



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P960213 A2

HR P960213 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) MKP⁶: C 12 N 15/12
C 12 N 15/62
C 12 N 15/70
C 12 N 1/21
C 07 K 14/47
A 61 K 38/17
A 61 K 47/48
C 12 R 1/19

(21) Broj prijave: P960213A
(22) Datum podnošenja prijave patenta: 02.05.1996.
(43) Datum objave prijave patenta: 31.10.1997.

(31) Broj prve prijave: 08/435,777 (32) Datum podnošenja prve prijave: 05.05.1995. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
08/484,629 07.06.1995. US
(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta:

(71) Podnositelj prijave:
(72) Izumitelj:

F. Hoffmann - La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4002 Basel, CH
Arthur Campfield, 35 Depot Street, Verona, 07044 NJ, US
Rene Devos, Kaaistraat 24 Bus 1, 8400 Oostende, BE
Yves Guisez, Zandstraat 209, 8200 St-Andries Brugge, BE
Pascal Sebastian Bailon, 21 Woodbine Road, Florham Park, 06932 NJ, US

(74) Zastupnik:

CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.o.o., Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **REKOMBINANTNI OBESE (OB) PROTEINI**

(57) Sažetak: Proteini koji moduliraju tjelesnu težinu životinja i ljudi za liječenje, prevenciju i suzbijanje debljine i popratnih bolesti ili stanja, i rekombinantna ekspresija tih biološki aktivnih proteina u očišćenim i homogenim oblicima.

HR P960213 A2

O debljini se govori da je najopćenitiji nutritivni poremećaj zapadnog društva [Zhang, Y. i sur., Nature 372, 425-432 (1994)]. Više nego 3 od 10 odraslih Amerikanaca imaju barem za 20% veću težinu od svoje idealne težine [Zhang, Y. i sur., gore]. Povećana tjelesna težina opći je zdravstveni problem jer je povezan s medicinski važnim oboljenjima kao što je tip II dijabetesa (tj., diabetes mellitus koji ne ovisi o inzulinu), hipertenzija i hiperlipidemija [Grundy, S.M. i Barnett, Disease-a-Mouth 36, 645-696 (1990)]. Postoji dokaz da se tjelesna težina regulira fiziološki, a do ugojenosti (i s njom povezanih stanja ili bolesti) dolazi zbog djelomičnog poremećaja te regulacije [Zhang, Y. i sur., gore].

Kod glodavaca je opisano nekoliko jednostavnih mutacija gena koje rezultiraju debelim fenotipom, od kojih je pet prisutno kod miša. Od tih sedam modela kod glodavaca, jedan, koji je najtemeljitije proučavan, je *obese* (ob) mutacija gena kod miša, identificiran 1950. g. [Ingalls, A.M. i sur., J. Hered. 41, 317-318 (1950)]. Mišji homozigotani za tu ob mutaciju gena su neobično debeli, razvijaju diabetes mellitus, hiperfagični su i hipometabolički, jer dio sindroma nalikuje bolesnoj debljini čovjeka [Friedman J.M. i sur., Genomics 11, 1054-1062 (1991)]. Taj ob gen upisan je mišji proksimalni kromozom 6 i kodira protein (tj. ob protein) s ekspresijom u masnom tkivu [Zhang, Y. i sur., gore]. Mišji homozigutan za ob mutaciju gena ne proizvodi ili proizvodi vrlo malo tog proteina, i s tim u skladu ima defektnu regulaciju tjelesne težine koja vodi do gojaznosti.

Pacijentima koji pate od poremećaja ili mutacija njihovog odgovarajućeg *obese* (ob) gena, mogu se dati humani ili ob proteini murine, koji sprečavaju poremećaje ili mutacije ili ometaju produkciju i/ili funkciju ob proteina u modulaciji tjelesne težine. Zbog toga se ti proteini mogu upotrijebiti kao tvari slične hormonima za suzbijanje, prevenciju ili liječenje gojaznosti i njoj srodnih bolesti i stanja kod ljudi i životinja.

Kod takove upotrebe ob humanog ili proteina murine, ti proteini se mogu dati injekcijom različitim putevima, kao što je intraperitonealno, intravenski, intramuskularno ili subkutano, u čestim doziranjima. Budući da se često daju pomoću injekcije, važno je da humani ili ob proteini murine budu očišćeni, ponajprije do homogenosti, da su oslobođeni od kontaminirajućih proteinskih materijala, i rekombinantno umnoženi u topivom i biološki aktivnom obliku. Praktičari na tom području općenito znaju da te nečistoće, prisutne u injekcijskim lijekovima, mogu često dovesti do toksičnih neželjenih efekata ili do suprotnih imunoloških odgovora.

