter von glykosiliertem Leptin und rmetHu-Leptin nach IV- und SC-Verabreichung

	Glykosiliertes Leptin	Leptin	Verhältnis (glykosiliertes Leptin/Leptin)
<u>SC-Dosis</u>			
t_{max} (h)	1	0,167	---
C_{max} (ng/mL)	1430	1380	1,04
AUC (ng·h/mL)	5800	1180	4,93
$t_{1/2, lz}$ (h)	2,21	0,541	4,09
F (% Dosis)	69,5	79,6	0,873
<u>IV-Dosis</u>			
AUC (ng·h/mL)	8350	1480	5,65
$t_{1/2, lz}$ (h)	2,76	0,733	3,77
CL (mL/h/kg)	120	676	0,178
V_{ss} (mL/kg)	157	150	1,05

[0199] Im Vergleich der IV-Daten (siehe [Fig. 4](#)) zeigt glykosiliertes Leptin eine geringere systemische Clearance (120 ml/h/kg vs. 676 ml/h/kg) und eine längere terminale Halbwertszeit (2,76 Std. vs. 0,733 Std.). Die Mengen-Verteilung im Steady State (V_{ss}) waren zwischen glykosiliertem Leptin und rmetHu-Leptin ähnlich. Diese Daten weisen darauf hin, daß das glykosilierte Protein langsamer als rmetHu-Leptin aus dem Körperkreislauf entfernt worden ist, somit die Halbwertszeit und Exposition (AUC Schätzungen von 8350 ng·h/ml vs. 1480 ng·h/ml) erhöht. Im Anschluß an die SC-Dosierung (siehe [Fig. 3](#)) sind zwischen glykosiliertem Leptin und rmetHu-Leptin ähnliche Peak-Serumkonzentrationen (C_{max}) erhalten worden (1430 ng/ml vs. 1380 ng/ml), obwohl eine Verzögerung der Peakzeit für glykosiliertes Leptin vorhanden war (t_{max}). Ähnlich der Ergebnisse, die nach der IV-Verabreichung erhalten wurden, zeigte subkutan verabreichtes glykosiliertes Leptin eine erhöhte terminale Halbwertszeit (2,21 Std. vs. 0,541 Std.) und Fläche unter der Kurve (area under the curve „AUC“) (5800 ng·h/ml vs. 1180 ng·h/ml), vermutlich aufgrund der verminderten systemischen Clearance des glykosilierten Leptins. Die subkutane Bioverfügbarkeit war ungefähr 69,5% für das glykosilierte Leptin vs. 79,6% für das rmetHu-Leptin.

Beispiel 8

Verbesserte Aktivität bezüglich des Gewichtsverlustes des an drei Stellen glykosilierten Leptins

[0200] Dieses Beispiel zeigt, daß ein glykosiliertes humanes Leptin, welches ein Stokes Radius hat, der größer als 30 Å ist, eine, im Vergleich zu nicht glykosiliertem rekombinantem humanem Leptin, verbesserte biologische in vivo Aktivität hat. Wie gesehen werden kann, verloren ob/ob-Mäuse bei einer täglichen Verabreichung nach 7 Tagen ungefähr 6,8 mal mehr Gewicht mit dem hier verabreichten an drei Stellen glykosilierten Leptin, als mit nicht glykosiertem Leptin.

Methoden:

1. Leptin.

[0201] Das an drei Stellen glykosilierte Leptin, das wie unten beschrieben hergestellt wurde (Stellen 47, 69 und 102, SEQ ID NO: 32), ist verwendet worden, formuliert in einer Konzentration von 1,9 mg/ml in Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline, pH 6,8. Rekombinantes Methionyl humanes Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1 mit ei-

nem Methionyl an Position –1) ist als Bezug für den Vergleich verwendet worden, formuliert zu 20 mg/ml in 10 mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0. Zehn mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0, ist als Vehikelkontrolle verwendet worden.

2. Tiere.

[0202] Die Tiere wurden unter kontrollierten Temperatur-, Licht- und Feuchtigkeits Bedingungen gehalten, mit Licht an 0600 Stunden und ausgeschaltetem Licht an 1800 Stunden. The Amgen, Inc. Tierforschungsanlage ist durch die USDA anerkannt und AAALAC-akkreditiert. Sechs weibliche ob/ob-Mäuse (Jackson Laboratories) sind pro Behandlungsgruppe verwendet worden. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Studie 2 Monate alt und wogen im Durchschnitt 45,6 Gramm. Die Mäuse sind willkürlich für die Behandlungsgruppen ausgewählt worden, so daß das mittlere Körpergewicht der Gruppen vor jedem Behandlungsbeginn gleich war. Es sind zwei Tiere pro Käfig gehalten worden und es ist Standard-Labornagetierfutter ad libitum gefüttert worden.

3. Verabreichung.

[0203] Alle Behandlungsmaßnahmen sind durch die Amgen's Institutional Animal Care and Use Committee zugelassen worden. Es sind täglich glykosiliertes Leptin, r-metHu-Leptin oder Placebo via subkutaner Injektion in die mittlere Schulterblattregion in einem Volumen von 0,1 ml verabreicht worden. Die Dosis von Leptin war 0,5 mg/kg Körpergewicht/Tag, für sowohl glykosiliertes Leptin als auch für r-metHu-Leptin. Die Injektionen sind an 7 aufeinanderfolgenden Tagen gegeben worden, mit Beginn des Studentages 0, am späten Nachmittag (innerhalb von 2 Stunden des ausgeschalteten Lichts in der Kolonie). Die Tiere sind täglich zur gleichen Zeit nach der Injektion gewogen worden. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben.

Ergebnisse:

[0204] Wie in [Fig. 5](#) gesehen werden kann, hat das an drei Stellen glykosilierte Leptin („GE-Leptin“) den größten Gewichtsverlust zur Folge, mit einem durchschnittlichen Gewichtsverlust von $10,8 \pm 0,3$ Gramm ($-23,8 \pm 0,5\%$ des anfänglichen Körpergewichts). Die Verabreichung der gleichen Dosis von r-metHu-Leptin („hLeptin“) erzeugte einen durchschnittlichen Gewichtsverlust von $1,6 \pm 0,4$ Gramm ($-3,5 \pm 1,1\%$ des anfänglichen Körpergewichts), während die Verabreichung von Placebo eine durchschnittliche Gewichtszunahme von $2,6 \pm 0,2$ Gramm ($5,7 \pm 0,3\%$ des anfänglichen Körpergewichts) zur Folge hatte. Dieses Beispiel zeigt eine erheblich verbesserte biologische in vivo Aktivität eines glykosilierten Leptins im Vergleich zu nicht glykosiertem rekombinantem humanen Leptin.

Beispiel 9

Verbesserte Aktivität bezüglich der Appetitunterdrückung eines an drei Stellen glykosilierten Leptin

[0205] Dieses Beispiel zeigt, daß ein glykosiliertes humanes Leptin, welches ein Stokes Radius hat, der größer als 30 Å ist, im Vergleich zu nicht glykosiertem rekombinantem humanem Leptin eine verbesserte biologische in vivo Aktivität hat. Wie gesehen werden kann, haben ob/ob-Mäuse bei einer täglichen Verabreichung des glykosilierten Leptins nach 7 Tagen ungefähr 11 mal weniger Futter gefressen, als mit dem nicht glykosierten Leptin.

Methoden:

1. Leptin.

[0206] Ein an drei Stellen glykosiliertes Leptin, das wie unten beschrieben hergestellt wurde (Stellen 47, 69 und 102, SEQ ID NO: 32), ist verwendet worden, formuliert in einer Konzentration von 1,9 mg/ml in Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline, pH 6,8. Rekombinantes Methionyl humanes Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1 mit einem Methionyl an Position –1) ist als Bezug für den Vergleich verwendet worden, formuliert zu 20 mg/ml in 10 mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0. Zehn mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0, ist als Vehikelkontrolle verwendet worden.

2. Tiere.

[0207] Die Tiere sind unter kontrollierten Temperatur-, Licht- und Feuchtigkeits Bedingungen gehalten worden, mit angeschaltetem Licht an 0600 Stunden und ausgeschaltetem Licht an 1800 Stunden. The Amgen, Inc.

Tierforschungsanlage ist durch die USDA anerkannt und AAALAC-akkreditiert. Sechs weibliche ob/ob-Mäuse (Jackson Laboratories) sind pro Behandlungsgruppe verwendet worden. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Studie 2 Monate alt und wogen im Durchschnitt 45,6 Gramm. Die Mäuse sind willkürlich für die Behandlungsgruppen ausgewählt worden, so daß das mittlere Körpergewicht der Gruppen vor jedem Behandlungsbeginn gleich war. Es sind zwei Tiere pro Käfig gehalten worden und es wurde Standard-Labornagetierfutter ad libitum gefüttert.

3. Verabreichung.

[0208] Alle Behandlungsmaßnahmen wurden von dem Amgen's Institutional Animal Care and Use Committee zugelassen. Glykosiliertes Leptin, r-methHu-Leptin oder Placebo sind täglich via subkutaner Injektion in die mittlere Schulterblattregion in einem Volumen von 0,1 ml verabreicht worden. Die Dosis von Leptin war 0,5 mg/kg Körpergewicht/Tag, sowohl für glykosiliertes Leptin als auch für r-methHu-Leptin. Die Injektionen sind an 7 aufeinanderfolgenden Tagen gegeben worden, mit Beginn des Studientages 0, am späten Nachmittag (innerhalb von 2 Stunden des ausgeschalteten Lichts in der Kolonie). Die Tiere sind täglich zur gleichen Zeit nach der Injektion gewogen worden. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben.

4. Futtermessungen.

[0209] Die Futteraufnahme ist täglich Zeit der Injektion durch Wiegen der Menge des Futters in jedem Tierkäfig pro Tag gemessen worden. Die Futteraufnahme wird als aufgenommene Gramm pro Maus pro Tag angegeben und ist wie folgt berechnet worden: (Gewicht des Futters in dem Käfig vom vorherigen Tag – Gewicht des Futters am gleichen Tag)/die Anzahl von Mäusen pro Käfig (zwei). Alle Daten werden als Mittelwerte \pm SE angegeben.

Ergebnisse:

[0210] Wie in [Fig. 6](#) gesehen werden kann, hat die Verabreichung von an drei Stellen glykosiliertem Leptin die größte Abnahme der Futteraufnahme zur Folge, mit einer durchschnittlichen Futteraufnahme von $0,4 \pm 0,04$ Gramm/Maus/Tag während der letzten 24-Stunden-Periode nach der siebten Dosis. Die Verabreichung von rekombinantem humanen Methionyl Leptin erzeugte eine Abnahme der Futteraufnahme bis $4,4 \pm 0,4$ Gramm/Maus/Tag, im Vergleich zu der Futteraufnahme der Vehikel-behandelten Kontrollen ($7,0 \pm 0,3$ Gramm/Maus/Tag), während der gleichen 24-Stunden-Periode. Dieses Beispiel zeigt eine erheblich verbesserte biologische in vivo Aktivität von glykosiliertem Leptin im Vergleich zu nicht glykosiliertem rekombinantem humanen Leptin.

Beispiel 10

Verbesserung der Aktivität bezüglich der Gewichtsabnahme des an drei Stellen glykosilierten Leptins, welches intermittierend verabreicht wurde

[0211] Dieses Beispiel zeigt, daß die verbesserte biologische in vivo Aktivität eines an drei Stellen glykosilierten humanen Leptins, welches ein Stokes Radius hat, der größer als 30 Å ist, aufrechterhalten wird, wenn das Material auf einer intermittierenden Grundlage verabreicht wird. Wie gesehen werden kann, verloren ob/ob-Mäuse signifikant mehr Gewicht bei entweder täglicher Verabreichung von glykosiliertem Leptin, oder einer Verabreichung an jedem zweiten Tag, als wenn mit einer 10-fach höheren Dosis von nicht glykosiliertem Leptin behandelt wurde.

Methoden:

1. Leptin.

[0212] Ein an drei Stellen glykosiliertes Leptin, das wie unten beschrieben hergestellt wurde (Stellen 47, 69 und 102, SEQ ID NO: 32) ist verwendet worden, formuliert in einer Konzentration von 1,9 mg/ml in Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline, pH 6,8. Rekombinantes humanes Methionyl Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1 mit einem Methionyl an Position –1) wurde als Bezug für den Vergleich verwendet, formuliert zu 20 mg/ml in 10 mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0. Zehn mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0, ist als Vehikelkontrolle verwendet worden.

2. Tiere.

[0213] Die Tiere sind unter kontrollierten Temperatur-, Licht- und Feuchtigkeits Bedingungen gehalten worden, mit angeschaltetem Licht an 0600 Stunden und ausgeschaltetem Licht an 1800 Stunden. The Amgen, Inc. Tierforschungsanlage ist durch die USDA anerkannt und AAALAC-akkreditiert. Sechs weibliche ob/ob-Mäuse (Jackson Laboratories) sind pro Behandlungsgruppe verwendet worden. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Studie 4,5 Monate alt und wogen im Durchschnitt 66,6 Gramm. Die Mäuse sind willkürlich für die Behandlungsgruppen ausgewählt worden, so daß das mittlere Körpergewicht der Gruppen vor jedem Behandlungsbeginn gleich war. Es sind zwei Tiere pro Käfig gehalten worden und Standard-Labornagetierfutter ad libitum ist gefüttert worden.

3. Verabreichung.

[0214] Alle Behandlungsmethoden sind durch das Amgens's Institutional Animal Care and Use Committee zugelassen worden. Glykosiliertes Leptin, r-metHu-Leptin oder Placebo sind entweder täglich oder jeden zweiten Tag via subkutaner Injektion in der mittleren Schulterregion in einem Volumen von 0,1 ml verabreicht worden. Die Dosis von Leptin war 0,25 oder 2,5 mg/kg Körpergewicht/Tag bei Mäusen, denen täglich glykosiliertes Leptin oder r-metHu-Leptin injiziert worden ist. Die Dosis des Leptins war 1 oder 10 mg/kg Körpergewicht/Tag bei Mäusen, denen jeden zweiten Tag glykosiliertes Leptin oder r-metHu-Leptin injiziert worden ist. Die Injektionen sind an 7 aufeinanderfolgenden Tagen gegeben, beginnend am Studientag 0, am späten Nachmittag (innerhalb von 2 Stunden während des ausgeschalteten Lichts in der Kolonie). Die Mäuse, denen jeden zweiten Tag Leptin injiziert wurde, erhielten Injektionen des Vehikels an den alternierenden Tagen. Die Tiere wurden täglich zum Zeitpunkt der Injektion gewogen. Der Gewichtsverlust in Prozent wird berechnet als: ((Körpergewicht am Tag 7 – Körpergewicht am Tag 0)/Körpergewicht am Tag 0) multipliziert mit 100. Alle Daten werden als Mittelwert \pm SE angegeben.

Ergebnisse:

[0215] Wie in Tabelle 10.1 gezeigt, verloren die Mäuse, denen täglich 0,25 mg/kg Körpergewicht/Tag glykosiliertes Leptin injiziert worden war, mehr Gewicht als Mäuse, welche entweder die gleiche Dosis oder eine 10 mal höhere Dosis des rekombinanten humanen Methionyl Leptin erhielten.

Tabelle 10.1: Gewichtsverlust (ausgedrückt als % des anfänglichen Körpergewichts) nach 7 Tagen der täglichen Dosierung von glykosiliertem Leptin oder rekombinantem humanen Methionyl Leptin.

	Dosis	
Injectat	0,25 mg/kg/d	2,5 mg/kg/d
r-metHu-Leptin	-8,2 \pm 1,0 %	-15,2 \pm 0,5 %
dreifach glycosyliertes Leptin	-21,4 \pm 0,6 %	Nicht bestimmt

[0216] Wie in Tabelle 10.2 gezeigt, verloren die Mäuse, denen jeden zweiten Tag 1 mg/kg Körpergewicht/Tag glykosiliertes Leptin injiziert worden war, mehr Gewicht, als Mäuse, welche entweder die gleiche Dosis oder eine 10-fach höhere Dosis von rekombinantem humanen Methionyl Leptin erhielten.

Tabelle 10.2: Gewichtsverlust (ausgedrückt als % des anfänglichen Körpergewichts) nach 7 Tagen täglicher Dosis von glykosiliertem Leptin oder rekombinantem humanen Methionyl Leptin.

	Dosis	
Injectat	1,0 mg/kg/d	10 mg/kg/d
r-metHu-Leptin	-5,7 \pm 0,8 %	-10,6 \pm 0,8 %
Dreifach glycosyliertes Leptin	-16,9 \pm 1,0 %	Nicht bestimmt

[0217] Dieses Beispiel zeigt, daß die erhöhte biologische Aktivität des glykosilierten Leptins, relativ zum nicht glykosilierten Leptin, bewahrt ist, wenn das Protein intermittierend an Obesitas-Mäuse verabreicht wird.

Beispiel 11

Studien bezüglich der Dosis – Wirkung eines an drei Stellen glykosilierten Leptins in Wildtypmäusen

[0218] Dieses Beispiel zeigt, daß das vorliegende an drei Stellen glykosilierte Leptin, welches einen Stokes Radius hat, der größer als 30 Å ist, eine biologische Aktivität in nicht-Obesitas-Mäusen hat. Darüber hinaus bestätigt das vorliegende Beispiel in Wildtypmäusen, daß eine weit geringere Dosis des glykosilierten Leptins einen erheblichen Gewichtsverlust zur Folge hat, im Vergleich zu nicht glykosiliertem Leptin.

1. Leptin.

[0219] Ein an drei Stellen glykosiliertes Leptin, das wie unten beschrieben hergestellt wurde (Stellen 47, 69 und 102, SEQ ID NO: 32), ist verwendet worden, formuliert in einer Konzentration von 5,1 mg/ml in Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline, pH 6,8. Rekombinantes humanes Methionyl Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1 mit einem Methionyl an Position –1) wurde als Bezug für den Vergleich verwendet, formuliert zu 20 mg/ml in 10 mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0. Zehn mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0, ist als Vehikelkontrolle verwendet worden.

2. Tiere.

[0220] Die Tiere sind unter kontrollierten Temperatur-, Licht- und Feuchtigkeits-Bedingungen gehalten worden, mit angeschaltetem Licht an 0600 Stunden und ausgeschaltetem Licht an 1800 Stunden. The Amgen, Inc. Tierforschungsanlage ist durch die USDA anerkannt und AAALAC-akkreditiert. Sechs weibliche C57B1/6J Mäuse (Jackson Laboratories) sind pro Behandlungsgruppe verwendet worden. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Studie 2,5 Monate alt und wogen im Durchschnitt 20,0 Gramm. Die Mäuse sind willkürlich für die Behandlungsgruppen ausgewählt worden, so daß das mittlere Körpergewicht der Gruppen vor jedem Behandlungsbeginn gleich war. Es sind zwei Tiere pro Käfig gehalten worden und Standard-Labornagetierfutter ist ad libitum gefüttert worden.

3. Verabreichung.

[0221] Alle Behandlungsmethoden sind durch das Amgen's Institutional Animal Care and Use Committee zugelassen worden. Glykosiliertes Leptin, r-metHu-Leptin oder Placebo sind entweder täglich via subkutaner Injektion in der mittleren Schulterregion in einem Volumen von 0,1 ml verabreicht worden. Die Dosis von Leptin war 1 oder 10 mg/kg Körpergewicht/Tag. Die Injektionen wurden an 7 aufeinanderfolgenden Tagen gegeben, beginnend am Studientag 0, am späten Nachmittag (innerhalb von 2 Stunden des ausgeschalteten Lichts in der Kolonie). Die Tiere sind täglich zum Zeitpunkt der Injektion gewogen worden. Der Gewichtsverlust in Prozent ist berechnet worden als: ((Körpergewicht am Tag 7 – Körpergewicht am Tag 0)/Körpergewicht am Tag 0) multipliziert mit 100. Alle Daten sind als Mittlerwert \pm SE angegeben.

Ergebnisse:

[0222] Wie in Tabelle 11.1 gezeigt, verloren Mäuse, denen täglich 1 mg/kg Körpergewicht/Tag glykosiliertes Leptin injiziert worden ist, mehr Gewicht als Mäuse, die entweder die gleiche Dosis oder eine 10 mal höhere Dosis von rekombinantem humanen Methionyl Leptin erhielten.

Tabelle 11.1: Gewichtsverlust (ausgedrückt als % des anfänglichen Körpergewichts) nach 7 Tagen einer täglichen Dosierung von glykosiertem Leptin oder rekombinantem humanen Methionyl Leptin.

	Dosis	
Injectat	1 mg/kg/d	10 mg/kg/d
r-metHu-Leptin	-2,2 \pm 1,0 %	-3,9 \pm 0,6 %
Dreifach glykosierte Leptin	-8,6 \pm 0,6 %	Nicht bestimmt

[0223] Dieses Beispiel zeigt, daß die erhöhte biologische Aktivität des glykosierten Leptins, verhältnismäßig zu nicht glykosiertem Leptin, auch in nicht Obesitas-Mäusen vorhanden ist.

Beispiel 12

Verbesserung der Aktivität hinsichtlich des Gewichtsverlusts eines an drei Stellen glykosilierten Leptins, welches intermittierend an Wildtypmäuse verabreicht worden ist

[0224] Das vorliegende Beispiel zeigt, daß das an drei Stellen glykosilierte Leptin, welches ein Stokes Radius hat, der größer als 30 Å ist, im Vergleich zu r-metHu-Leptin 1–146 eine verbesserte biologische Aktivität hat. Ferner zeigt das Beispiel, daß die verbesserte biologische Aktivität anhaltend bleibt, wenn das glykosulierte Leptin in einem Dosierungs-Plan weniger häufig als r-metHu-Leptin 1–146 an Wildtypmäuse verabreicht wird.

1. Leptin.

[0225] Ein an drei Stellen glykosiliertes Leptin, das wie unten beschrieben hergestellt wurde (Stellen 47, 69 und 102, SEQ ID NO: 32), ist verwendet worden, formuliert in einer Konzentration von 5,1 mg/ml in Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline, pH 6,8. Rekombinantes humanes Methionyl Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1 mit einem Methionyl an Position –1) ist als Bezug für den Vergleich verwendet worden, formuliert zu 20 mg/ml in 10 mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0. Zehn mM Natriumazetat mit 5% Sorbitol, pH 4,0, ist als Vehikelkontrolle verwendet worden.

2. Tiere.

[0226] Die Tiere sind unter kontrollierten Temperatur-, Licht- und Feuchtigkeits-Bedingungen gehalten worden, mit angeschaltetem Licht an 0600 Stunden und ausgeschaltetem Licht an 1800 Stunden. The Amgen, Inc. Tierforschungsanlage ist durch die USDA anerkannt und AAALAC-akkreditiert. Sechs weibliche C57B1/6J Mäuse (Jackson Laboratories) sind pro Behandlungsgruppe verwendet worden. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Studie 2,5 Monate alt und wogen im Durchschnitt 20,0 Gramm. Die Mäuse sind willkürlich für die Behandlungsgruppen ausgewählt worden, so daß das mittlere Körpergewicht der Gruppen vor jedem Behandlungsbeginn gleich war. Es sind zwei Tiere pro Käfig gehalten worden und Standard-Labornagetierfutter ist ad libitum gefüttert worden.

3. Verabreichung.

[0227] Alle Behandlungsmaßnahmen wurden durch das Amgen's Institutional Animal Care and Use Committee zugelassen. Glykosiliertes Leptin, r-metHu-Leptin oder Placebo sind täglich via subkutaner Injektion in die mittlere Schulterblattregion in einem Volumen von 0,1 ml verabreicht worden. Die Dosis von Leptin war 1, 5 oder 10 mg/kg Körpergewicht/Tag, wurde jeden zweiten Tag injiziert. Die Leptine sind an jedem zweiten Tag injiziert an 7 aufeinanderfolgenden Tagen worden, mit Beginn des Studientages 0, am späten Nachmittag (innerhalb von 2 Stunden des ausgeschalteten Lichts in der Kolonie). Die Mäuse erhielten Injektionen mit dem Vehikel an den alternierenden Tagen. Die Tiere sind täglich zur gleichen Zeit nach der Injektion gewogen worden. Der Gewichtsverlust in Prozent ist berechnet worden als: ((Körpergewicht am Tag 7 – Körpergewicht am Tag 0)/Körpergewicht am Tag 0) multipliziert mit 100. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben.

Ergebnisse:

[0228] Wie in Tabelle 12.1 gezeigt, verloren Mäuse, denen jeden zweiten Tag 1, 5 oder 10 mg/kg Körpergewicht glykosiliertes Leptin injiziert worden war, mehr Gewicht, als Mäuse, welche die gleiche Dosis an rekombinantem humanen Methionyl Leptin an jedem zweiten Tag erhielten.

Tabelle 12.1: Gewichtsverlust (ausgedrückt als % des anfänglichen Körpergewichts) nach 7 Tagen einer Dosierung von glykosiertem Leptin oder rekombinantem humanen Methionyl Leptin alle zwei Tage.

Injectat	Dosis		
	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
r-metHu-Leptin	-0,8 \pm 1,4 %	-1,0 \pm 0,8 %	-1,5 \pm 0,9 %
Dreifach glykosiertes Leptin	-1,2 \pm 2,1 %	-6,7 \pm 1,2 %	-9,1 \pm 0,5 %

[0229] Dieses Beispiel zeigt, daß die erhöhte biologische Aktivität von glykosiertem Leptin, relativ zu nicht

glykosiliertem Leptin, erhalten bleibt, wenn das Protein intermittierend an nicht Obesitas Mäuse verabreicht wird.

Beispiel 13

Leptinproteine mit mehreren zusätzlichen Glykosilierungsstellen

[0230] In Tabelle 13.1 sind nachfolgend humane glykosilierte Leptinproteine dargestellt, welche auch hergestellt worden sind. Die Tabellenspalten zeigen: (1) die Position der N-Glykosilierung (in Bezug auf die Numerierung von SEQ ID NO: 1, rHu-Leptin 1-146) (wenn nicht anderweitig vermerkt); (2) die Expressionsausbeute im Vergleich zum „Wildtyp“ („WT“, hier rHu-Leptin 1-146, wie in SEQ ID NO: 1); (3) die Glykosilierungsspezies, welche detektiert wurde; (4) die Rezeptorbindung relativ zu „WT“; (5) die Bioaktivität relativ zu „WT“. Die verwendeten Methoden sind nachfolgend beschrieben. Der Ausdruck „ND“ bedeutet nicht bestimmt. (Die hierin für die Expression verwendeten spezifischen Sequenzen sind vollständiger in den nachfolgenden Beispielen dargelegt, in Bezug auf die Expression des glykosilierten Leptinproteins 47 + 69 + 102)

Tabelle 13.1

Zusammenfassung der COS Leptin dreifach Glykosylierungs Expression, Bindung und Glykosylierungsergebnisse				
Position der N-Glykosilierung	Expression rel. zum WT	Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
None	1	0	1	1
2+69+92	1,07	1'-25,2'-45,3'-10	0,7	0,41
2+69+92RRR*	0,36	1'-10,2'-25,3'-60	ND	ND
26+33+48	0,25	1'-30,2'-30,3'-20	ND	ND
26+35+48	0,88	1'-30,2'-30,3'-20	1,3	ND
26+33+115	0,17	1'-30,2'-30,3'-20	ND	ND
26+35+115	0,16	1'-30,2'-30,3'-20	ND	ND
27+35+115	0,25	1'-30,2'-30,3'-20	0,8	ND
29+33+115	0,83	1'-30,2'-30,3'-20	1,1	ND
33+48+115	0,27	1'-25,2'-25,3'-40	0,7	ND
35+48+115	0,47	1'-30,2'-30,3'-20	1	ND
47+69+100e	2,66	1'-5,2'-80(50/O-link)	0,66	1,3
47+69+102	1,8	1'-30,2'-50,3'-10	0,62	0,86
47+69+103	0,57	1'-20,2'-45,3'-5	0,44	0,11
48+69+101	2,2	1'-10,2'-60,3'-10	0,95	0,15
48+69+102	3,3	1'-20,2'-45,3'-20	1,04	0,46
48+69+103	2,8	1'-15,2'-60,3'-5	0,52	0,36
48+69+118	1,2	1'-20,2'-45,3'-5	0,09	1,6
69+102+118	1,1	1'-50,2'-30,3'-0	0,11	3,5
69+103+118	0,72	1'-50,2'-20,3'-0	0,55	1,5

Abkürzungen und Bemerkungen sind die gleichen wie jene, die oben verwendet worden sind, siehe z.B. Tabelle 4.1.

* „RRR“ bezeichnet die Verwendung von drei C-terminalen Argininresten in dem glykosolierten Leptinprotein. Zusätzlich sind die folgenden an mehreren Stellen glykosolierten Leptinproteine hergestellt worden und getestet worden, wie in Beispiel 15 unten weiter beschrieben worden ist.

2 + 23 + 47 + 69 + 92

2 + 47 + 69 + 92 + 102

23 + 47 + 69 + 92 + 102

2 + 47 + 69 + 92

2 + 47 + 69 + 102

23 + 47 + 69 + 102

23 + 47 + 69 + 92

Q-47 + 69 + 92 + 102 („Q-“, zeigt an, daß SEQ ID NO: 2, rHu-Leptin 1–145, als Proteinrückgrat verwendet worden ist, an welches die Glykosilierungsstellen gefügt worden sind)

47 + 69 + 100e + 102

[0231] Darüber hinaus umfaßt die vorliegende Erfindung auch ein glykosoliertes Leptinprotein, welches Glykosilierungsstellen an den Positionen 47, 69, 92 und 102 hat.

Beispiel 14

Expression eines an drei Stellen glykosolierten Leptinproteins unter Verwendung einer Vielzahl von Signalsequenzen und anderen Sequenzen, welche die Glykosilierung beeinflussen

[0232] Dieses Beispiel veranschaulicht die Unterschiede in der Glykosilierung eines an drei Stellen glykosolierten Leptinproteins, welches Stellen hat, die für die Glykosilierung verfügbar sind, die an den Positionen 47, 69 und 102 von rHu-Leptin 1–146 lokalisiert sind (SEQ ID NO: 1, welche die bezeichneten Glykosilierungsstellen unter Verwendung der Formel N-X-S/T hat, das wie hierin beschrieben hergestellt wurde), auch wie oben beschrieben. Die Expression in zwei Zelltypen, COS-Zellen und CHO-Zellen, erfolgte im allgemeinen gemäß der Verfahren in den nachstehenden Referenz-Beispielen. Die Glykosilierung ist gemäß der in nachfolgenden Referenz-Beispielen dargestellten Verfahren bestimmt worden. Das Ausmaß der Glykosilierung ist in einer Skala von 1 bis 5 gepunktet worden, wobei 5 das Auftreten der maximalen Belegung von Glykosilierungsstellen hat. Der Ausdruck „ND“ bedeutet „nicht bestimmt“.

[0233] Eine Vielzahl von Signalsequenzen ist verwendet worden. Die Aminosäuresequenzen dieser Signalsequenzen sind in der folgenden Tabelle 14.1 dargestellt. Die folgenden Begriffe sind verwendet worden, um zu kennzeichnen, welche Signalsequenzen oder anderen Aminosäuresequenzen verwendet worden sind, um das vorliegende glykosillierte Leptin zu exprimieren:

Leptin – die natürlich vorkommende humane Leptin Signalsequenz
Leptin/TPA(L/T) – die ersten fünf N-terminalen des humanen Leptins, gefolgt von 15 humanen tPA Signalaminosäuren, mit SP endend
TPA/Leptin(T/L) – die sieben N-terminalen Aminosäuren des humanen Gewebe-Plasminogenaktivators, gefolgt von 16 Aminosäuren der humanen Leptin Signalsequenz, beginnend bei LCG
Leptin (SP) – die natürlich vorkommende humane Leptin Signalsequenz, außer, daß die letzten zwei C-terminalen Aminosäuren mit Serin-Prolin ersetzt worden sind
Leptin (SPS) – die natürlich vorkommende humane Leptin Signalsequenz, außer, daß die zwei C-terminalen Aminosäuren mit Serin-Prolin-Serin ersetzt worden sind
Leptin (SNS) – die natürlich vorkommende Leptin Signalsequenz des humanen Leptins, außer, daß die zwei C-terminalen Aminosäuren mit Serin-Asparagin-Serin ersetzt worden sind
Leptin-pro- die natürlich vorkommende humane Leptin Signalsequenz, plus eine zusätzliche „Pro“ -Sequenz am C-Terminus
Leptin-modifiziert (LGDVMT) – die natürlich vorkommende humane Leptin Signalsequenz, mit der Ausnahme, daß sechs C-terminalen Aminosäuren mit LGDVMT substituiert worden sind
Leptin + RRR @ c-term - die natürlich vorkommende humane Leptin Signalsequenz und zusätzlich, am C-Terminus des glykosilierten Leptinproteins, drei Argininreste
Leptin R81, R85 (Analog) – die natürlich vorkommende humane Leptin Signalsequenz und glykosiliertes Leptinprotein, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 ist, mit Arginin an den Positionen 81 und 85 und Glykosilierungsstellen an den Positionen 47, 69 und 102
Thrombopoietin (TPO) – die natürlich vorkommende humane Thrombopoietin Signalsequenz
Gewebe-Plasminogenaktivator (TPA) – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz
TPA (SNS) – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, welche die drei C-terminalen Aminosäuren hat, die die Aminosäuren Serin-Asparagin-Serin sind
TPA (SPA) – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, welche die drei C-terminalen Aminosäuren hat, die die Aminosäuren Serin-Prolin-Alanin sind
TPS (SP) – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, welche die zwei C-terminalen Aminosäuren hat, die die Aminosäuren Serin-Prolin sind
TPA (SFS) – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, welche die drei C-terminalen Aminosäuren hat, die die Aminosäuren Serin-Phenylalanin-Serin sind
TPA (SWS) – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, welche die drei C-terminalen Aminosäuren hat, die die Aminosäuren Serin-Tryptophan-Serin sind
TPA (INS) – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, welche die drei C-terminale Aminosäuren hat, die die Aminosäuren

Isoleucin-Asparagin-Serin sind
TPA (INA) – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, welche die drei C-terminalen Aminosäuren hat, die die Aminosäuren Isoleucin-Asparagin-Alanin sind
TPA-A2 – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, welche zusätzliche C-terminale Aminosäuren aus Arginin-Glycin-Arginin-Phenylalanin-Arginin-Arginin hat
TPA (SP)-A2 – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, bei welcher das letzte Serin der natürlich vorkommenden Sequenz beseitigt worden ist und welche zusätzliche C-terminale Aminosäuren aus Arginin-Glycin-Arginin-Phenylalanin-Arginin-Arginin hat
TPA-A4 – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz mit zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren aus Glutamin-Glutaminsäure-Isoleucin-Arginin-Glycin-Arginin-Phenylalanin-Arginin-Arginin
TPA-A5 – die natürlich vorkommende humane Gewebe-Plasminogenaktivator Signalsequenz, welche zusätzliche C-terminale Aminosäuren aus Glutamin-Glutaminsäure-Isoleucin-Histidin-Alanin-Arginin-Phenylalanin-Arginin-Arginin hat
Intrinsic-Faktor – die natürlich vorkommende humane Intrinsic-Faktor Signalsequenz
Serumalbumin (pre-pro) – die natürlich vorkommende humane Serumalbumin Signalsequenz und Prosequenz
G-CSF – die natürlich vorkommende Signalsequenz des Granulozyten Kolonie stimulierender Faktors
von Willebrand's Faktor (vW) – die natürlich vorkommende Signalsequenz des humanen von Willebrand's Faktor
MAC-1 (CD11 alpha) – das natürlich vorkommende humane CD11 α Signalpeptid
Tie (Rezeptor) – die natürlich vorkommende humane Tie-Rezeptor Signalsequenz
Factor VIII – die natürlich vorkommende Signalsequenz des humanen Faktor VIII
IgG-1, murin – die natürlich vorkommende murine IgG-1 Signalsequenz
Follistatin (FS) – die natürlich vorkommende humane Follistatin Signalsequenz
LAMP-1 – das natürlich vorkommende humane LAMP-1 Signalpeptid
Ceruloplasmin (CP) – das natürlich vorkommende humane Ceruloplasmin Signalpeptid
EPO (oder „ESP“, das das Erythropoietin Signalpeptid bezeichnet) – die natürlich vorkommende humane Erythropoietin Signalsequenz
EPO (ESP) RRR@c-term – die natürlich vorkommende humane Erythropoietin Signalsequenz, welche auch am C-Terminus der Aminosäuresequenz für das glykosilierte Leptinprotein drei Argininreste hat
EPO-HSApro – die natürlich vorkommende humane Erythropoietin Signalsequenz, welche am C-Terminus die „Pro“ -Sequenz aus dem humanen Serumalbumin hat
EPO-modifiziertHSApro – die natürlich vorkommende humane Erythropoietin Signalsequenz, welche am C-Terminus eine modifizierte „Pro“ -Sequenz aus dem humanen Serumalbumin hat (modifiziert wie in der nachstehenden Tabelle angezeigt)
EPO-modifiziertesHSApro + furin – die natürlich vorkommende humane Erythropoietin Signalsequenz, welche am C-Terminus eine modifizierte „Pro“ -Sequenz aus dem humanen Serumalbumin hat (modifiziert wie in der Tabelle unten angezeigt), co-exprimiert mit Furin
EPO-NT3 pro – die natürlich vorkommende humane Erythropoietin Signalsequenz, welche am C-Terminus eine „Pro“ -Sequenz aus NT-3 hat
EPO-HSApro (Leptin NH2 VtoA) – die natürlich vorkommende humane Erythropoietin Signalsequenz, welche am C-Terminus eine „Pro“ -Sequenz aus humanem Serumalbumin hat und bei der das Val11 der Leptinsequenz in Ala geändert wurde, um Spaltung der Prosequenz durch Furin zu verbessern.

Tabelle 14.1 Expression des Leptin 47 + 69 + 102 glykosilierten Proteins

Signal	Sequenz des Leader-Peptids	Glykosilierung 1-5, 5-bestmöglich	
		COS	CHO
Leptin	MHWGTLGFLWLWPYLFYVQA	1	1
Leptin/ TPA (L/T)	MHWGT/LCCVLLLCGAVFVSP	4	5
TPA/ Leptin (T/L)	MDAMKRG/LCGFLWLWPYLFYV QA	1	0,5_
Leptin (SP)	MHWGTLGFLWLWPYLFYVSP	4	3
Leptin (SPS)	MHWGTLGFLWLWPYLFYVSPS	4,5	4,5
Leptin (SNS)	MHWGTLGFLWLWPYLFYVSNS	ND	ND
Leptin-pro	MHWGTLGFLWLWPYLFYVQA- RGRFRR	3	4,5
Leptin-modifiziert (LGDVMT)	MHWGTLGFLWLWPYLGDVMT	3	2
Leptin + RRR @ c- term	MHWGTLGFLWLWPYLFYVQA	5	5
Leptin R81, R85 (Analog)	MHWGTLGFLWLWPYLFYVQA	0,5	ND
Thrombopoietin (TPO)	MELTELLLVVMLLLTARLTL S	1	1
Tissue Plasminogen Activator (TPA)	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPS	4,5	4,5
TPA (SNS):	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSNS	4	4
TPA (SPA)	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPA	4,5	4
TPA (SP)	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSP	3	3
TPA (SFS)	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSFS	3,5	4
TPA (SWS)	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSW S	3,5	4

TPA (INS)	MDAMKRLCCVLLLCGAVFVINS	3,5	4
TPA (INA)	MDAMKRLCCVLLLCGAVFVINA	3,5	3
TPA-A2	MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPS -RGRFRR	5	4,5
TPA (SP)-A2	MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSP- RGRFRR	5	5
TPA-A4	MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPS -QEIRGRFRR	4,5	4
TPA-A5	MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPS -QEIHARFRR	4,5	4
Intrinsic factor	MAWFALYLLSLLWATAGT	3	keine Expression
Serumalbumin (pre- pro)	MKWVTFISLLFLFSSAYSRG- RGVFRR	1	ND
G-CSF	MAGPATQSPMKLMALQLLLWHS ALWTVQEA	1	1
von Willebrand's Faktor (vW)	MIPARFAGVLLALALILPGTLC	1,5	3
MAC-1 (CD11 alpha)	MALRVLLLTALTLCHG	2	2
Tie (Rezeptor)	MVWRVPPFLLPILFLASHVGA	1	1
Faktor VIII	MQIELSTCFFLCLLRFCFS	1	1
IgG-1, murin	MKCSWVIFFLMAVVTGVDS	1	3
Follistatin (FS)	MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFME DRSAQA	1	1
LAMP-1	MAPRSARRPLLLLLPVAAARPHAL SSA	geringe Expression	keine Expression
Ceruloplasmin (CP)	MKILILGIFLFLCSTPAWA	1	3
EPO (ESP)	MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGL PVLG	3	1,5
EPO (ESP) RRR@c- term	MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGL PVLG	5	5

EPO-HSAPro	MGVHECPAWLWLLSLLSPLGL PVLG-RGVFRR	4	4,5
EPO-modifiedHSAPro	MGVHECPAWLWLLSLLSPLGL PVLG-RGRFRR	4	4,5
EPO-modifiedHSAPro + Furin	MGVHECPAWLWLLSLLSPLGL PVLG-RGRFRR	4	4,5
EPO-NT3 pro	MGVHECPAWLWLLSLLSPLGL PVLG-NRTSRRKR	3,5	3
EPO-HSAPro (Leptin NH ₂ VtoA)	MGVHECPAWLWLLSLLSPLGL PVLG-RGVFRR	4	4

[0234] Die verschiedenen TPA Signalpeptide, insbesondere jene mit modifizierten C-Termini (wie z.B. die Addition einer Prosequenz), scheinen die höchste Glykosilierungseffizienz sowohl in CHO als auch in COS Zellen zu haben. Das wurde in einem Western Blot ([Fig. 7](#)) bestätigt. Wie gesehen werden kann, hat die Verwendung des Signalpeptids für tPA das höchste Molekulargewicht zur Folge, daher die am stärksten glykosilierte Probe.