Dok su sekvencu ob gena obznani Zhang, Y. i sur., gore, ni jedna metoda ekspresije ob proteina murine ili njegovog humanog duplikata nije bila objavljena, a još manje proizvodnja tih proteina u biološki aktivnom i topivom stanju iz kojeg bi se proteini mogli očistiti do homogenosti. Zbog toga je važno, i to je predmet ovog izuma, umnožiti i proizvesti humane ili ob proteine murine u homogenom, topivom, i biološki aktivnom stanju.

Bilo je obznanjeno da je moguća ekspresija rekombinantnih humanih i ob proteina murine u biološki aktivnom i topivom stanju, i zatim čišćenje do homogenosti prikladne za ubrizgavanje pacijentima kod liječenja, prevencije ili kontrole gojaznosti i njoj srodnih stanja i bolesti, kao što je tip II dijabetesa, hipertenzija, hiperlipidemija i slično.

S skladu s ovim izumom, humani i ob proteini murine mogu se proizvesti rekombinantno u biološki aktivnom obliku i očistiti do homogenosti najprije konstrukcijom novih vektora ekspresije za *Escherichia coli* (E. coli). Ti vektori ekspresije sadrže promotor i DNA sekvencu, koja DNA sekvenca kodira fuzijski protein koji uključuje dva dijela: signalni peptid proteina A vanjske membrane od E. coli (tj. sOmpA) i humani ili protein ob murine. U skladu s ovim izumom, sljedeći korak proizvodnje biološki aktivnog rekombinantnog oblika humanog ili ob proteina murine je umetanje tog vektora ekspresije u domaćina E. coli, čime je dobije djelotvorna ekspresija i translokacija fuzijskog proteina u prostor periplazme (tj. između unutarnjih i vanjskih staničnih membrana mikroorganizma E. coli), u tom trenutku signalni peptid je izrezan iz ob proteina i napušta ob protein u topivom i biološki aktivnom obliku. Nadalje, ob proteini su djelotvorno izlučeni u topivom i biološki aktivnom obliku u stanicu oslobođeni od medija koji prati obradu stanica domaćina E. coli hladnim osmotskim šokom, nakon čega se ob proteini očiste do homogenosti uzastopnom primjenom kromatografije anionske izmjene, kromatografijom u koloni s hidrofobnom interakcijom i gel filtracijom, izvedenih tim redom.

Ovaj izum također je usmjeren na 1) vektor ekspresije koji sadrži DNA koja kodira protein koji uključuje sOmpA signalni peptid i humani ili ob protein murine; 2) na organizam domaćina transfektiran ili transformiran pomoću takovog vektora ekspresije; 3) na DNA sekvencu koja kodira humani ob protein; i 4) i polietilen-glikolne ili polipropilen-glikolne konjugate ob proteina.

Ovaj izum usmjeren je nadalje na metode ekspresije rekombinantnih humanih ili ob proteina murine u biološki aktivnom ili topivom stanju, i na proizvodnju tih proteina u očišćenom homogenom obliku prikladnom za davanje životinjama i ljudima.

Metoda ekspresije i proizvodnje proteina murine u skladu s ovim izumom ostvarena je upotrebom ob gena murine kako su opisali Zhang Y., i sur., gore, sekvence čiji gen je 702 parova baza (bp) i koja je nukleotidna sekvenca identificirana ovdje kao SEQ ID NO: 1. Ta sekvenca ob gena murine uključuje kodnu sekvencu od 501 bp ili otvoren okvir čitanja (ORF) koja započinje sa startnim kodonom na nukleotidu 36 i završava sa završnim kodonom na nukleotidu 537, i ima neprevedenu sekvencu na oba kraja, 3' i 5'. ORF sadrži signalnu sekvencu od 63 bp od nukleotida 36 do 98.

Ova sekvenca ob gena murine (SEQ ID NO: 1) kodira ob protein murine (plus njenu signalnu sekvencu) čija sekvenca amino kiselina ima duljinu od 167 amino kiselina i identificirana je kao SEQ ID NO: 2. U tom proteinu, SEQ ID NO: 2, prvih 21 amino kiseline predstavljaju signalnu sekvencu ob proteina murine. Zreli ob protein murine (bez svoje signalne sekvence) proteže se od 22 amino kiseline (Val) do amino kiseline 167 (Cys) i predstavljen je sa SEQ ID NO: 3.