[0235] [Fig. 8](#) ist ein Western Blot, welcher die Ergebnisse eines Vergleichs der verschiedenen Expressionsbedingungen für das an drei Stellen glykosilierte Leptinprotein 47 + 69 + 102, wie oben, zeigt. Auf der linken Seite des Western Blots in der Figur beginnend sind die Spuren wie folgt beladen:

Spur 1: Molekulargewichts Standard;

Spur 2: 47 + 69 + 102, welches eine C-terminale Aminosäuresequenz aus drei Argininen hat, in COS Zellen unter Verwendung des nativen humanen Leptin Signalpeptids exprimiert;

Spur 3: das gleiche wie in Spur 2, exprimiert in CHO Zellen;

Spur 4: das gleiche wie in Spur 2, unter Verwendung des nativen humanen Erythropoietin Signalpeptids exprimiert;

Spur 5: „QTT COS ESP“, rHu-Leptin 1–145 (SEQ ID NO: 2), welches einen Aminosäureaustausch 27T29S → 27T29T hat, in COS Zellen unter Verwendung des nativen humanen Erythropoietin Signalpeptids exprimiert;

Spur 6: „QTT CHO ESP“, das gleiche wie in Spur 5, in CHO Zellen unter Verwendung des nativen humanen Erythropoietin Signalpeptids exprimiert;

Spur 7: „EA2 47 + 69 + 102 COS“, das gleiche wie in Spur 2, bei welchem die C-terminalen Arginine fehlen, in COS Zellen unter Verwendung des nativen humanen Erythropoietin Signalpeptids und einer modifizierten humanen Albumin Prosequenz, wie in diesem Beispiel angezeigt exprimiert;

Spur 8: „EA2 47 + 69 + 102 CHO“, das gleiche wie in Spur 7, exprimiert in CHO Zellen;

Spur 9: „EA2 47 + 69 + 102 + Furin in CHO“ das gleiche wie in Spur 8, unter Verwendung des Furinkonstrukts, wie in diesem Beispiel angezeigt.

[0236] Wie durch Beachtung der Dichte der hochmolekularen Gewichtsbanden gesehen werden kann (eine Glykosilierung anzeigen), hat das dreifach glykosilierte Leptinprotein (Spuren 2, 3, 4, 7, 8 und 9) mehr Glykosilierungen, als das modifizierte rHu-Leptin 1–145, welches eine einzige O-verknüpfte Stelle hat (Spuren 5 und 6). Die Verwendung von CHO Zellen im Vergleich zu COS Zellen hat eine erhöhte Menge an Glykosilierungen zur Folge (zum Beispiel Spur 2 versus Spur 4), und die Verwendung des Erythropoietin Signalpeptids scheint auch die Glykosilierung zu verbessern (zum Beispiel Spur 3 versus Spur 5).

[0237] Die [Fig. 9](#) ist ein Western Blot, bei welchem die Verwendung entweder des Leptin Signalpeptids oder des tPA Signalpeptids verglichen wird, oder die Verwendung einer von beiden mit einer substituierten Enzymspaltungsstelle des anderen. Die Verwendung des tPA Signalpeptids hat eine höhere Glykosilierung zur Folge, als die Verwendung des Leptin Signalpeptids (die linken zwei Spuren). Wenn der C-terminale Teil des Leptin Signalpeptids, welcher seine Peptidase Spaltungsstelle enthält, mit dem N-terminalen Teil des tPA Signalpeptids verwendet worden ist, nahm die Glykosilierungseffizienz ab (Spuren „Tpa/Leptin“). Aber wenn der C-terminale Teil des tPA Signalpeptids, welcher seine Spaltungsstelle enthält, mit dem N-terminalen Teil des Leptin Signalpeptids verwendet worden ist, war die Glykosilierungseffizienz erhöht (Spuren „Leptin/Tpa“). Eine gute Glykosilierungseffizienz ist gefunden worden, wenn nur die tPA-Spaltungsstelle in das Leptin Signalpeptid ein-

gefügt worden ist („Leptin (SPS)“). Das hat eine größere Glykosilierungseffizienz zur Folge, als die Substitution einer partiellen Spaltungsstellen Sequenz („Leptin (SP)“).

[0238] [Fig. 10](#) ist ein Western Blot, welcher die Glykosilierungseffizienz durch Beobachtung der Ergebnisse der Entfernung der Kohlenhydratreste durch N-Glycanase verglichen wird. Wie gesehen werden kann, in den Spuren, in welchen die Kohlenhydrate entfernt worden sind (angezeigt durch das „+“), wandert das Leptinprotein bei dem gleichen Molekulgewicht wie nicht glykosiliertes Leptin. Im Vergleich der sichtbaren Menge der Kohlenhydrate in den Spuren ohne N-Glykanase („-“), erscheint die Verwendung des Erythropoietin Signalpeptids („ESP“ oder „E“ in Kombination mit anderen Bezeichnungen, wie oben verwendet), noch effizienter bei der Glykosylierung des an drei Stellen glykosilierte Leptinprotein, welches getestet worden ist, zu sein.

Beispiel 15

Zusätzliche Expressionsstudien von an mehreren Stellen glykosilierten Leptinproteine unter Verwendung einer Vielzahl von Signalpeptiden und anderen Sequenzen, welche die Glykosilierung beeinflussen

[0239] Dieses Beispiel zeigt zusätzlich Daten der Expression glykosilierten Leptinproteinen mit einer oder mehreren Glykosilierungsstellen unter Verwendung einer Vielzahl von Signalpeptiden und anderen Sequenzen. Wenn nicht anders angezeigt, verweisen die nachfolgenden glykosilierten Leptinproteine auf Glykosilierungsstellen, die der SEQ ID NO: 1 unter Verwendung der bevorzugten Formel von N-X-S/T hinzugefügt worden sind. Die Expression erfolgte in COS Zellen.

[0240] Die Prozent („%“) Glykosilierung meint das Prozent der Moleküle, welche irgendwelche Kohlenhydrate enthalten. Dies ist durch visuelle Untersuchung eines Western Blots bestimmt worden (wie weiter unten in den Referenz-Beispielen beschrieben) und indem subjektiv der Anteil des glykosilierten Proteins des gesamten Leptinproteins visuell bestimmt wurde.

Kontrollen

[0241] In der Tabelle 15.1 sind die Daten von verschiedenen Leptinproteinen dargestellt. Das humane Leptin 1–145 (SEQ ID NO: 2, hierin als „Q–“ bezeichnet) ist als ein glykosiliertes Protein exprimiert worden. Wenn in COS Zellen unter Verwendung seiner native Glykosilierungsstelle exprimiert wurde, unter Verwendung eines Signalpeptids von Erythropoietin („ESP“ wie in den obigen Beispielen), war eine 25%ige Glykosilierung vorhanden (darauf hindeutend, daß 25% der verfügbaren Stellen für die Glykosilierung in einer Population der exprimierten Proteinmoleküle glykosiliert worden sind). Dies war über der 10%-Glykosilierung, die gesehen wurde, wenn das native humane Leptin Signalpeptid (wie zum Beispiel oben) verwendet worden ist. Wenn eine der Glykosilierungsstellen geändert worden ist, um eher ein Threonin als ein Serin an der Position 29 zu haben (wie in der Tabelle gezeigt), sind die Ergebnisse verdoppelt worden, darauf hindeutend, daß ein „T“ für die O-Glykosilierung besser ist, als ein „S“. Sowohl die „T“ als auch die „S“ der natürlich O-verknüpften Stellen, jede kann mit einem Gemisch von einer und zwei Kohlenhydratkettchen glykosiliert sein. Wenn die Stelle dahingehend geändert ist, ein „T“ an der Position 29 zu haben, wird das Prozent der zwei Stellen, welche ein und/oder zwei Ketten haben, erhöht.

Tabelle 15.1

Position der Glykosilierung	Sequenz Änderung	Expression rel. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
WT	none	1	0	1	1
ESP Ob+	EPO sp	2	0	1	0,95
(-Q) Ob+	(-) Q @ 28	1,3	10	1,3	0,14
ESP (-Q) Ob+	EPO sp	1,1	25	0,6	0,36
ESP (-Q[TT]) Ob+	27T29S → 27T29T	0,72	60	0,71	0,3
EA Ob+		0,13	0	3,5	1,8

„WT“ bezeichnet rHu-Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1)
 „ESP“ bezeichnet das native humane Erythropoietin Signalpeptid, wie oben in Beispiel 14 dargelegt,
 „ESP Ob+“ bezeichnet die Verwendung des obigen mit dem nativen humanen Erythropoietin Signalpeptid
 „(-Q")Ob+“ bezeichnet rHu-Leptin 1–145 (SEQ ID NO: 2)
 „EA“ bezeichnet die Verwendung des nativen humanen Erythropoietin Signalpeptids mit der huma-
 nen Albuminprosequenz, wie im obigen Beispiel 14.

Expression eines an einer Stelle glykosilierten Leptinproteins

Vergleiche der Stelle 2

[0242] Wie der nachfolgenden Tabelle 15.2. entnommen werden kann, hat die Hinzufügung von drei terminalen Argininen eine verbesserte Glykosilierungseffizienz zur Folge.

Tabelle 15.2

Position der Glykosilierung	Expression re. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
ESP2	0,3	60	0,9	0,16, 0,012
EA V>A2	0,45	35	1, 0,7	0,53 0,73
2RRR	ND	90	ND	ND

Wo zwei Assays durchgeführt worden sind, sind beide Ergebnisse dargestellt. Die Abkürzungen sind die gleichen wie jene von dem obigen Beispiel 14. „ND“ bedeutet, wie in allen Tabellen verwendet, nicht bestimmt.

Vergleiche der Stelle 23

[0243] Wie in Tabelle 15.3 angezeigt, sind die höchsten Expressionsmengen und die höchste Bioaktivität mit der Verwendung der nativen Leptin Signalpeptide zu beobachten (erste Reihe, 23a). Die Expression war in COS Zellen.

Tabelle 15.3

Position der Glykosilierung	Sequenz Änderung	Expression rel. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
23a	DIS > NIT	7,8	50	ND	0,53
ESP* 23a	EPO sp	0,49	30	0,5	0,79
ESP (-Q) 23	EPO sp	0,78	45	0,87	<0,03
ESP (-Q[TT]) 23	EPO sp	0,32	60	ND	<0,004

Die Abkürzungen sind die gleichen wie jene für das obige Beispiel 14, „ND“, wie in allen Tabellen verwendet, bedeutet nicht bestimmt.

Vergleiche der Stelle 47

[0244] Wie in der Tabelle 15.4 unten gesehen werden kann, hat die Hinzufügung von drei terminalen Argininresten („RRR“) eine zusätzliche Glykosilierung des glykosylierten Leptinproteins mit einer Glykosilierungsstelle an Position 47 zur Folge.

Tabelle 15.4

Position der Glykosilierung	Expression re. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
47	1,06	80	0,66	0,84
47RRR	0,07	95	ND	0,86

Wo zwei Assays durchgeführt worden sind, sind beide Ergebnisse dargestellt. Die Abkürzungen sind die gleichen wie jene für das obige Beispiel 14. „ND“, wie in allen Tabellen verwendet, bedeutet nicht bestimmt.

Vergleiche der Stelle 48

[0245] Wie unten in Tabelle 15.5 dargestellt, waren die höchsten Mengen der Expressions für das an Position 48 des an einer Stelle glykosylierten Leptinproteins unter Verwendung von COS-Zellen, mit dem Signalpeptid von Erythropoietin, kombiniert mit der Prosequenz des humanen Serumalbumins. Wie gesehen werden kann, hat dieses Ein-Stellen-Protein eine höhere biologische Aktivität als nicht glykosyliertes Leptin.

Tabelle 15.5

Position der Glykosilierung	Sequenz Änderung	Expression rel. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
48	ILT > NLT	0,92	50	0,8	0,53
ESP 48	EPO sp	0,54	75	0,8	<0,001
EA 48	EPO sp + HSA pro	1,8	80	1	1,2
AA 48	HSA sp + HSA pro	1	90	1	0,78

Die verwendeten Abkürzungen sind die gleichen wie jene, die für die obigen Beispiele verwendet worden sind. Die Prozentglykosilierung ist mit der gleichen Bedeutung wie in Tabelle 15.1 oben ausgedrückt.

Vergleiche der Stelle 69

[0246] Wie in der Tabelle 15.6 gesehen werden kann, hat die Verwendung des tPA Signalpeptids plus drei

terminalen Argininen die höchste Glykosilierungseffizienz zur Folge.

Tabelle 15.6

Position der Glykosilierung	Expression re. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
69	0,8	75	0,6	1,1
T 69	ND	85	ND	ND
69RRR	0,07	65	ND	ND
T 69RRR	0,04	95	ND	ND

Die verwendeten Abkürzungen sind die gleichen wie jene, die für die obigen Beispiele verwendet worden sind. Die Prozentglykosilierung ist mit der gleichen Bedeutung wie in der obigen Tabelle 15.1 ausgedrückt.

Vergleiche der Stelle 92

[0247] Wie der Tabelle 15.7 entnommen werden kann, verbesserte die Hinzufügung von drei terminalen Argininen die Glykosilierungseffizienz.

Tabelle 15.7

Position der Glykosilierung	Expression re. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
92	4,8	45	1,6	0,8
92RRR	0,03	95	ND	ND

Die verwendeten Abkürzungen sind die gleichen wie jene, die für die obigen Beispiele verwendet worden sind. Die Prozentglykosilierung ist mit der gleichen Bedeutung wie der obigen Tabelle 15.1 ausgedrückt.

Vergleiche der Stelle 102

[0248] Wie in der Tabelle 15.8 gesehen werden kann, hat die Hinzufügung von drei C-terminalen Argininresten eine verbesserte Glykosilierungseffizienz zur Folge.

Tabelle 15.8

Position der Glykosilierung	Expression re. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
102	1,8	70	0,5	0,66
102RRR	0,07	95	ND	0,33

Die verwendeten Abkürzungen sind die gleichen wie jene, die für die obigen Beispiele verwendet worden sind. Die Prozentglykosilierung ist mit der gleichen Bedeutung wie in der obigen Tabelle 15.1 ausgedrückt.

Expression des an zwei Stellen glykosilierten Leptinproteins

Vergleiche der Stelle 47 + 69

[0249] Wie in der Tabelle 15.9 gesehen werden kann, hat die Verwendung des nativen Leptinsignalpeptids für das an den Stellen 47 + 69 glykosilierte Leptinprotein (wie oben beschrieben) die höchsten Expressionsmengen ergeben. Die Verwendung des Erythropoietin Signalpeptids mit der Prosequenz des humanen Serumalbumins, oder die Verwendung des humanen Serumalbumin Signalpeptids und der Prosequenz ergaben die höheren Bioaktivitätsergebnisse.

Tabelle 15.9

Position der Glykosilierung	Sequenz Änderung	Expression rel. zum WT	Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
47+69	47+69	1,3	1'-10,2'-50	1	0,69
ESP 47+69	EPO sp	0,35	1'-10,2'-60	0,6	<0,002
EA 47+69	EPO sp + HSA pro	0,3	1'-5,2'-85	0,3	1,8
AA 47+69	HSA sp + HSA pro	0,82	1'-20,2'-50	1	1,7

Die Abkürzungen sind die gleichen wie jene die oben verwendet worden sind. Die Glykosilierung ist in der gleichen Form, wie oben verwendet, ausgedrückt, siehe zum Beispiel Tabelle 4.1.

Vergleiche der Stelle 69 + 102

[0250] Wie der Tabelle 15.10 entnommen werden kann, hat die Verwendung des Erythropoietin Signalpeptids in COS Zellen scheinbar einen schädlichen Effekt auf die Expression des an den zwei Stellen 69 + 102 glykosilierten Leptins (wie oben beschrieben).

Tabelle 15.10

Position der N-Glykosilierung	Sequenz Änderung	Expression rel. zum WT	% Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
69+102	69+102	1,7	1'-40,2'-30	0,5	0,63
ESP 69+102	EPOsp / 69+102	0,6	1'-20,2'-50	1	<0,001
47+102	47+102	2,7	1'-50,2'-25	1,08	0,42

Die Abkürzungen sind die gleichen wie jene, die oben verwendet worden sind. Die Glykosilierung ist in der gleichen Form, wie oben verwendet, ausgedrückt, siehe zum Beispiel Tabelle 4.1.

Expression des an drei Stellen glykosilierten Leptinproteins

[0251] Wie in Tabelle 15.11 gesehen werden kann, hat die Verwendung des Erythropoietin Signalpeptids verschiedene Effekte auf verschiedene glykosilierte Leptinproteine, die in COS Zellen exprimiert werden. Interessanterweise hatte das glykosulierte Leptinprotein mit der höchsten Bioaktivität die höchste Rezeptorbindung (je niedriger die Zahl, desto höher die Affinität des Rezeptors).

Tabelle 15.11

Position der N-Glykosilierung	Sequenz Änderung	Expression rel. zum WT	Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
ESP 2+47+69	EPO sp	0,2	1'-5,2'-70,3'-20	0,7	0,24
L/T 2+47+69	(seeEx14)	0,21	1'-5,2'-60,3'-30	1,25	ND
L(SNS) 2+47+69	(seeEx14)	0,31	ND	1,63	ND
T 2+47+69	(seeEx14)	0,1	1'-5,2'-50,3'-40	ND	ND
ESP 23+47+69	EPO sp	0,51	1'-5,2'-10,3'-45	0,5	1,4
ESP 47+69+77	EPO sp	0,51	1'-10,2'-75,3'-5	4,2	<0,006
ESP 47+69+92	EPO sp	0,39	1'-15,2'-50,3'-15	0,71	0,47
ESP (-Q) 47+69+92	EPO sp	0,76	1'-15,2'-50,3'-15	0,8	0,88

Die Abkürzungen sind die gleichen wie jene, die oben verwendet worden sind, siehe für nähere Einzelheiten

zum Beispiel Beispiel 14. Die Glykosilierung ist in der gleichen Form, wie oben verwendet, ausgedrückt, siehe zum Beispiel Tabelle 4.1.

Expression des an vier Stellen glykosilierten Leptinproteins

[0252] Wie in der Tabelle 15.12 gesehen werden kann, sind für an vier Stellen glykosilierte Leptinproteine, mit Expression in COS Zellen, verschiedene Expressionsmengen erhalten worden und die resultierenden glykosilierten Proteine zeigten unterschiedliche Grade der Rezeptorbindung und Bioaktivität. Für diese Gruppe der Vierfachstellen-Leptine, hatten die 23 + 47 + 69 + 92 und 23 + 47 + 69 + 102 Stellen Leptine die höchste Bioaktivität relativ zum Wildtyp (d.h. rmetHu-Leptin 1–146, SEQ ID NO: 1).

Tabelle 15.12

<u>Zusammenfassung der Cos Leptin Glykosylierung vierfach-Stellen Expression, Bindung und Glykosylierungsergebnisse</u>				
Position der Glykosilierung	Expression rel. zum WT	Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
Keine	1	0	1	1
ESP2+47+69+92RRR	0,004	1'-5,2'-5,3'-30,4'-70	ND	ND
2+47+69+92RRR	0,13	1'-5,2'-5,3'-60,4'-25	ND	0,2
T 2+47+69+92	0,052	1'-5,2'-5,3'-45,4'-40	ND	ND
T 2+47+69+92RRR	0,01	1'-52'-5,3'-35,4'-50	ND	ND
T (SNS) 2+47+69+92	0,15	1'-5,2'-20,3'-45,4'-25	1,1	<0,1
T(-S)2+47+69+92	0,14	1'-5,2'-20,3'-45,4'-25	1,1	<0,01
EA2 2+47+69+92	0,24	1'-5,2'-10,3'-50,4'-30	ND	ND
TA4 2+47+69+92	0,24	1'-10,2'-25,3'-15,4'-45	0,6	0,49
TA5 2+47+69+92	0,13	1'-10,2'-25,3'-15,4'-45	0,8	0,88
L/T 2+47+69+92	0,2	1'-5,2'-25,3'-45,4'-25	1,2	ND
L (SNS) 2+47+69+92	0,28	ND	0,75	ND
T 2+47+69+92	0,16	ND	ND	ND
L (SNS) 2+47+69+102	0,28	ND	1,1	ND
ESP 23+47+69+102	0,48	1'-20,2'-20,3'-20,4'-10	0,5	1,8
ESP 23+47+69+92	0,41	1'-20,2'-20,3'-20,4'-5	0,5	2,3
ESP(-Q) 47+69+92+102	0,32	1'-10,2'-40,3'-40	0,57	0,13
47+69+100e+102	1,5	1'-25,2'-40,3'-20	0,7	0,66

Die Abkürzungen sind die gleichen wie jene, die oben verwendet worden sind, siehe für nähere Einzelheiten zum Beispiel Beispiel 14. Die Glykosilierung ist in der gleichen Form, wie oben verwendet, ausgedrückt, siehe zum Beispiel Tabelle 4.1.

Expression von an fünf Stellen glykosilierten Leptinprotein

[0253] Wie in Tabelle 15.13 dargestellt, waren die Expressionsmengen der verschiedenen Fünffach-Stellen glykosilierten Proteine unter Verwendung der angezeigten Signalpeptide ziemlich gering. Einige Daten sind nicht bestimmt („ND“) worden.

Tabelle 15.13

<u>Zusammenfassung COs Leptin Glykosylierung fünffach-Stellen Expression, Bindung und Glykosylierungsergebnisse</u>				
Position der N-Glykosilierung	Expression rel. zum WT	Glykosilierung	Rezeptorbindung rel. zum WT	Bioaktivität rel. zum WT
Keine	1	0	1	1
2+23+47+69+92 RRR	0,11	1'-5,2'-5,3'-20,4'-40,5'-25	1	ND
T 2+23+47+69+92	0,045	2'-5,3'-20,4'-40,5'-25	ND	ND
T 2+23+47+69+92RRR	0,01	2'-5,3'-10,4'-45,5'-30	ND	ND
T 2+47+69+92+102	0,19	2'-20,3'-30,4'-30,5'-15	.83	ND
ESP 23+47+69+92+102	0,34	1'-20,2'-20,3'-20,4'-20,5'-5	0,3	1,3
L/T 2+47+69+92+102	0,29	2'-30,3'-30,4'-30,5'-5	0,75	ND
L (SPS) 2+47+69+92+102	0,18	1'-5,2'-10,3'-20,4'-30,5'-25	1,42	ND
T (SNS) 2+47+69+92+102	0,16	2'-30,3'-30,4'-30,5'-5	0,5	ND
T (SPA) 2+47+69+92+102	0,19	2'-20,3'-30,4'-30,5'-15	0,58	ND
L (SNS) 2+47+69+92+102	0,21	ND	0,38	ND

Die Abkürzungen sind die gleichen wie jene die oben verwendet worden sind, siehe für nähere Einzelheiten zum Beispiel Beispiel 14. Die Glykosilierung ist in der gleichen Form, wie oben verwendet, ausgedrückt, siehe zum Beispiel Tabelle 4.1.

[0254] Darüber hinaus veranschaulichen die Western Blots der vorliegenden glykosilierten Leptinproteine, daß Unterschiede der Expressionsbedingungen und Zusammensetzungen unterschiedliche Glykosilierungseffizienzen zur Folge haben. [Fig. 11](#) zeigt, daß die Erhöhung der Anzahl der Glykosilierungsstellen, zumindest bis zu fünf Stellen, die Menge der Glykosilierung, welche auf dem Leptinprotein gefunden wird, erhöht, wenn in CHO-Zellen exprimiert wurde. Die Proben sind wie folgt:

Spur 0: „MOCK“ ist ein Nicht-Leptin enthaltender Zellkultur-Überstand;

Spur 1: „ESP (W. T.)“, rHu-Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1), exprimiert unter Verwendung eines Erythropoietin Signalpeptids;

Spur 2: „ESP (N48)“, das gleiche wie oben, unter Verwendung der angezeigten an einer Stelle glykosilierten Leptinproteine (wie oben beschrieben);

Spur 3: „ESP (N47 + N69)“, das gleiche wie oben, unter Verwendung des angezeigten an zwei Stellen glykosilierten Leptinproteins (wie oben beschrieben)

Spur 4: „ESP (N47 + N69 + N102)“, das gleiche wie oben, unter Verwendung des angezeigten an drei Stellen glykosilierten Leptinproteins (wie oben beschrieben);

Spur 5: „Tpa (SNS) N2 + N46 + N69 + N92“ bezeichnet das an vier Stellen glykosilierte Leptinprotein, wie oben beschrieben, exprimiert, indem ein humanes tPA-Signalpeptid verwendet wird, welches eine Enzymspaltungsstelle von SNS hat (siehe Beispiel 14 zur Sequenzinformation);

Spur 6: „Tpa N2 + N23 + N47 + N69 + N92“ bezeichnet das an fünf Stellen glykosilierte Leptinprotein, wie oben beschrieben, exprimiert, indem das natürliche humane tPA Signalpeptid verwendet wird (siehe Beispiel 14 zur Sequenzinformation).

[0255] Wie gesehen werden kann, nimmt das Molekular-Gewicht mit Zunahme der Glykosilierungsstellen zu (vergleiche Spur 1 bis Spur 6). Dies weist darauf hin, daß diese Stellen Kohlenhydrate hinzufügen, und daß bis zu fünf Ketten an das Leptin gleichzeitig gefügt werden können.

[0256] Die untere Tabelle 15.14 zeigt einen Vergleich der verschiedenen N-terminalen Aminosäuren des glykosilierten Test Leptinproteins, verbunden mit der Verwendung von verschiedenen substituierten Enzymspaltungsstellen für verschiedene Signalpeptide.

Tabelle 15.14

Signalpeptid	Glykosilierung	Amino Terminus N-Terminale Verlängerung
Leptin	+	Korrekt (V)
TPA	++++	S+ SPS
TPASP	++	30% SP
TPA (SNS)	+++	96%
Leptin (SPS)	++++	S
Leptin (SP)	+++	nicht bestimmt
Leptin/tPA	+++	S

[0257] Wie dem entnommen werden kann, sind die am stärksten glykosilierten Leptine, welche die höchsten Erträge von korrekten N-terminalen Aminosäuren haben, hergestellt worden, indem das Signalpeptid tPA (SNS) verwendet wird. Leptin (SNS) war auch stark glykosiliert und produzierte ein Leptin, welches eine N-terminalen Aminosäure von Serin hat (z.B. Serin an der -1 Position von SEQ ID NO: 1 in einem glykosilierten Leptin mit einer modifizierten Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1).

Referenz-Beispiele

[0258] Die folgenden Ausführungsbeispiele stellen Verfahren zur Verfügung, welche in den obigen Ausführungsbeispielen verwendet worden sind.

Herstellung von DNAs, Vektoren und Wirtszellen

1. Konstruktion des humanen Leptin 1–146 Expressionsvektors.

[0259] Diese Verfahren führen zu einem Expressionsvektor für rHu-Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1) in Säugertierzellen. Die DNA, welche rHu-Leptin 1–146 kodiert, einschließlich seiner Signalpeptide, ist auch als ein Template für die Herstellung glykoslierter Leptinproteine der vorliegenden Erfindung verwendet worden.

[0260] Eine DNA, welche die rHu-Leptin-Aminosäuren 1–146 plus einer Signalsequenz wie in Zhang et al., Nature 372: 425–432 (1994) auf 430, **Fig. 6b**, hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen, kodiert, wurde aus cDNA aus humanem Körperfett durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) kloniert. Die klonierte Signalsequenz kodierte die folgende Aminosäuresequenz:

M H W G T L C G F L W L W P Y L F Y V Q A

Primer.

[0261] Die 5' (forward) flankierenden Primer kodierten den Aminoterminus des rHu-Leptin Signalpeptids, eine XbaI Resektionsenzymstelle und eine optimierte Kozak-Sequenz (TCT ATC TAG ACC ACC ATG CAT TGG GGA ACC CTG T). Die 3' (reverse) flankierende Primersequenz (GAG AGT CGA CTA TCA GCA CCC AGG GCT GA) umfaßte das Komplement des Carboxy-Terminus des rHu-Leptins (1–146) und die Terminationscodons, als auch eine Sall Restriktionsstelle.

Vektorherstellung.

[0262] Die PCR-Amplificationsprodukte sind mit XbaI und SalI Restriktionsenzymen verdaut worden, auf einem Agarosegel einer Elektrophorese unterzogen worden, dann aus dem Gel unter Verwendung des Promega® Wizard® Kit-Verfahrens isoliert worden (Promega® Corporation, Madison, WI). Das gereinigte Produkt ist in einen XbaI und SalI geschnittenen pDSRa2-Expressionsvektor ligiert worden, welcher geringfügig gegenüber dem in der WO 90/14363, 1990, z.B. in [Fig. 12](#), beschriebenen modifiziert worden ist, hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen. Der hierin verwendete pDSRa2 beinhaltet die gleichen funktionalen Elemente, aber ist leicht von dem in der WO 90/14363 dargestellten modifiziert worden. Die Sequenz an der HindIII-Stelle war modifiziert worden zu AAGCTTCTAGA, um eine XbaI-Stelle zu bilden, und die Sequenz an der Ncol-Stelle war zu GTCGACCTAGG modifiziert worden, um eine SalI-Stelle zu bilden, mit ausreichend DNA-Sequenzen („Füll-DNA“ („stuffer DNA“)) zwischen den beiden Stellen, um ein effizientes Schneiden durch sowohl XbaI als auch SalI zu ermöglichen, um das geschnittene Plasmid für die gerichtete Klonierung der vorliegenden Leptinprotein Expressionskonstrukte herzustellen. Das resultierende pDSRa2/Leptinplasmid ist für die Säugetierzellexpression wie unten verwendet worden, und als Template für die ortspezifische in vitro Mutagenese.

2. Konstruktionen der Glykosilierungsstellen im Leptin durch ortspezifische Mutagenese.

[0263] Glykosilierungsstellen sind in die rHu-Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1, oben) Sequenz durch ortspezifische Mutagenese eingefügt worden, indem Overlap Extension PCR-Verfahren verwendet wurden, ähnlich jenen, die von Ho et al., Gene Vol. 77, S. 51–59 (1989) beschrieben worden sind. Das pDSRa2-Leptinplasmid, wie oben hergestellt, ist als PCR Template für die Initialschritte der ortspezifischen Mutagenese verwendet worden.

PCR.

[0264] Die PCR-Verfahren sind in zwei aufeinander folgenden Schritten durchgeführt worden. Schritt 1: Zwei Reaktionen (PCR1 und PCR2) sind an der Leptin Template-DNA unter Verwendung einer Gesamtmenge von vier Oligonukleotiden durchgeführt worden: dem 5' (forward) flankierenden rHu-Leptin-Primer, einem reverse mutagenen Primer, einem forward mutagenen Primer (zumindest teilweise zu dem reversen mutagenen Primer komplementär) und der 3' (reverse) flankierende rHu-Leptin-Primer. Die mutagenen Primer umfassten die erwünschten Nukleotidänderungen, als auch 6–20 Nukleotide, welche exakt mit dem Template auf jeder Seite der Änderungen übereinstimmen. Die PCR1 verwendete die 5' (forward) flankierenden Primer und die reversen mutagenen Primer. Die PCR2 verwendete die 3' (reversen) flankierenden Primer und die forward mutagenen Primer. Die DNA-Produkte der PCR1 und PCR2 enthielten überlappende Sequenzen an und auf beiden Stellen der Mutationen. Die amplifizierten DNA-Fragmente sind durch eine Agarosegel-Elektrophorese getrennt worden. Kleine Stücke der Agarose, welche die DNA-Fragmente der korrekten Größe enthielten, sind aus dem Gel geschnitten worden.

[0265] Schritt 2: Die DNA-Fragmente aus der PCR1 und der PCR2 wurden zusammengefasst worden und eine dritte PCR-Reaktion ist unter Verwendung lediglich der 5' forward und der 3' reverse flankierenden Primer durchgeführt worden. Das Annealing der komplementären 3'-terminalen Regionen der entsprechenden Stränge der PCR1- und PCR2-Produkte und die anschließende Strangverlängerung hatte eine Bildung der vollständigen Leptin-DNA-Fragmente zur Folge. Somit ist ein vollständiges DNA-Segment, welches die gewünschten Mutationen enthält, amplifiziert worden.

PCR für die Expression in COS- und CHO-Zellen.

[0266] Für die Expression in der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie 293 (solch eine wie sie kommerziell von der American Type Culture Collection erhältlich ist) umfasste der 5' (forward) Primer Sequenzen, welche ein Stop-Codon, eine KpnI-Stelle und eine Kozak-Sequenz (ACCACC) vor der Leptin Signalpeptid-kodierenden Region einfügten (5'-TCTGGTACCTAGACCACCATGCATTGGGGAAACCTGT-3'). Der 3' reverse Primer (5'-GAAGCGGCCGCCTATCAGCACCCAGGGCTGA-3') umfaßte Sequenzen, welche zwei Stopcodons (TGA TAG) und eine NotI-Restriktionsstelle an das Ende der kodierenden Region des glykosilierte Leptinproteins einfügte. Für die COS- und CHO-Zellexpression umfasste der 3' (reverse) Primer Sequenzen, die ein Stop-Codon, gefolgt von einer SalI-Restriktionsstelle (GAGAGTCGACTATCAGCACCCAGGGCTGA) einfügten. Der 5' forward Reaktionsprimer (TCTATCTAGACCACCATGCATTGGGGAAACCTGT) hatte eine XbaI-Restriktionsstelle, gefolgt durch eine Kozak-Sequenz upstream des Leptin Start-Codons (ATG).

PCR-Verfahren.

[0267] Polymerasekettenreaktionen sind durchgeführt worden, indem eins von zwei austauschbaren Verfahren verwendet wurden.

[0268] In einem Verfahren, welches in einigen der Konstruktionen für die 293-Expression verwendet wurde, sind die PCR-Reaktionen unter Verwendung eines Protokolls durchgeführt worden, was auf Cheng et al., PNAS 91: 5695 (1994) (hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen) basiert: 4 µl von jeweils dem forward und den reverse Primern (5 pm/µl), 1 µl Template (50 ng), 10 µl eines 5 × LP-Puffer (100 mM Tricin, pH 8,7/25% Glycerol/425 mM KOAc), 2 µl dNTP Stock (1 mM jeweils von dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,8 µl rtTh-Polymerase (Perkin Elmer®, 2,5 U/µl) und 2 µl Vent Polymerase (NEB; 0,01 U/µl nach einer frischen 1:100 Verdünnung in 1 × LP-Puffer). H₂O ist hinzugefügt worden, um das endgültige Volumen auf 50 µl zu bringen. Sämtliche Komponenten sind in der gezeigten Folge hinzugefügt worden und die PCR ist durch Hinzufügung von 1 µl von 10 mM MgOAc gestartet worden, wenn die Temperatur während des ersten Zyklus oberhalb von 60°C war. Die Reaktionsbedingungen waren: 2 Zyklen bei 94°C, 10 sek/45°C, 1 Min/68°C, 5 Min gefolgt durch 25 Zyklen bei 94°C, 10 Sek/55°C, 1 Min/68°C, 5 Min. Die amplifizierten Fragmente sind durch eine Agarosegel-Elektrophorese getrennt worden und die DNA-Fragmente mit der korrekten Größe sind unter Verwendung eines Geneclean™ Kits und Verfahren gereinigt worden, die durch den Hersteller bereitgestellt worden sind (Bio 101, Inc.), hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Die gereinigte DNA ist mit NotI und KpnI verdaut worden, dann ist sie nochmals unter Verwendung des Geneclean™ Kits gereinigt worden. Die Bedingungen für den Verdau waren 20 Units KpnI in „M“-Puffer (22 µl Endvolumen) (Boehringer Mannheim), gefolgt durch Hinzufügung von 3 µl „H“-Puffer, 20 Units NotI in einem 52 µl Endvolumen. Die Fragmente sind dann in das Plasmid pBCB ligiert worden, welches mit KpnI und NotI geschnitten worden war. Das Plasmid pBCB ist von pRC/CMV (Invitrogen®, Carlsbad, Kalifornien) durch Deletion der Region des pRC/CMV erhalten worden, welche die f1 Origin, die SV40 Origin, das Neomycin-Resistenz Gen und die SV40 Polyadenylierungsstelle umfaßt. Die legierte DNA ist mit zwei Volumen Ethanol in 0,3 M NaOAc pH 5,2 in Gegenwart von Carrier tRNA präzipitiert worden und in E. Coli transformiert worden. Glykosilierte Leptinprotein-DNAs wurden zunächst durch eine Colony PCR gescreened, um Klone zu identifizieren, welche die korrekten Größen und Art der DNA-Inserts enthalten. Mit diesem Verfahren sind Zellen, welche Plasmide enthalten, in PCR Tubes in der Gegenwart der Leptin forward und reverse Primern platziert worden. Das Gemisch ist dann unter Verwendung der oben beschriebenen Reaktionsbedingungen einer PCR unterworfen worden. Dann sind Plasmide aus positiven Klonen präpariert worden und die glykosilierten Leptinprotein-Inserts sind sequenziert worden, um das Vorhandensein der gewünschten Glykosilierungsstellen zu bestätigen und um sicherzustellen, daß keine zusätzlichen Aminosäureänderungen eingefügt worden sind.

[0269] Eine geringfügig unterschiedliche PCR-Strategie ist für die restlichen Konstruktionen verwendet worden. Die PCR ist unter Verwendung der Taq-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) durchgeführt worden, oder bevorzugt der korrekturlesenden DNA-Polymerase Pfu-Polymerase (Stratagene), welche, im Gegensatz zur Taq-Polymerase, nicht dazu tendiert, ein extra Nicht-Template Nukleotid an den 3'-Terminus der verlängerten Stränge zu fügen. In den Taq-Polymerase-PCRs sind die DNA-Templates mit 2,5 µl 10 × Taq-PCR-Puffer kombiniert worden, 2,5 µl 1 mM dNTPs, 5 pmol von jedem Primer und Wasser zu einem endgültigen Volumen von 25 µl. 0,5 Units der Taq-Polymerase sind zugefügt worden, nachdem das PCR-Gemisch 94°C erreicht hat. Die PCR-Reaktionen sind dann 25 Zyklen lang bei 94°C für 30 Sekunden durchgeführt worden, 60°C für 30 Sekunden und 72°C für 30 Sekunden. In den Pfu-Polymerase-PCRs sind die DNA-Templates mit 5 µl 10 × Pfu-Puffer (Stratagene) kombiniert, 5 µl 1 mM dNTPs, 10 pmol von jedem Primer und Wasser zu einem endgültigen Volumen von 50 µl und 1,2 Units Pfu-Polymerase hinzugefügt worden. Es sind vier Zyklen der PCR mit einer Annealing-Temperatur von 48°C durchgeführt worden, gefolgt durch 20 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 66°C. In jedem Zyklus ist eine Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C durchgeführt worden, das Annealing ist 30 Sekunden durchgeführt worden und die Elongation ist bei 74°C für 30 Sekunden durchgeführt worden. Im Anschluß an die zwei PCR-Reaktionen des ersten Schritts, welcher vorher beschrieben worden ist, sind die Produktbänder mit den korrekten Größen aus einem Agarosegel im Anschluß an eine Elektrophorese geschnitten worden, und die Gelstücke, welche die Produkte der PCR1 und PCR2 enthielten, sind entweder direkt in ein PCR-Tube für den zweiten Schritt der PCR gegeben worden, oder zunächst in ein Tube mit 300 µl Wasser kombiniert und gekocht worden, um die Agarose vor der Hinzufügung in das PCR-Tube zu schmelzen. Die PCRs sind mit Taq- oder Pfu-Polymerase, wie vorher beschrieben, unter Verwendung der forward und reverse flankierenden Primer durchgeführt worden. Nach dem letzten Zyklus der PCR ist den Tubes ermöglicht worden, zusätzliche 5 Minuten bei der Elongationstemperatur zu inkubieren. Die resultierenden PCR-Produkte für jedes Analog sind unter Verwendung des Promega® Wizzard® PCR Cleanup Kit gereinigt worden. Die gereinigte DNA ist in einem 50 µl Restriktionsverdau mit XbaI und SalI-Restriktionsenzymen (Boehringer Mannheim) bei 37°C für 1 Stunde verdaut worden. Die Verdaus sind mit dem Promega® Wizzard®

Cleanup Kit gereinigt worden. Die verdauten Fragmente sind dann in einen XbaI und Sall verdauten pDSR α 2-Vektor legiert worden. Ein 1 μ l Aliquot der Ligationsreaktion, welche das pDSR α 2-Leptin Analog Plasmid enthält, ist verwendet worden, um DH10B-Zellen durch Elektroporation zu transformieren. Ein einzelne Kolonie für jedes Analog ist über Nacht in Flüssigkultur wachsen gelassen worden und Plasmid ist unter Verwendung des Qiagen Maxi DNA® Plasmid Isolationskit isoliert worden. Die DNA für jedes pDSR α 2 humane Leptin-analog ist in Wasser resuspendiert worden und sequenziert worden, um sicherzustellen, daß die korrekte Sequenz vorhanden war.

[0270] Vielfache Glykosilierungsstellen. Zwei oder mehr Glykosilierungsstellenmutationen sind durch Einführung einer neuen Substitution in die DNA, welche bereits eine Änderung enthält, unter Verwendung der gleichen PCR-Verfahren kombiniert worden. Um die zweifach Glykosilierungsstellen Leptin Analog Gene zu konstruieren, sind einstellige glykosilierte Leptinplasmide (die wie oben beschrieben hergestellt wurden) als PCR-Templates verwendet worden und eine zusätzliche Glykosilierungsstelle ist durch ortspezifische Mutagenese mit den geeigneten Primern eingeführt worden. Auf die gleiche Weise sind Plasmide, welche Leptin Analoge mit drei Glykosilierungsstellen kodieren, unter Verwendung von zweier N-Glykosilierungsstellen Leptin-DNAs als Templates konstruiert worden, und der Prozeß könnte für die Einfügung weiterer Glykosilierungsstellen wiederholt werden. Wahlweise können neue Kombinationen von Mutationen der Glykosilierungsstellen hergestellt werden, indem in der PCR1 und in der PCR2 zwei verschiedene DNA-Templates verwendet werden, welche unterschiedliche Glykosilierungsstellen enthalten. Zum Beispiel könnte eine DNA, welche ein Analog mit Glykosilierungsstellen an den Positionen 2, 47, 69 und 102 kodiert, durch das mutagene Primerpaar für die Glykosilierung an der Position 47 hergestellt werden, indem ein DNA-Template mit einer Glykosilierungsstelle an der Position 2 in PCR1 und einer DNA mit Glykosilierungsstellen an den Positionen 69 und 102 in der PCR2 verwendet werden.