Metoda ekspresije i proizvodnje humanog ob proteina u skladu s ovim izumom provodi se upotrebom humanog ob gena, sekvence čiji gen je nukleotidna sekvenca od 690 bp i identificirana je ovdje kao SEQ ID NO: 4.

Zhang Y i sur., gore, opisali su humani ob gen kao visoko homogeniziran prema ob genu murine, i obznani su konvencionalnu metodu s upotrebom nukleotidnih uzoraka usmjerenih na ob gen murine, koja se može upotrijebiti za 1) zaklanjanje cDNA knjižnice klonova deriviranih iz humanog masnog tkiva, 2) identifikaciju tih klonova koji imaju humani ob gen, i 3) izolaciju i sekvenciranje sekvence humanog ob gena. Kad se sekvencira pomoću konvencionalnih sredstava, utvrđeno je da ta sekvenca humanog ob gena ima nukleotidnu sekvencu SEQ ID NO: 4.

Kao i ob gen murine, humani ob gen uključuje kodnu sekvencu s 501 bp ili otvoren okvir za čitanje (ORF) počevši sa starnim kodonom na nukleotidu 37 i završavajući sa završnim kodonom na nukleotidu 538, koji ima prevedene sekvence na oba kraja, 3' i 5'. ORF sadrži signalne sekvence od 63 bp, od nukleotida 37 do 99.

Ta sekvenca humanog ob gena (SEQ ID NO: 4) kodira humani ob protein i njegovu signalnu sekvencu, čija je sekvenca amino kiselina duljine 167 amino kiselina identificirana kao SEQ ID NO: 5. Prvih 21 amino kiselina tog proteina, duljine od 167 amino kiselina, predstavlja signalnu sekvencu. Zreli humani ob protein (bez signalne sekvence) proteže se od amino kiseline 22 (Val) do amino kiseline 167 (Cys) i predstavljena je sa SEQ ID NO: 6.

Zhang, Y. i sur., gore, izvješćuju o 84% identičnosti između ob proteina murine i humanog ob proteina. Zhang Y. i sur., gore, također izvješćuju da postoje različiti humani i proteini murine, od kojih je jedna takova varijanta u obje vrste karakterizirana brisanjem glutamina 49. Kod približno 30% cDNA klonova u knjižnicama deriviranim iz masnog tkiva miša i humanog masnog tkiva nedostaje kodon 49 (Zhang, Y. i sur., gore).

Slijedeći pojmovi imaju slijedeće definicije:

ob protein murine (mob) odnosi se na protein SEQ ID NO: 3 čija se biološka svojstva odnose na liječenje, suzbijanje ili prevenciju gojaznosti, te s njom povezanih stanja ili bolesti. Posebno, ob protein murine po definiciji uključuje svaki protein ili polipeptid koji ima sekvencu amino kiselina koja je uglavnom homologna sa sekvencom amino kiselina SEQ ID NO: 3, i nadalje, ima slijedeće biološke aktivnosti:

1.) Protein ili polipeptid dat intracerebro-ventrikularnom (ICV) injekcijom 16-18 sati učvršćenim odraslim debelim ob/ob miševima tjelesne težine najmanje 30 g, dozom od 20 µg ili manjom, po metodi koju su opisali Haley i McCormick, Brit. J. Pharmacol. 12, 12-15 (1957), protein ili polipeptid:

a) smanjuje uzimanje hrane tijekom 5 sati ispitivanja hranjenja za 50% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je ubrizgan vehikl (ED50 za smanjenje uzimanja hrane); i

b) smanjuje porast tjelesne težine tijekom 24 sata nakon ICV injekcije za najmanje 50% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je ubrizgan vehikl (ED50 za smanjenje porasta tjelesne težine);

2) Protein ili polipeptid dat intraperitonealno (IP) neučvršćenim odraslim ob/ob miševima tjelesne težine najmanje 30 grama dva puta dnevno na početku dnevnog svjetla i opet 3 sata od početka faze mraka, jednom tjedno, u ukupnoj dnevnoj dozi od 20 µg ili manje, protein ili polipeptid:

(a) smanjuje 5-satno i 24-satno uzimanje hrane za najmanje 20% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je ubrizgan vehikl (ED20 za smanjenje uzimanja hrane); i

(b) smanjuje porast tjelesne težine tijekom 24 sata nakon prve IP injekcije za najmanje 20% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je ubrizgan vehikl (ED20 za smanjenje porasta tjelesne težine).