[0271] Diese üblichen Verfahren sind verwendet worden, um Plasmide für die Expression glykosierter Leptinproteine zu konstruieren, welche in den obigen Beispielen gezeigt worden sind. Die DNA-Sequenzänderung wird für jede der Formen gezeigt.

Chimäre Signalpeptide.

[0272] Konstrukte für die Expression von Leptin oder eines Leptinanalogs mit einem Nicht-Leptinsignalpeptid sind durch Overlap Extension PCR-Methoden für das Gene Splicing hergestellt worden (Horton et al., Gene 77: 61–68 (1989)), ähnlich jenen, welche für die ortspezifische Mutagenese verwendet worden sind. In einem einleitenden Schritt ist eine DNA, welche das Signalpeptid eines exogenen Gens, zum Beispiel des Gewebe-Plasminogenaktivators (TPA), durch Klonierungsmethoden oder durch eine Kombination von chemischer und enzymatischer Gensynthese erhalten worden. Diese DNA ist als Template in einer PCR verwendet worden, um ein DNA-Fragment zu generieren, welches das exogene Signalpeptid kodiert, dem eine Konsensus Kozak-Sequenz vorangestellt ist und unmittelbar gefolgt wird von dem ersten Teil der kodierenden Region des reifen rHu-Leptin (oder des Leptinanalogs). Die in dieser PCR-Reaktion verwendeten Primer waren ein 5' (forward) für das exogene Gen und ein Reverse-Primer, dessen 5' Teil (10–25 Nukleotide) komplementär zu der Sequenz war, welche den amino-terminalen Teil des reifen Leptins (oder des Leptinanalogs) kodiert. Eine zweite PCR-Reaktion ist mit einer Leptin- oder Leptinanalogs-DNA als Template unter Verwendung des Leptin 3' (reverse) flankierenden Primers und mit einem forward Primer, welcher die Region der Grenzzone des exogenen Signalpeptids und der Sequenz des reifen Leptins (oder des Leptinanalogs) kodiert, durchgeführt worden. Der forward Primer in dieser Reaktion ist so entworfen worden, so daß er die durch die erste PCR generierte DNA überlappt, üblicherweise über eine Länge von 15–35 Nukleotide. Die Produkte der zwei PCR-Reaktionen sind, wie früher beschrieben, Gel-gereinigt worden, gemischt worden und in einer PCR mit nur dem exogenen Gen 5' (forward) flankierenden Primer und dem 3' (reverse) flankierenden Leptin-Primer annealed und amplifiziert worden.

Wirtszellen

1. Expression des glykosilierten Leptinproteins in 293-Zellen.

[0273] DNA ist unter Verwendung der Lipofectamin-Methode in die humane embryonale Nierenzelllinie „293“ transfiziert worden (wie zum Beispiel die, die kommerziell von der American Type Culture Collection erhältlich ist). Die 293-Zellen sind bis zu 40–70% Konfluenz in Gewebekulturplatten (P100) in 293-Medium (DMEM (Difco®)/20 mM HEPES/1 × Pen-Strep-Glutamin/20% FBS) wachsen gelassen worden. 20 μ g der Plasmid-DNA, welche das glykosilierte Leptinprotein kodiert, in 1 ml DMEM ist mit einer 0,45 μ m Acrodisc®-Membran (Gelman Sciences) steril filtriert worden. 100 μ l des Lipofectamin (Gibco®/BRL®) ist hinzugefügt worden und das DNA-Li-

pofectamingemisch ist für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden. Das Medium ist von den Platten, welche die 293-Zellen enthielten, entfernt worden und 4 ml des DMEM und der DNA/Lipofectaminlösung sind hinzugefügt worden. Nach 4–6 Stunden bei 37°C sind 5 ml des DMEM mit 20% fötalem Rinderserum hinzugefügt worden und die Kultur wurde über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag sind die Zellen mit 293-Medium gewaschen worden und 5 ml frisches 293-Medium ist hinzugefügt worden. Das konditionierte Medium wurde nach 3 Tagen gesammelt, aliquotiert und bei –70°C gelagert.

2. Expression der glykosilierten Leptinproteine in COS-Zellen.

[0274] Die cDNA-Klone der glykosilierten Leptinproteine sind durch Elektroporation in COS-1-Zellen (ATCC Nr. CRL-1650) transferiert worden. Die COS-1-Zellen wurden aus semi-konfluenten Schalen geerntet, mit Medium gewaschen (DMEM, welches 10% fötales Rinderserum enthält und 1% L-Glutamin/Penicillin/Streptomycin (Irvine Scientific)) und in einer Konzentration von 6×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Ein halber ml der Zellen ist in eine 0,2 cm Elektroporationscuvette (Bio-Rad®) transferiert worden und mit einem BTX-Elektroporationssystem Electrocell Manipulator 600® bei 650 uF und bei einer Niederspannungs-Einstellung von 130 Volt mit 25 µg der Plasmid-DNA elektroporiert worden, welche das glykosilierte Leptinprotein kodiert. Die elektroporierten Zellen sind in einer 100 mm Gewebekulturschale in 7 ml des Mediums ausplattiert worden. Das konditionierte Medium wurde 3 Tage nach der Elektroporation gesammelt, unter Verwendung einer 0,45 µm Acrodisc®-Membran (Gelman Sciences) gefiltert und bei –80°C gelagert.

3. Expression des glykosilierten Leptinproteins in CHO-Zellen.

[0275] Eine stabile Expression des rHu-Leptin 1–146 oder des glykosilierten Leptinproteins ist durch die Transformation von Dihydrofolate-Reduktasedefizienten (DHFR–) Chinese Hamster Ovary(CHO)-Zellen mit pDSRa2 mit der ausgewählten glykosilierten Leptinprotein-DNA wie oben durchgeführt worden, gefolgt durch die Isolation und dem Testen der einzelnen Klone. In eine 60 mm Gewebekulturplatte sind 1×10^6 CHO DHFR–-Zellen ausplattiert worden, welche in CHO D–-Medium (DMEM-high glucose, 10% fötales Rinderserum, 1% Penicillin/Streptomycin/Glutamin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco®) und 1% HT-Ergänzung (Gibco®)) am Tag vor der Transfektion gezüchtet worden sind. Ein 10 µg DNA-Prezipitat ist dann gebildet worden und den Platten tropfenweise gemäß den Mammalian Cell Transfection Kit-Anweisungen (speziale Medien, hierin durch Bezugnahme aufgenommen) hinzugefügt worden. Nach 24 Stunden in einem Gewebekultur-Inkubator ist das Medium mit frischem CHO D–- Medium ersetzt worden. 24 Stunden später sind die Zellen in sechs 100 mm Kulturschalen mit CHO-Selektionsmedium (D-MEM-high glucose, 10% dialysiertes fötales Rinderserum, 1% Penicillin/Streptomycin/Glutamin, 1% nicht essentielle Aminosäuren (Gibco®) gesplittet worden. Das Medium ist wöchentlich gewechselt worden, bis Kolonien erschienen. Nach 10–14 Tagen sind Kolonien unter Verwendung von 5 mm Klonierungsschalen (Labcore®), getränkt in 1 × Trypsin-EDTA (Life Technologies®), gepickt worden und in 24-Loch-Gewebekulturplatten mit CHO-Selektionsmedium kultiviert worden. Nach 1–2 Wochen ist die Expression von glykosilierten Leptinproteinen bestimmt worden, indem ein Leptin EIA-Assay, nachfolgend beschrieben, verwendet worden ist. Die am besten exprimierenden Klone (d.h. jene, welche unter Verwendung des EIA die meiststarkste Antwort gezeigt haben) wurden expandiert und in cryogener Aufbewahrung eingefroren.

[0276] In einigen Fällen ist ein schnelleres Protokoll verwendet worden, um Analoge in CHO-Zellen zu exprimieren. In diesem Fall ist die Elektroporation verwendet worden, um die Zellen zu transfizieren und einzelne Klone sind nicht isoliert worden. In den Elektroporationsexperimenten sind 200 µg pDSRa2 mit dem glykosolierten Leptinprotein-Insert, wie oben beschrieben, verwendet worden und 200 µg Herringsspermien Träger-DNA. Die DNAs wurden Phenol-Chloroform-extrahiert und mit Ethanol präzipitiert, dann in 800 µl 1 × HEBS zusammen mit 2×10^7 DHFR– Chinese Hamster Ovary(CHO)-Zellen, welche in CHO D–-Medium gezüchtet worden sind, resuspendiert. Die Zellen und die DNA sind bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert worden. Die Elektroporation ist bei 290 Volt und 960 Ufarads durchgeführt worden, indem ein BIO RAD Gene Pulser™ in 0,4 cm Elektroporationscuvetten verwendet wurde. Die Zellen wurden dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 10 ml CHO D–-Medien gewaschen, 10 Minuten bei 1000 rpm in einer Damon®/IEC Division IEC HN-SII Zentrifuge schnell gedreht, dann in 20 ml CHO D–-Medium resuspendiert und zwei 10-Zentimeter-Schalen hinzugefügt. Die Zellen wurden 2 Tage lang bei 37°C wachsen gelassen, dann 1:4 in CHO-Selektionsmedien gesplittet und bis zu ungefähr 70% Konfluenz gezüchtet. Die Zellen wurden dann 1:2 in Selektionsmedien plus 6 nM Methotrexat gesplittet und bei 37°C gezüchtet, bis Klone sichtbar wurden (in etwa 2 Wochen). Pools wurden von Platten gebildet, welche zumindest 4 Kolonien enthielten und wurden in Selektionsmedien mit 6 nM Methotrexat bis zur Konfluenz gezüchtet (in etwa 1 Woche). Die Pools wurden dann in Tief temperaturlagerung eingefroren.

Expression und Reinigung des N48T50 Leptins (Leptinprotein mit einer einzelnen Glykosilierungsstelle).

[0277] CHO-Zellen sind mit DNA, von welcher N48T50 Leptin, wie oben beschrieben, exprimiert werden kann, transformiert worden. Die Zellen sind in einer Spinnerrkultur in Wachstumsmedium (DMEM/F12 (1:1), 365 mg/l L-Glutamin, 1 × MEM nicht-essentielle Aminosäuren, 5% FBS) vermehrt worden. Rollflaschen mit atmungsaktiven Verschlüssen sind dann mit 2e7 Zellen pro Flasche in 400 ml des Wachstumsmediums inkuliert worden und für 10 Sekunden mit 10% CO₂ in Luft begast worden. Nach 5 Tagen sind die Flaschen auf Serum-freies Produktionsmedium umgestellt worden (400 ml/Flasche, DMEM/F12 (1:1), 365 mg/l (1×) L-Glutamin, 1 × MEM nicht-essentielle Aminosäuren, 10 µM CUSO₄, 1,5 g/l zusätzliche Glukose). Serum-freies konditioniertes Medium von drei aufeinanderfolgenden Ernten ist gesammelt worden (180 Liter) und durch einen 0,45 µm Filter gefiltert worden, ungefähr 30-fach konzentriert worden und unter Verwendung einer Tangential-Flow-Ultrafiltrationssystem (Amicon®) mit einer 10.000 Molekulargewicht Cutoff-Membran in 1 mM CHAPS, 10 mM Tris, pH 7,5 diafiltriert worden. Das diafiltrierte Medium ist bei -20°C gelagert worden.

[0278] Die folgenden Schritte sind bei 2 bis 8°C durchgeführt worden. Das DFM ist auf eine Q-Sepharose-Schnellflußsäule (Pharmacia®, 8 cm × 14 cm) aufgetragen worden, welche mit 10 mM Tris, pH 7,9 equilibriert war, und mit ungefähr zwei Säulenvolumen 10 mM Tris gewaschen worden war, um alle nicht bindenden Spezies zu eluieren. N48T50 Leptin, welches an der Säule gebunden bleibt, wurde dann durch einen Zwölf-Säulenvolumengradienten aus 10 mM Tris, pH 7,9 bis 220 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,9 eluiert, in Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, welche das vollständig glykosilierte N48T50 Leptin enthalten, wie durch eine Western Blot-Analyse bestimmt wurde, sind kombiniert worden, dann mit einem Volumen Wasser verdünnt worden, um die Natriumchloridkonzentration zu verringern. Die Probe wurde dann auf eine Bio-Gel® HT-Säule (Bio-Rad®, 10 cm × 7 cm), welche mit 10 mM Tris, pH 7,9 equilibriert war, aufgetragen, dann mit ungefähr 4 Säulenvolumen 10 mM Tris, pH 7,9 gewaschen. Fraktionen der nicht bindenden Arten sind gesammelt worden und jene, welche N48T50 Leptin enthalten, wie durch eine Western Blot-Analyse bestimmt worden ist, sind kombiniert worden.

[0279] Ein Drittel Volumen von 3 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM Tris, pH 7,9 ist dem N48T50 Leptinpool aus der Bio-Gel® HT-Säule hinzugefügt worden. Der Pool, nun in 1 M (NH₄)₂SO₄, wurde auf einer Source 15PHE-Säule (Pharmacia®, 10 cm × 1,6 cm), die mit 1 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM Tris, pH 7,9 equilibriert war, aufgetragen, dann mit ungefähr zwei Säulenvolumen von 1 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM Tris, pH 7,9 gewaschen. F3, welches an der Säule gebunden blieb, wurde dann durch ein 40 Säulenvolumengradienten aus 1 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM Tris, pH 7,9 bis 10 mM Tris, pH 7,9 eluiert, in Fraktionen gesammelt. Fraktionen, welche F3 enthalten, wie durch eine SDS-PAGE-Analyse bestimmt worden ist, sind kombiniert worden.

[0280] Festes Ammoniumsulfat wurde dem N48T50 Leptin-Pool aus der Source 15PHE-Säule in einer Endkonzentration von ungefähr 2,5 M hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Das Übernachtpräzipitat wurde durch Zentrifugation geerntet.

[0281] Das geerntete Ammoniumsulfatpräzipitat wurde im Wasser wieder aufgelöst, mit Essigsäure auf pH 4,5 titriert, auf eine Source 15S-Säule (Pharmacia®, 5,5 cm × 1,6 cm), die mit 10 mM NaCH₂COOH, pH 4,5 equilibriert war, aufgetragen, dann mit ungefähr zwei Säulenvolumen von 10 mM NaCH₂COOH, pH 4,5 gewaschen. Das N48T50 Leptin, welches an der Säule gebunden blieb, wurde dann durch einen 72 Säulenvolumengradienten aus 50 mM NaCl, 10 mM NaCH₂COOH, pH 4,5 bis 150 mM NaCl, 10 mM NaCH₂COOH, pH 4,5 eluiert, in Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, welche das N48T50 Leptin enthalten, wie durch eine SDS-PAGE-Analyse bestimmt worden ist, sind kombiniert worden und bis pH 7,5 titriert worden.

[0282] Der N48T50 Leptinpool aus der Source 15S-Säule wurde auf ungefähr 1 mg/ml konzentriert, in Dulbecco's PBS (Gibco®) diafiltriert, dann auf ungefähr 5 mg/ml unter Verwendung eines Rühr Zell-Ultrafiltrations-System (Amicon®) mit einer 10.000 Molekulargewichts Cutoff-Membran (Filtron®) konzentriert. Das N48T50 Leptin ist dann weiter auf 10 mg/ml konzentriert worden, indem eine zentrifugale Ultrafiltration (Centricon 10, Amicon®) verwendet wurde. Das konzentrierte N48T50 Leptin wurde filtriert (0,22 µm) und bei 2 bis 8°C gelagert.

II. Analytische Methoden

[0283] Die folgenden analytischen Methoden sind hierin verwendet worden, um das vorliegende glykosilierte Leptinprotein zu charakterisieren.

A. In vitro-Assays

1. Rezeptorbindungsassay.

[0284] In diesem Assay ist ein Membran-gebundener Leptinrezeptor als Target verwendet worden, um die Menge der Bindung durch radioaktiv markiertes Test glykosiliertes Leptin zu messen.

[0285] Chinese Hamster Ovary(„CHO“)-Zellen sind manipuliert worden, um einen humanen Leptinrezeptor stabil zu exprimieren, indem sie mit einer humanen Leptinrezeptor-DNA (die kurze Form; Tartaglia et al., Cell 83: 1271 et seq. (1995), hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen; der gesamte Artikel ist hierin durch Bezugnahme aufgenommen) transfiziert wurden. Leptinrezeptor exprimierende Zellen wurden gezüchtet worden und durch eine Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit gesammelt worden. Die pelletierten Zellen (annähernd 50 mg Naßgewicht) sind in 0,32 M Saccharose/25 mM HEPES resuspendiert worden und in einem Glas-Homogenisierungsröhrchen unter Verwendung eines Glas-col®-Motor homogenisiert worden. Die Zellmembranen sind zweimal durch die Zentrifugation (48.000 × g) gewaschen worden, unter Verwendung eines Polytron-Homogenizer (Tissue Tearor®) dispergiert worden und in kaltem Bindungspuffer (MEM, Gibco BRL®/25 mM HEPES, Gibco BRL®/0,1 BSA/0,5 mg/ml Bacitracin® (Sigma®)/0,1 mg/ml STI, Boehringer Mannheim/01, mg/ml AEBSF, Boehringer Mannheim) resuspendiert worden. Nach der zweiten Waschung ist die Membranzubereitung in einer Endkonzentration von 2–3 mg Naßgewicht/ml in kaltem Bindungspuffer resuspendiert worden.

[0286] Die Kompetitionsbindung ist durchgeführt worden, indem 400 µl Membranlösung, 50 µl 2 nM ¹²⁵I-Leptin (Amersham) und 50 µl Probe oder Leptinstandard (10–6 M rHu-Leptin 1–146) für 2–3 Stunden bei Raumtemperatur in 12 mm × 75 mm Röhrchen inkubiert wurde. Gebundenes ¹²⁵I-Leptin wurde dann von ungebundenem ¹²⁵I-Leptin durch Filtration durch Glasfaserfilter getrennt und 3 mal mit kaltem PBS gewaschen, unter Verwendung eines Brandel Cell Harvester. Gebundene Radioaktivität ist mit einem Gamma Counter bestimmt worden. Die Affinität von jedem Analog für den Leptinrezeptor ist durch Kalkulation des Mittelpunkts der Kurve der kalten Verdrängung (IC₅₀) für jedes Analog bestimmt worden.

2. Biologische in vitro Aktivität.

[0287] In diesem Assay ist die biologische in vitro Aktivität unter Verwendung eines chimären Leptinrezeptors bestimmt worden, welcher eine extrazelluläre Domäne eines Leptinrezeptors, eine transmembrane und intrazelluläre Domäne eines Erythropoietinrezeptors hat. Auf die Aktivierung der intrazellulären Erythropoietinrezeptordomäne durch Bindung an die extrazelluläre Leptindomäne zeigten die Zellen eine biologische Aktivität der Proliferation, gemessen durch ³H-Tyramidinaufnahme.

[0288] Interleukin-3 (IL-3) abhängige 32D (Klon 3) murine myeloide Progenitorzellen (Greenberger et al., PNAS-USA 80: 2931 (1983), hierin durch Bezugnahme aufgenommen) sind in RPMI 1640 (Gibco®) gezüchtet worden, welches mit 10% fötalem Rinderserum und 10 ng/ml IL-3 (Biosource®) ergänzt war. Ein chimärer Leptinrezeptor-EPO-Rezeptor (OBR-EPOR) ist durch Standardtechniken hergestellt worden und in einen Expressionsvektor subkloniert worden, welcher den Transkriptionspromotor des Moloney Murine Sarcoma-Virus umfaßt, wodurch der Vektor OBR-EPOR/pLJ entsteht. Der chimäre Rezeptor umfaßte die kodierenden Regionen für die extrazelluläre Domäne des humanen Leptinrezeptors (Aminosäuren 1–839; Tartaglia et al., Cell: 83: 1271 (1996) (hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen) und transmembrane und intrazelluläre Domänen des murinen Erythropoietinrezeptors (Aminosäuren 250–507; D'Andrea et al., 57: 277 (1989), hierin durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen). Der chimäre Rezeptor ist dann in 32D-Zellen durch Elektroporation transfiziert worden. Die transfizierten Zellen wurden anfänglich auf G418 (750 µg/ml) selektiert. Auf Leptin reagierende Zellen wurden dann in RPMI 1640 (Gibco®), ergänzt mit 10% fötalem Rinderserum und 25 ng/ml Hu Leptin, selektiert, wodurch 32D-OBECA-Zellen entstehen. 32D-Zellen, welche nicht mit dem chimären Rezeptor transfiziert worden waren, blieben nicht-reaktiv auf Leptin.

[0289] 32D-OBECA-Zellen sind in 1640 RPMI-Medium (1 × liquid, ohne L-Glutamin, Gibco®), welches 10% fötales Rinderserum (Hyclone Laboratories®) und 1,0 ng/ml des rekombinanten murinen IL-3 (Biosource®) enthält, bis zu einer Dichte von annähernd 5,0E + 05 Zellen/ml gezüchtet worden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (annähernd 270 × G), zweimal mit sterilem 1 × PBS (Gibco®) gewaschen und dann in einer Konzentration von 1,0E + 05 Zellen/ml in einem Medium resuspendiert, welches aus 20% DMEM-Medium (DMEM + 10% FBS) plus 80% Assay-Medium (RPMI + 2% FBS) plus 10 ng/ml pan-specific anti-TGFβ neutralisierende Antikörper besteht. Eine verlängerte zwölf-Punkt rmet-Hu-Leptin 1–146 Standardkurve ist unter Verwendung von Assaymedium in einem Bereich von ungefähr 0,1 bis 200 ng/ml erstellt worden. Die Testpro-

ben wurden in Assaymedium verdünnt und üblicherweise als verlängerte Vielfachpunktkurve laufengelassen oder in Bereichen, welche innerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve fallen. Ein Volumen von 100 µl jeder Probe sind zu geeigneten Löchern einer 96-Loch-Mikrotiter-Gewebekulturplatte gegeben worden. Zellen mit der Probe oder dem Standard sind bis zu 10.000 Zellen pro Loch (in 100 µl) für ungefähr 48 Stunden bei 5 ± 1% CO₂ und 3 ± 2°C in einem Inkubator mit hoher Luftfeuchtigkeit wachsen gelassen worden. 3H-Thymidin (0,5 µCi pro Loch, Dupont®) wurde dann hinzugefügt und die Platten wurden für zusätzliche 18 Stunden inkubiert und ihre DNA auf vorgedruckte Glasfaserfiltermatten (Pharmacia®) unter Verwendung eines Zellernters (Tomtek 96 Mach II®) geerntet. Die Filter wurden in einem Mikrowellenofen getrocknet, in LBK®-Probentaschen plus 10 ml der Scintillationsflüssigkeit (LKB®) verpackt und dann in einem Betaplate®-Scintillationscounter (LKB®) gezählt. Die Zellantwort (in Form des durchschnittlichen CPMs-Hintergrunds) wurde vs. Masse (ng/Loch) des rHu-Leptin 1–146 Standards geplottet. Die Bioaktivität einer Probe von rmetHu-Leptin oder glykosiliertem Leptins ist durch eine Regressionsanalyse aus der Standardkurve bestimmt worden. Die spezifische Aktivität ist durch Teilung der bestimmten biologischen Aktivität (ng/ml) durch die Konzentration, wie durch den Leptin ELISA bestimmt, berechnet worden.

B. Charakterisierung der glykosilierten Leptinproteine

1. Enzym-Imunoassay („EIA“).

Polyklonale Antikörper.

[0290] Anti-rmetHu-Leptin 1–146 (SEQ ID NO: 1 mit einem Methionylrest an der –1 Position) polyklonale Antikörper sind in New Zealand weiße Kaninchen durch wiederholte subkutane Injektionen von rmetHu-Leptin 1–146, konjugiert an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) und gemischt mit dem Adjuvant Titermax™ oder mit Freunds kompletten Adjuvant (primäre Injektion) und Freunds unvollständigen Adjuvant (folgende Injektion) hergestellt worden. Die resultierenden Kaninchenser sind auf ihre Reaktivität mit rmetHu-Leptin 1–146 getestet worden und die Seren von jenen Kaninchen, mit dem höchsten Titer, sind gepoolt worden und über eine Actigel-ALD Superflow® (Sterogene #2701-S-01), welche mit rmet-Hu-Leptin gekoppelt war, affinitätsgereinigt worden. Ein Aliquot des gereinigten polyklonalen Antikörpers ist an Meerrettich-Peroxidase (HRP, Sigma® P-8415) gekoppelt worden, um als Detektionsantikörper in einem Sandwich-Enzym-Imunoassay (EIA) oder Western verwendet zu werden.

Monoklonale Antikörper.

[0291] Anti-rmetHu-Leptin 1–146 monoklonale Antikörper wurden aus Lou-Ratten entwickelt, welchen mehrfach mit KLH konjugiertes rmetHu-Leptin 1–146 injiziert worden war, gemischt mit Freunds kompletten Adjuvant (primäre Injektion) oder mit Freunds unvollständigem Adjuvant (nachfolgende Injektion). Die Rattenserien sind auf ihre Reaktivität mit rmetHu-Leptin 1–146 hin getestet worden und die Milzzellen aus jenen mit den höchsten Titern sind mit der Ratten Myelomalinie Y3Ag 1.2.3 durch Standard-Hybridomtechniken fusioniert worden. Die Hybridzellen sind in 96-Lochplatten platziert worden, es wurde zugelassen, daß sie Kolonien bilden, auf Anti-rmetHu-Leptin 1–146-Aktivität getestet worden und Einzelzelle kloniert worden. Monoklonale Antikörper aus Rattenhybridoma sind als eine Komponente des Leptin Sandwich EIA verwendet worden.

Sandwich-Assay.

[0292] Mikrotiterplatten (96-Loch-Standard [Immulon®] oder Halbloch [Costar®]) sind mit jeweils 75 µl oder 30 µl entweder polyklonalen (1,5 µg/ml) oder monoklonalen (2,0 µg/ml) Antikörper in Carbonat-/Bicarbonatpuffer (NaHCO₃ 0,029 M, Na₂CO₃ 0,015 M, pH 9,6) beschichtet worden. Die Platten sind blockiert worden (1% Rinderserumalbumin) [BSA], 5% Saccharose) und die Proben, entsprechend in 2% BSA in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) verdünnt, sind in Duplikat den Lochen hinzugefügt worden. Jeder Mikrotiterplatte ist auch, in dreifacher Ausfertigung, ein Satz von r-metHu-Leptin-Standards hinzugefügt worden, oder glykosilierte Leptinstandards, welche den Bereich von 90 bis 4580 pg/ml abdecken. Die Platten wurden bei 4°C für 18 Stunden inkubiert, aspiriert und drei Mal mit Waschpuffer (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM, Tween® 20 0,05%, pH 7,35 [TEN]) gewaschen und HRP-konjugiertes polyklonales Anti-rmetHu-Leptin 1–146 wurde hinzugefügt, ungefähr 70 ng/ml in 2% BSA in PBS mit 0,05% Tween® 20. Die Platten wurden bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert, fünf Mal mit TEN gewaschen und mit TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin) gemäß der Herstellerangaben (Kirkegaard and Perry #50-76-00, Gaithersburg, MD 20879) farblich entwickelt. Die Absorption wurde bei 450 nm in einem Mikroplattenlesegerät gemessen. Die Leptinkonzentrationen sind aus einer Standardkurve, welche für jede Platte hergestellt worden war, kalkuliert worden, nach Abzug der Hintergrundfärbung. Die Assaysensitivität war annährend 90 pg/ml; die Inter- und Intra-Assayvariationen, berechnet aus den

Kontrollen, welche jeder Mikroplatte inbegriffen waren, war jeweils 7,5% und 5,4%.

2. Kohlenhydratanalyse durch Western Blotting.

[0293] Im Allgemeinen ist, je größer das Molekulargewicht des glykosierten Leptinproteins der vorliegenden Erfindung ist, desto stärker ist es glykosiert. Somit ist die vorliegende Western Blot Typ-Analyse verwendet worden, um die Menge an Kohlenhydraten, welche auf den exprimierten glykosierten Leptinproteinen vorhanden ist, zu bestimmen.

[0294] Ein Volumen eines Überstandes, welcher ungefähr 400–600 pg des glykosierten Leptinproteins aus COS- oder CHO-Zellenenthält, die mit glykosierten Leptinprotein cDNAs transfiziert waren, wie oben beschrieben, ist mit SDS-PAGE 3 × Probenpuffer (0,1875 M Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS, 30% Glycerol, 15% 2-Mercaptoethanol) gemischt worden. Die Proben wurden durch eine 14% Acrylamid Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Novex®) analysiert und auf eine 0,45 µm Nitrocellosemembran (Novex®) transferiert. Die Nitrocellulosemembran wurde gespült, mit TBST (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween® 20 0,08%) blockiert, welches 10% FBS und 2% BSA enthält, und mit HRP-konjugiertem polyklonalen Anti-rmetHu-Leptin 1–146, wie oben hergestellt (140 ng/ml, in TBST, umfassend 5% FBS und 1% BSA) für 3–5 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen mit TBST, fünf Mal, jeweils fünf Minuten, ist die Membran mit ECL-Reagenz (Amersham®) gemäß den Herstellerangaben entwickelt worden. Die Membran wurde einem X-Omat® AR Film (Kodak®) für zehn bis sechzig Sekunden ausgesetzt und wie für Standard-X-Ray-Filme entwickelt. Spezifische Proteinbinden sind visualisiert worden und ihre Größen aufgrund ihrer Positionen im Verhältnis zu den Molekulargewichtsmarkern geschätzt. Je größer die Größe, desto mehr Kohlenhydratreste sind an das Protein gebunden.

Behandlung mit N-Glykanase.

[0295] Eine N-Glykanase-Behandlung entfernt die N-verknüpften Kohlenhydrate, was eine Erhöhung der Mobilität zur Folge hat, die gleich der von unglykosiertem Leptin ist. Die Behandlung von glykosierten Leptinproteinen mit N-Glykanase hat ein Molekulargewicht zur Folge, was dem von unglykosierten Leptin ähnlich ist. Das bestätigt, daß die zugenommene Größe von glykosierten Leptinproteinen auf die N-verknüpften Kohlenhydrate zurückzuführen ist.

Methoden.

[0296] COS-Zellen konditioniertes Medium, welches 400 pg von glykosiertem Leptinprotein (1–3 µl) enthält, wurde mit 10 µl 0,5% SDS gemischt und jede Probe wurde für 3 Minuten gekocht. Dann wurden 10,5 µl von 0,5 M NaPO4 pH 8,6 + 7,5% nonidet P40 mit 3 µl von 250 unit/ml N-Glykanase (Genzyme®) versetzt. Jede Probe ist über Nacht bei 37°C inkubiert worden und dann ist die Reaktion durch die Hinzufügung von SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt worden und einer SDS-PAGE Western-Analyse, wie oben beschrieben, unterworfen worden. Diese Ergebnisse zeigen an, daß die reduzierte Mobilität, die auf einem SDS-PAGE beobachtet wird, auf die Hinzufügung der N-verknüpften Kohlenhydrate zurückzuführen ist. Die Tatsache, daß zahlreiche glykosilierte Leptinproteine identifiziert worden sind, zeigt an, daß viele Positionen im Leptin vorhanden sind, welche eine N-verknüpfte Kohlenhydrathinzufügung unterstützen. Ähnliche Ergebnisse sind erhalten worden, wenn die Analoge in 293-Zellen exprimiert worden sind. In gleicher Weise, wenn Leptinproteine mit mehrfachen Glykosilierungsstellen mit N-Glykanase behandelt worden sind, war ihre Mobilität auch auf die von unglykosierten Leptinen verändert, was anzeigt, daß die Mobilitätsunterschiede auf das Vorhandensein von N-verknüpften Kohlenhydraten zurückzuführen sind.

[0297] Während die Erfindung so beschrieben worden ist, worin sie als bevorzugte Ausführungsformen betrachtet wird, ist sie nicht auf die offensichtlichen Ausführungsformen einzuschränken, ganz im Gegensatz, ist es beabsichtigt, verschiedene Modifikationen und Äquivalente, die in den angefügten Ansprüchen umfasst sind, deren Umfang entsprechend der breitesten Interpretation entspricht, so daß all solche Modifikationen und Äquivalente umfaßt sind, abzudecken.

Sequenzprotokoll

<110> AMGEN INC.

<120> GLYKOSYLIERTE LEPTINZUSAMMENSETZUNGEN UND ZUGEHÖRIGE VERFAHREN

<130> A – 549

<140> 09/249,675

<141> 1999 – 02 – 12

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 146

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: rHu-Leptin 1 bis 146

<400> 1

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

<210> 2
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: rhu-Leptin 1 bis 145

<400> 2

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 Ser Val Ser Ser Lys
 20 25 30

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

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

Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
 65 70 75 80

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

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

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

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

Cys
 145

<210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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
 20

<210> 4
 <211> 22
 <212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifiziertes humanes Leptin-Signal-Peptid

<400> 4

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1 5 10 15
Phe Tyr Val Ser Pro Ser
20

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifiziertes humanes Leptin-Signal-Peptid

<400> 5

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1 5 10 15
Phe Tyr Val Ser Pro
20

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifiziertes humanes Leptin-Signal-Peptid

<400> 6

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1 5 10 15
Phe Tyr Val Ser Pro Ala
20

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifiziertes humanes Leptin-Signal-Peptid

<400> 7

Met	His	Trp	Gly	Thr	Leu	Cys	Gly	Phe	Leu	Trp	Leu	Trp	Pro	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Phe Tyr Val Ser Asn Ser															
20															

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5				10					15		
Ala Val Phe Val Ser Pro Ser															
20															

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5				10					15		
Ala Val Phe Val Ser Pro															
20															

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifiziertes tPA-Signal-Pept

<400> 10

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5				10					15		
Ala Val Phe Val Ser Asn Ser															
20															

<210> 11
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifiziertes tPA-Signal-Peptid

<400> 11

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1														15	
Ala Val Phe Val Ser Pro Ala															
20															

<210> 12
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin/tPA-Signal-Peptid

<400> 12

Met	His	Trp	Gly	Thr	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Val
1														15	
Phe Val Ser Pro Ser															
20															

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin/tPA-Signal-Peptid

<400> 13

Met	His	Trp	Gly	Thr	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Val
1														15	
Phe Val Ser Pro															
20															

<210> 14

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

atgcattggg gaaccctgtg cggattcttg tggctttggc cctatcttt ctagtccaa 60
gct 63

<210> 15

<211> 66

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifizierte humane Leptin-Signal-Peptid-DNA

<400> 15

atgcattggg gaaccctgtg cggattcttg tggctttggc cctatcttt ctagtttcg 60
cccagc 66

<210> 16

<211> 63

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifizierte humane Leptin-Signal-Peptid-DNA

<400> 16

atgcattggg gaaccctgtg cggattcttg tggctttggc cctatcttt ctagtttcg 60
ccc 63

<210> 17

<211> 66

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifizierte humane Leptin-Signal-Peptid-DNA

<400> 17

atgcattggg gaaccctgtg cggattcttg tggctttggc cctatcttt ctagtttcg 60
cccgt 66

<210> 18

<211> 66

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifizierte humane Leptin-Signal-Peptid-DNA

<400> 18

atgcattggg gaaccctgtg cgccattc⁶⁵tg tggcttggc cctatctttt ctagtttcg 60
aacagc . 66

<210> 19

<211> 68

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgggtggagc agtcttcgtt 60
tcgcccag . 68

<210> 20

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgggtggagc agtcttcgtt 60
tcgccc . 66

<210> 21

<211> 69

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifizierte humane tPA-Signal-Peptid-DNA

<400> 21

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgggtggagc agtcttcgtt 60
tcgaacagc . 69

<210> 22

<211> 69

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: modifizierte humane tPA-Signal-Peptid-DNA

<400> 22

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgggtggagc agtcttcgtt 60
tcgccccgt

<210> 23

<211> 63

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin/tPA-Signal-Peptid-DNA

<400> 23

atgcattggg gaaccctgtg ctgtgtgctg ctgctgtgtg gagcagtctt cgtttcgccc 60
agc 63

<210> 24

<211> 60

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin/tPA-Signal-Peptid-DNA

<400> 24

atgcattggg gaaccctgtg ctgtgtgctg ctgctgtgtg gagcagtctt cgtttcgccc 60

<210> 25

<211> 438

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 2, 47, 69-DNA

<400> 25

```

gtgaacatca caaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgcaccagg 60
atcaatgaca tttcacacac gcagtcagtc tcctccaaac agaaagtac cggtttggac 120
ttcattcctg ggcicccacaa catcacgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
taccaacaga tcctcaccag tatgaattcc acaaacgtga tccaaatac caacgacctg 240
gagaacctcc gggatcttct tcacgtgcig gccttctcta agagctgcca ctggccctgg 300
gccagtggcc tggagacctt ggacagccig ggggggtgtcc tggaaagcttc aggctactcc 360
acagaggtgg tggccctgag caggctgcag gggctctgc aggacatgct gtggcagctg 420
gacctaagcc ctgggtgc                                         438

```

<210> 26

<211> 146

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 2, 47, 69-Protein

<400> 26

Val	Asn	Ile	Thr	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	Asn	Ile
							35	40				45			

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

Leu	Thr	Ser	Met	Asn	Ser	Thr	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

<210> 27

<211> 438

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 2, 47, 69, 92-DNA

<400> 27

```

gtgaacatca caaaagtcca agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgcaccagg 60
atcaatgaca ttcacacac gcagtcagtc tcctccaaac agaaagtca cgggtggac 120
ttcattcctg ggctccacaa catcagcacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
taccaacaga tcctcaccag tatgaattcc acaaactgtga tccaaatatac caacgacctg 240
gagaacctcc gggatcttct tcacgtgctg gcctaactcta ccagctgcca cttgcccctgg 300
gccagtggcc tggagacctt ggacagcctg ggggggtgtcc tggaaacttc aggtactcc 360
acagaggtgg tggccctgag caggctgcag gggctctgc aggacatgct gtggcagctg 420
gacctcagcc ctgggtgc                                438

```

<210> 28

<211> 146

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 2, 47, 69, 92-Protein

<400> 28

Val	Asn	Ile	Thr	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	Asn	Ile
					35			40				45			

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

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

Glu	Asn	Leu	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Val	Leu	Ala	Asn	Ser	Thr	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

<210> 29

<211> 438

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 2, 47, 69, 102-DNA

<400> 29

```

gtgaacatca caaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgcaccagg 60
atcaatgaca tttcacacac gcagtcagtc tcctccaaac agaaagtcaac cggttggac 120
ttcattcccg ggctccacaa catcacgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
taccaacaga tcctcaccag tatgaattcc acaaacgtga tccaaatatc caacgacctg 240
gagaaccccttgc gggatcttct tcacgtgctg gccttctcta agagctgcca cttgcccctgg 300
gcctatggca cggagacccctg ggacagcctg ggggggtgtcc tggaaagcttc aggctactcc 360
acagagggtgg tggccctgag caggctgctgagg gggctctgc aggacatgct gtggcagctg 420
gacccatggcc ctgggtgc                                         438

```

<210> 30

<211> 146

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 2, 47, 69, 102-Protein

<400> 30

```

Val Asn Ile Thr 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 Asn Ile
 35          40          45

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

Leu Thr Ser Met Asn Ser Thr 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 Asn Gly Thr 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

```

<210> 31

<211> 438

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 47, 69, 102-DNA

<400> 31

```

gtgccatcc aaaaagtcga agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgcaccagg 60
atcaatgaca ttccacacac gcagtcgtc tcctccaaac agaaagtac cggttggac 120
ttcattctg ggctccacaa catcacgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
taccaacaga tcctcaccag tatgaattcc acaaactgtga tccaaatac caacgacctg 240
gagaacctcc gggatcttca ctcgtctg gccttcata agacgtcc cttgcctgg 300
gccaatggca cggagacctt ggacagcctg ggggtgtcc tggaaagcttc aggtactcc 360
acagaggtgg tggccctgag caggctcag gggctctgc aggacatgt gtggcagctg 420
gacctcagcc ctgggtgc 438

```

<210> 32

<211> 146

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 47, 69, 102-Protein

<400> 32

```

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 Asn Ile
 35          40          45

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

Leu Thr Ser Met Asn Ser Thr 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 Asn Gly Thr 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

```

<210> 33

<211> 438

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 2, 47, 69, 92, 102-DNA

<400> 33

```

gtgaacatca caaaaagtcca agatgacacc aaaaaccctca tcaagacaat tgtcaccagg 60
atcaatgaca tttcacacac gcagtcagtc tcctccaaac agaaaagtcac cggttggac 120
ttcattcctg ggctccacaa catcaccgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
taccaacaga tcctcaccag tatgaattcc acaaacgtga tccaaatatac caacgacctg 240
gagaacctcc gggatcttct tcacgtgctg gccaactcta ccagctgccca cttgccctgg 300
gccaatggca cggagacctt ggacagcctg ggggtgtcc tggaaagcttc aggctactcc 360
acagaagggtgg tggccctttag caggctgcag gggctctgc aggacatgt gtggcagctg 420
gacctcagcc ctgggtgc                                438

```

<210> 34

<211> 146

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 2, 47, 69, 92, 102-Protein

<400> 34

```

Val Asn Ile Thr 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 Asn Ile
 35          40          45

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

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

Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Asn Ser Thr Ser Cys
 85          90          95

His Leu Pro Trp Ala Asn Gly Thr 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

```

<210> 35

<211> 438

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 47, 69, 92, 102-DNA

<400> 35

```

gtgcccattcc aaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgcaccagg 60
atcaatgaca ttccacacac gcagtcagtc tcctccaaac agaaagtca cggggggac 120
ttcattctcg ggctccacaa catcacgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
taccaacaga tcctcaccag tatgaattcc acaaacgtga tccaaatac caacgacctg 240
gagaacctcc gggatctt tcacgtgctg gccaactcta ccagctgcca ctggccctgg 300
gccaatggca cggagacctt ggacagcctg ggggtgtcc tggaaqcttc aggctactcc 360
acagaggtgg tggccctgag caggctgcag qggctctgc aggacatgct gtggcagctg 420
gacctcagcc ctgggtgc 438

```

<210> 36

<211> 146

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Leptin 47, 69, 92, 102-Protein

<400> 36

```

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 Asn Ile
 35          40          45

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

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

Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Asn Ser Thr Ser Cys
 85          90          95

His Leu Pro Trp Ala Asn Gly Thr 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

```

Patentansprüche

1. Glykosyliertes Leptin-Protein, umfassend SEQ ID NR. 1, das eine oder mehrere Sequenzveränderungen als eine Stelle der Glykosylierung aufweist, ausgewählt aus (wobei „T/S“ Threonin oder Serin angibt):
 - (a) 01V → N 02P → X (worin X jede Aminosäure außer Prolin ist) 03I → T/S
 - (b) 02P → N 03I 04Q → T/S
 - (c) 23D → N 24I 25S → T/S
 - (d) 47P → N 48I 49L → T/S
 - (e) 48I → N 49L 50 T/S
 - (f) 69P → N 70S 71R → T/S
 - (g) 92F → N 93S 94K → T/S

- (h) 101A → N 102S 103G T/S
- (i) 102S → N 103G 104L → T/S
- (j) 103G → N 104L 105E → T/S

2. Glykosyliertes Leptin-Protein, umfassend Aminosäuren 1–146 von SEQ ID NR. 1, das zwei Glykosylierungsstellen aufweist, wobei die zwei Stellen ausgewählt sind aus (mit Bezug auf die Numerierung von SEQ ID NR. 1):

47 + 69;
48 + 69;
69 + 101;
69 + 102;
69 + 103;
69 + 118; und
100 + 102.

3. Glykosyliertes Leptin-Protein, umfassend Aminosäuren 1–146 von SEQ ID NR 1, das drei Glykosylierungsstellen aufweist, wobei die drei Stellen ausgewählt sind aus (im Hinblick auf die Numerierung von SEQ ID NR. 1):

2 + 47 + 69
23 + 47 + 69;
47 + 69 + 100;
47 + 69 + 102;
48 + 69 + 118;
69 + 102 + 118; und
64 + 103 + 118.

4. Glykosyliertes Leptin-Protein, umfassen Aminosäuren 1–146 von SEQ ID NR. 1, das vier Glykosylierungsstellen aufweist, wobei die vier Stellen ausgewählt sind aus (im Hinblick auf die Numerierung von SEQ ID NR. 1):

2 + 47 + 69 + 92;
2 + 47 + 69 + 102;
23 + 47 + 69 + 92;
23 + 47 + 69 + 102; und
47 + 69 + 100 + 102.

5. Glykosyliertes Leptin-Protein, umfassen Aminosäuren 1–146 von SEQ ID NR. 1, das fünf Glykosylierungsstellen aufweist, wobei die fünf Stellen ausgewählt sind, aus (im Hinblick auf die Numerierung von SEQ ID NR. 1):

2 + 23 + 47 + 69 + 92
2 + 47 + 69 + 92 + 102
23 + 47 + 69 + 92 + 102.

6. Glykosyliertes Leptin 2, 47, 69 nach Anspruch 3, umfassend die Aminosäuresequenz (SEQ ID NR. 26):

```

1  VNITKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTLGLD FIPGLHNITT
51  LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL AFSKSCHLPW
101 ASGLETLDL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

```

7. Glykosyliertes Leptin 2, 47, 69, 92 nach Anspruch 4, umfassend die Aminosäuresequenz (SEQ ID NR. 28):

```

1  VNITKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTLGLD FIPGLHNITT
51  LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL ANSTSCHLPW
101 ASGLETLDL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

```

8. Glykosyliertes Leptin 2, 47, 69, 102 nach Anspruch 4, umfassen die Aminosäuresequenz (SEQ ID NR. 30):

1 **VNITKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT**
 51 **LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL AFSKSCHLPW**
 101 **ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC**

9. Glykosyliertes Leptin 47, 69, 102 nach Anspruch 3, umfassen die Aminosäuresequenz (SEQ ID NR. 32):

1 **VPIQKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT**
 51 **LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL AFSKSCHLPW**
 101 **ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC**

10. Glykosyliertes Leptin 2, 47, 69, 92, 102 nach Anspruch 5, umfassend die Aminosäuresequenz (SEQ ID NR. 34):

1 **VNITKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT**
 51 **LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL ANSTSCHLPW**
 101 **ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC**

11. Glykosyliertes Leptin 47, 69, 92, 102 nach Anspruch 4, umfassend die Aminosäuresequenz (SEQ ID NR. 36):

1 **VPIQKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT**
 51 **LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL ANSTSCHLPW**
 101 **ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC**

12. Glykosyliertes Leptin-Protein nach Anspruch 1, das eine N-terminale Reste-Sequenz ausgewählt aus: einem Serin-, Arginin-, Prolin- oder Alaninrest an der -1 Position, einem Serin an der -1 Position und einem Prolin an der -2 Position, einer Serin-Prolin-Serin Sequenz an den -1, -2 und -3 Positionen, einem Serin an der -1 Position und einem Arginin an der -2 Position, einem Serin an der -1 Position, ein Arginin an der -2 Position und ein Serin an der -3 Position, ein Arginin an der -1 Position und einem Serin an der -2 Position; und einem Alanin an der -1 Position und Prolin an der -2 Position aufweist.

13. Nukleinsäure, kodierend für ein glykosyliertes Leptin-Protein nach Anspruch 1.

14. Nukleinsäure, die für ein glykosyliertes Leptin 2, 47, 69 kodiert, umfassend die Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NR. 25):

1 **GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCTCA TCAAGACAAT**
 51 **TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC**
 101 **AGAAAGTCAC CGGTTGGAC TTCATTCTG GGCTCCACAA TATCACGACC**
 151 **TTATCCAAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAAG**
 201 **TATGAATTCC ACAAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC**
 251 **GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCTTCTCTA AGAGCTGCCA CTTGCCCTGG**
 301 **GCCAGTGGCC TGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGTGTCC TGGAAAGCTTC**
 351 **AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCCAG GGGTCTCTGC**
 401 **AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTAAGCC CTGGGTGCC**

15. Nukleinsäure, die für ein glykosyliertes Leptin 2, 47, 69, 92 kodiert, umfassend die Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NR. 27):

```

1  GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCCTCA TCAAGACAAT
51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTTCATTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
201 TATGAATTCC ACAAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCAACTCTA CCAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAGTGGCC TGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGTC

```

16. Nukleinsäure, die für ein glykosyliertes Leptin 2, 47, 69, 102 kodiert, umfassend die Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NR. 29):

```

1  GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCCTCA TCAAGACAAT
51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTTCATTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
201 TATGAATTCC ACAAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCTTCTCTA AGAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGTC

```

17. Nukleinsäure, die für ein glykosyliertes Leptin 47, 69, 102 kodiert, umfassend die Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NR. 31):

```

1  GTGCCCATCC AAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCCTCA TCAAGACAAT
51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTTCATTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
201 TATGAATTCC ACAAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCTTCTCTA AGAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGTC

```

18. Nukleinsäure, die für ein glykosyliertes Leptin 2, 47, 69, 92, 102 kodiert, umfassend die Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NR. 33):

```

1  GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCTCA TCAAGACAAAT
51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
201 TATGAATTCC ACAAAACGTGA TCCAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCAACTCTA CCAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

```

19. Nukleinsäure, die für ein glykosyliertes Leptin 47, 69, 92, 102 kodiert, umfassend die Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NR. 35):

```

1  GTGCCCATCC AAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCTCA TCAAGACAAAT
51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
201 TATGAATTCC ACAAAACGTGA TCCAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCAACTCTA CCAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

```

20. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure, die für ein glykosyliertes Leptin nach einem der Ansprüche 13 bis 19 kodiert.

21. Vektor nach Anspruch 20, der ein Expressionsvektor ist.

22. Wirtszelle, enthaltend eine Nukleinsäure, die für ein glykosyliertes Leptin-Protein nach Anspruch 1 kodiert.

23. Wirtszelle nach Anspruch 22, ausgewählt aus prokaryontischen und eukaryontischen Zellen.

24. Prokaryontische Wirtszelle nach Anspruch 23, die eine bakterielle Zelle ist.

25. Eukaryontische Wirtszelle nach Anspruch 23, die ausgewählt ist aus Säugerzellen, Hefezellen und Insektenzellen.

26. Säugerwirtszelle nach Anspruch 25, ausgewählt aus menschlichen Zellen, Affenzellen, BHK Zellen und CHO Zellen.

27. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 1, umfassend:

(a) Kultivieren einer Zelle, die eine Nukleinsäure enthält, die für das glykosylierte Leptin-Protein kodiert, unter geeigneten Bedingungen für die Expression; und
 (b) Erhalten des Proteins.

28. Pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen Injektion, intravenösen Injektion, subkutanen Injektion, intratekalen Verabreichung, nasalen Verabreichung, pulmonaren Verabreichung und osmotische Pumpen-Verabreichung, umfassen ein glykosyliertes Leptin-Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 12 in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger.

29. Glykosyliertes menschliches Leptin nach Anspruch 1 zur Verwendung in einem Verfahren der Behandlung eines Menschen gegen einen Zustand ausgewählt aus Fettsucht, Diabetes und hohem Blutfettgehalt-Ef-

fekten; wobei das Verfahren Verabreichen einer effektiven Menge des Leptins umfaßt.

30. Leptin nach Anspruch 29, wobei die effektive Menge des glykosylierten menschlichen Leptins durch Gentherapie verabreicht wird.

31. Selektives Bindungsmolekül, das für ein glykosyliertes Leptin-Protein nach Anspruch 1 selektiv ist, wobei das Molekül ausgewählt ist aus einem polyklonalen Antikörper, einem monoklonalen Antikörper und einem rekombinannten Antikörper.

32. Selektives Bindungsmolekül nach Anspruch 31, wobei das Molekül ein monoklonaler Antikörper ist.

33. Verfahren zur Herstellung eines glykosylierten Leptin-Proteins nach Anspruch 27, umfassend:

- (a) Kultivieren einer Wirtszelle unter geeigneten Bedingungen für die Expression, die eine DNA Sequenz enthält, die, in der 5' zu 3' Richtung, (i) ein Signalpeptid und (ii) eine DNA, die für ein glykosyliertes Leptin-Protein nach Anspruch 1 kodiert, umfaßt; und
- (b) Erhalten des glykosylierten Leptin-Proteins.

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das Signalpeptid ausgewählt ist aus:

- (a) (SEQ ID NR. 3) (natives menschliches Leptin-Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVQA

- (b) (SEQ ID NR. 4) (modifiziertes menschliches Leptin-Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVSP

- (c) (SEQ ID NR. 5) (modifiziertes menschliches Leptin-Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVSP

- (d) (SEQ ID NR. 6) (modifiziertes menschliches Leptin-Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVSPA

- (e) (SEQ ID NR. 7) (modifiziertes menschliches Leptin-Signalpeptid)

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVSNS

- (f) (SEQ ID NR. 8) (natives menschliches tPA Signalpeptid)

MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPS

- (g) (SEQ ID NR. 9) (natives menschliches tPA Signalpeptid)

MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSP

- (h) (SEQ ID NR. 10) (modifiziertes tPA Signalpeptid)

MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSNS

- (i) (SEQ ID NR. 11) (modifiziertes tPA Signalpeptid)

MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPA

- (j) (SEQ ID NR. 12) (Leptin/tPA Signalpeptid)

MHWGTLCCVLLLCGAVFVSPA

- (k) (SEQ ID NR. 13) (Leptin/tPA Signalpeptid)

MHWGTLCCVLLLCGAVFVSP

35. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das Signalpeptid ausgewählt ist aus dem Signalpeptid für: Erythropoitin, Faktor VIII, beta-Interferon, Serumalbumin, Insulin, von Willebrand Faktor, CD11a, IgG, Follistatin, intrinsischer Faktor, G-CSF, Zeruloplasmin und LAMP-1.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

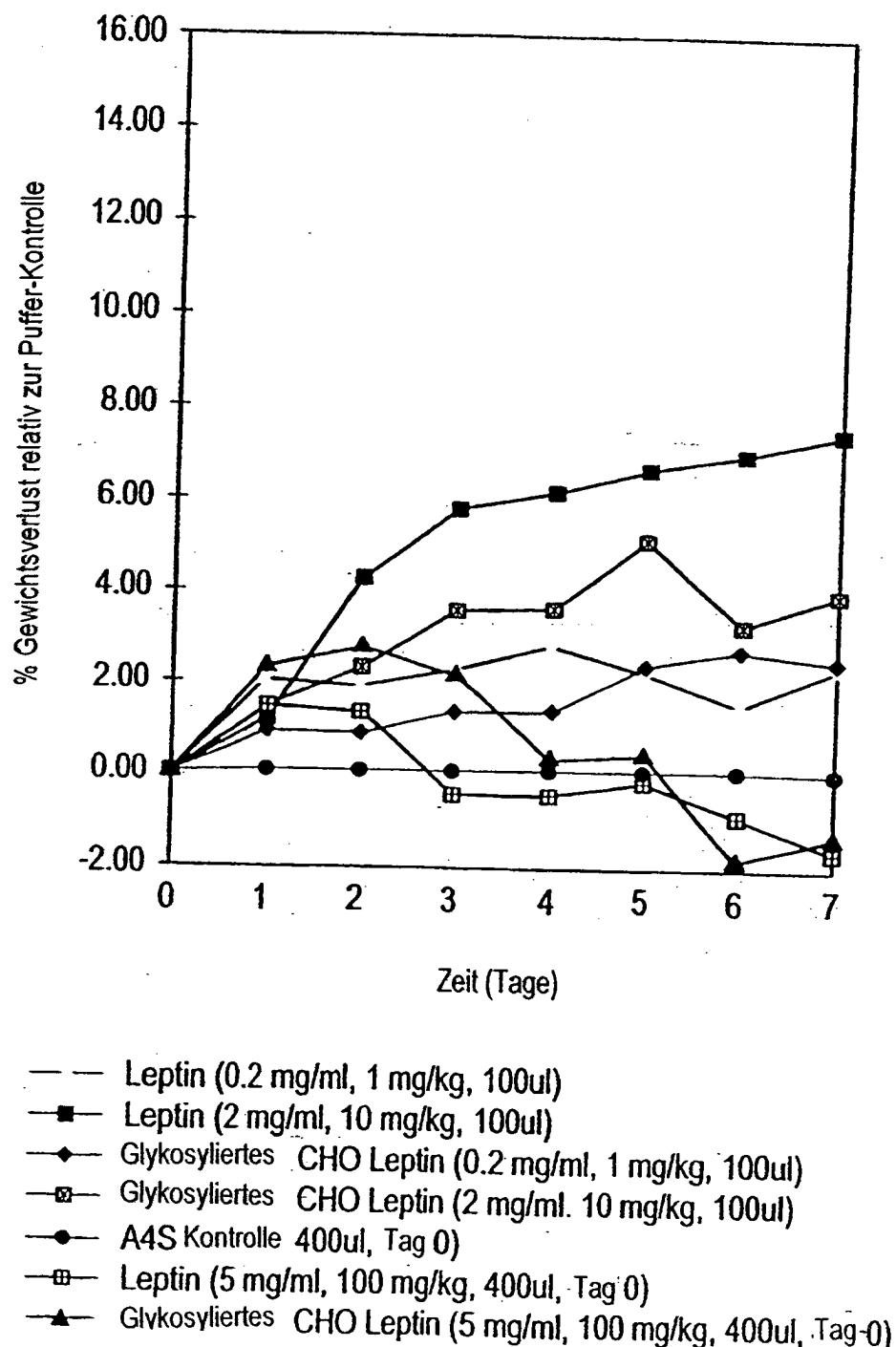


FIG. 2

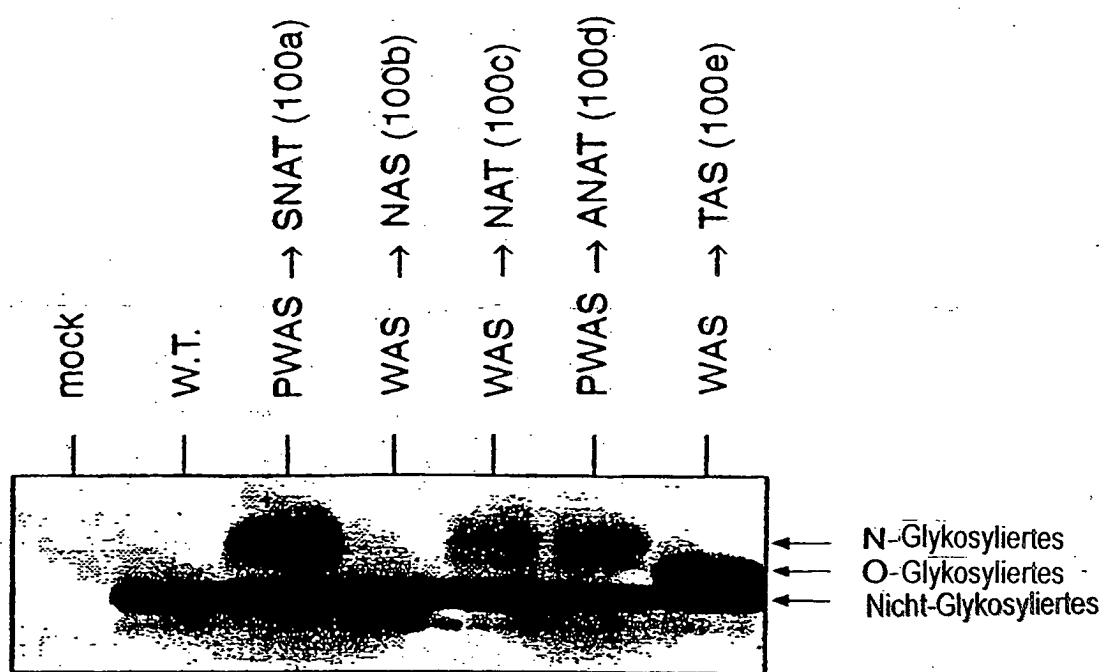


FIG. 3

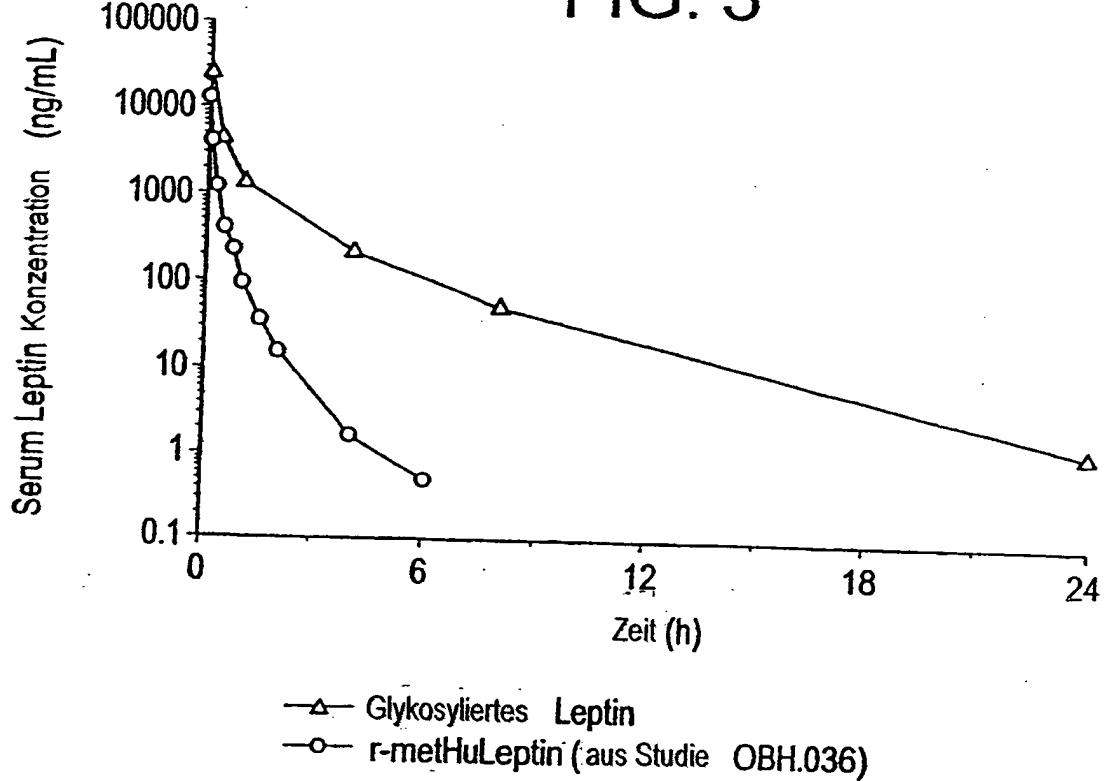


FIG. 4

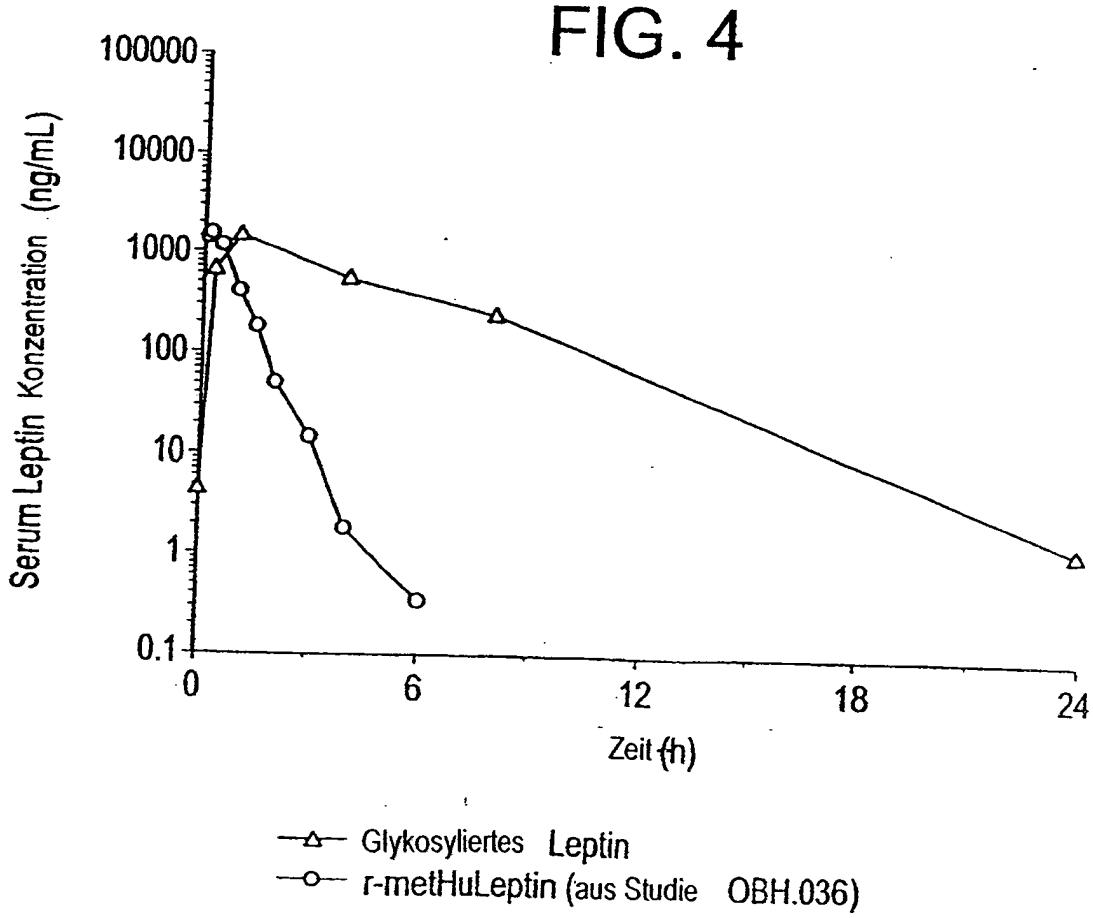


FIG. 5

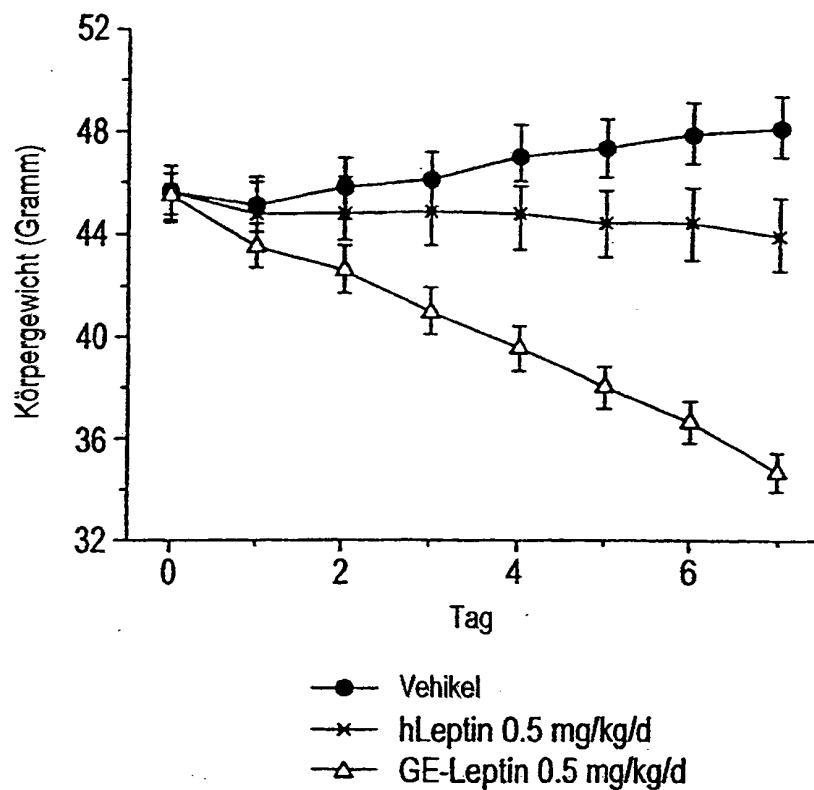


FIG. 6

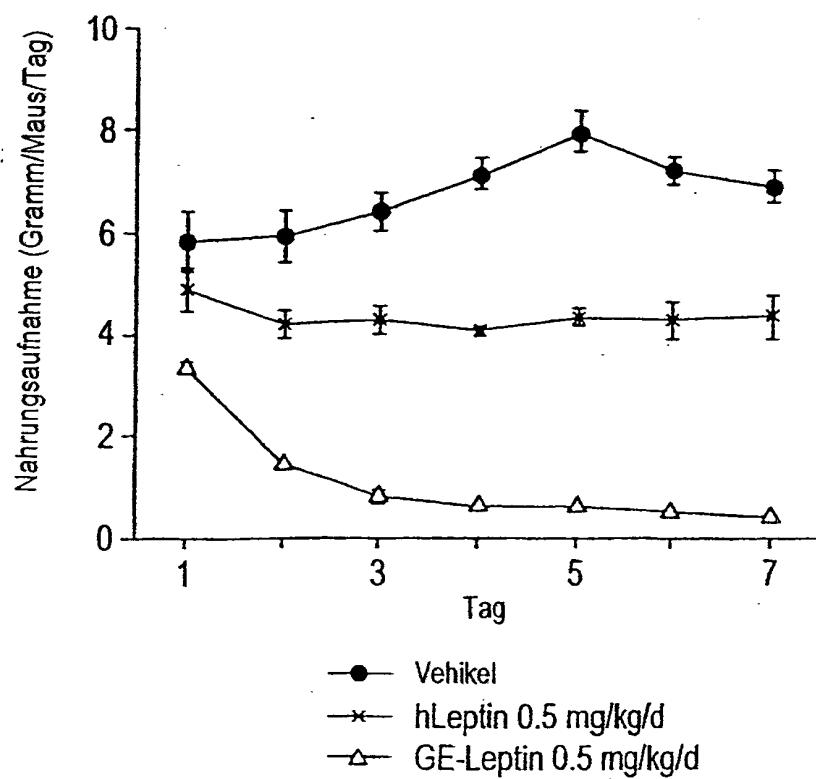


FIG. 7

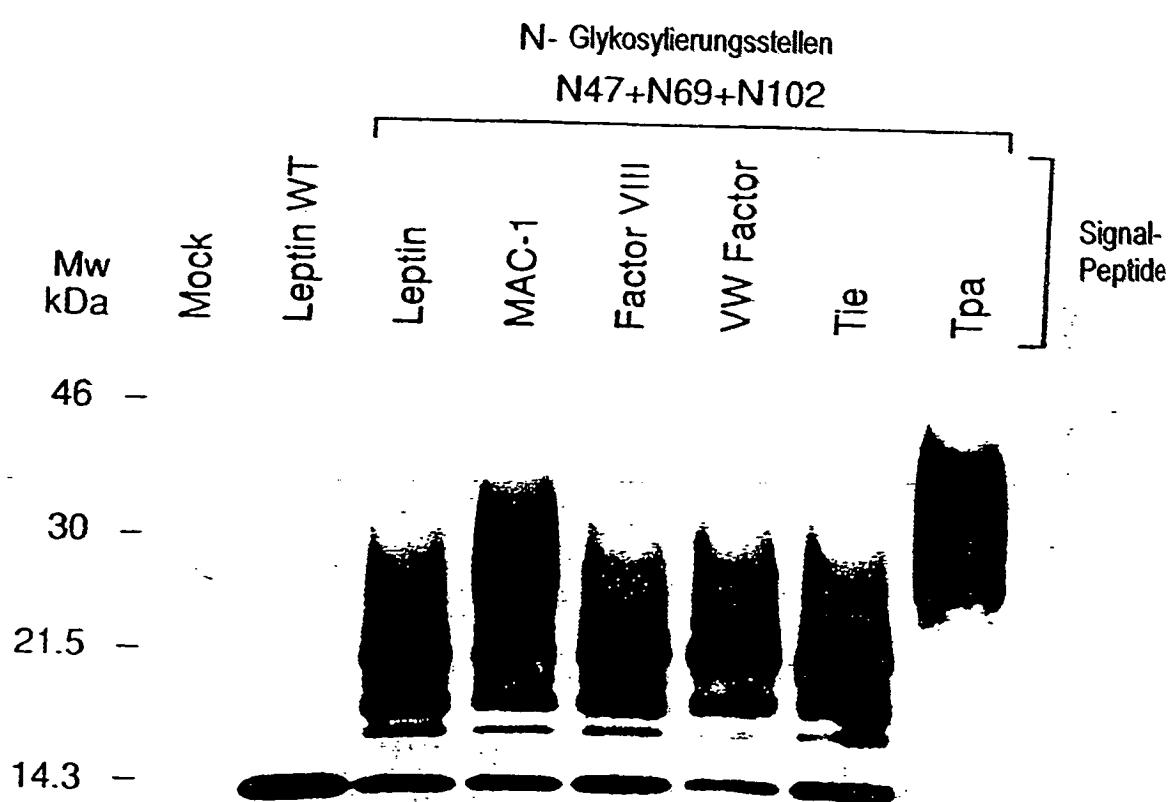


FIG. 8

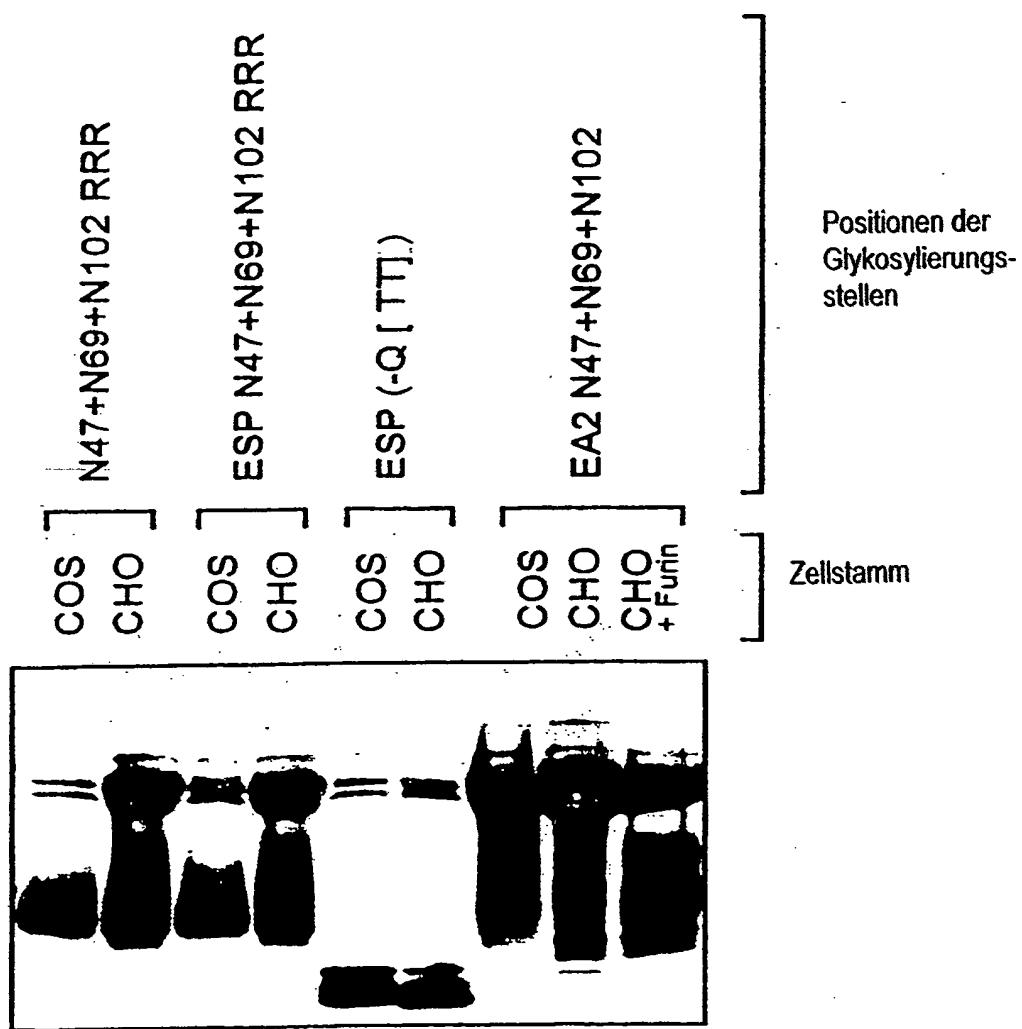


FIG. 9

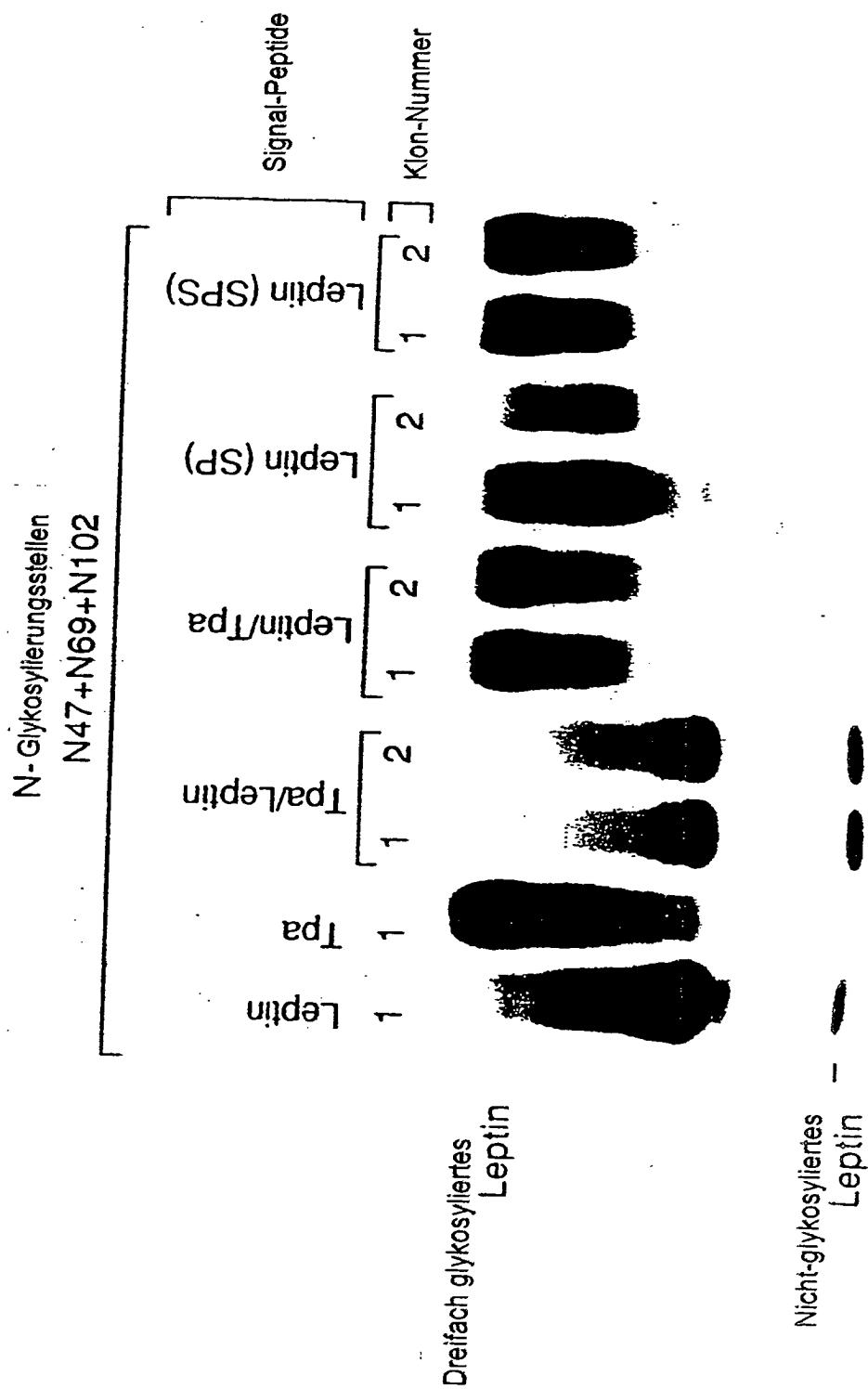


FIG. 10

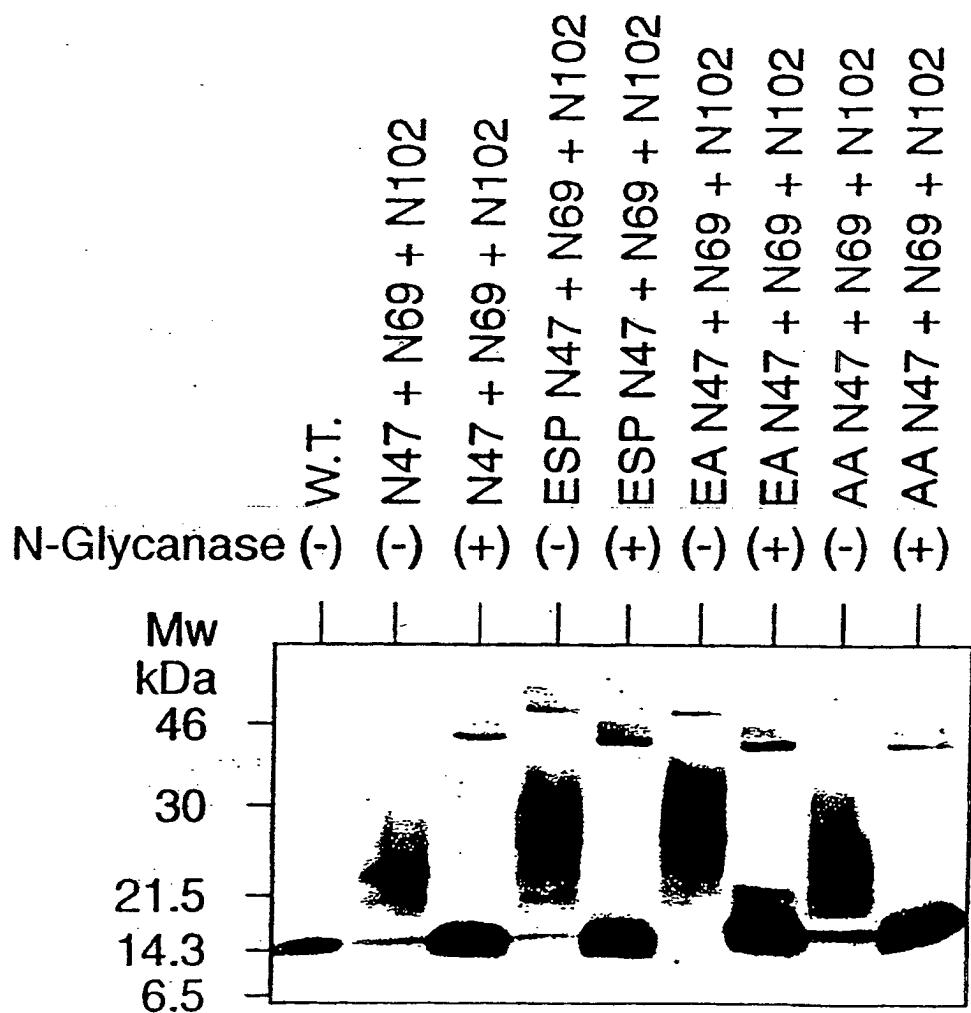


FIG. 11