Kako se ovdje rabi, pojam ob proteina murine uključuje takove promišljeno modificirane proteine, kao na primjer, bočno usmjerenim mutagenozama ili slučajnim potpunim mutacijama.

Humani ob protein (hob) odnosi se na protein SEQ ID NO: 6, čija biološka svojstva se odnose na liječenje, suzbijanje ili prevenciju gojaznosti ili s njom povezanih stanja i bolesti. Posebno, humani ob protein po definiciji uključuje svaki protein ili polipeptid koji ima sekvencu amino kiselina koja je uglavnom homologna sa sekvencom amino kiselina SEQ ID NO: 6, i nadalje, koji ima slijedeće biološke aktivnosti:

1) Protein ili polipeptid dat ICV injekcijom 16-18 sati učvršćenim odraslim debelim ob/ob miševima tjelesne težine najmanje 30 g, dozom od 20 µg ili manjom, po metodi koju su opisali Haley i McCormick, gore, protein ili polipeptid:

a) smanjuje uzimanje hrane tijekom 5 sati ispitivanja hranjenja za 50% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je ubrizgan vehikl (ED50 za smanjenje uzimanja hrane); i

b) smanjuje porast tjelesne težine tijekom 24 sata nakon ICV injekcije za najmanje 50% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je ubrizgan vehikl (ED50 za smanjenje porasta tjelesne težine).

2) Protein ili polipeptid dat IP injekcijom neučvršćenim odraslim ob/ob miševima tjelesne težine najmanje 30 grama, dva puta dnevno, na početku dnevnog svjetla i opet 3 sata nakon početka faze mraka, jednom tjedno, u ukupnoj dnevnoj dozi od 20 µg ili manje, protein ili polipeptid:

(a) smanjuje 5-satno i 24-satno uzimanje hrane za najmanje 20% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je ubrizgan vehikl (ED20 za smanjenje unošenja hrane); i

(b) smanjuje porast tjelesne težine tijekom 24 sata nakon prve IP injekcije za najmanje 20% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je ubrizgan vehikl (ED20 za smanjenje tjelesne težine).

Kako se ovdje rabi, pojam humano ob proteina uključuje takove promišljeno modificirane proteine, kao na primjer, bočno usmjerenim mutagenozama ili slučajnim potpunim mutacijama.

Uglavnom homologan, koji se može odnositi na obje sekvence, na sekvencu nukleinskih i sekvencu amino kiselina, znači da posebno izložena sekvenca, na primjer, mutantna sekvenca, odstupa od referentne sekvence za jedan ili više supstituenata, brisanja, ili adicija, čiji čisti učinak nije posljedica suprotnosti funkcionalne nesličnosti između referentne i izložene sekvence. Za svrhe ovog izuma, sekvence koje imaju homologiju veću od 95%, ekvivalentna biološka svojstva, i adekvatne značajke ekspresije, smatraju se uglavnom homolognima. Za svrhe utvrđivanja homologije treba zanemariti skraćivanje zrele sekvence. Sekvence koje imaju manji stupanj homologije, slične biološke aktivnosti, i ekvivalentne značajke ekspresije, smatraju se uglavnom ekvivalentnima. Općenito, homologne DNA sekvence mogu se identificirati poprečnom hibridizacijom pod standardnim uvjetima hibridizacije umjerene strogosti.

Fragment humanog ili ob proteina murine znači svaki protein ili polipeptid koji ima sekvencu amino kiselina dijela ili fragmenta humanog ili ob proteina murine, i koji ima biološku aktivnost humanog ili ob proteina murine. Fragmenti uključuju proteine ili polipeptide proizvedene proteolitičkom degradacijom humanih ili ob proteina murine ili proizvedene kemijskom sintezom po metodama uobičajenim u praksi.

Ob protein ili njegov fragment je biološki aktivan kad davanje proteina ili njegovog fragmenta sisavcima, uključiv čovjeku, reducira uzimanje hrane i reducira stupanj porasta težine kod sisavaca. Određivanje biološke aktivnosti humanog ili ob proteina murine može se provesti konvencionalnim dobro poznatim ispitivanjima koja se koriste za te svrhe na jednoj ili više vrsta sisavaca, posebno na debelim ob/ob miševima. Ovdje je opisano nekoliko ispitivanja koja se mogu primijeniti za dokazivanje takove biološke aktivnosti. Kod određivanja biološke aktivnosti u skladu s ICV ispitivanjem na ob/ob miševima, kako je ovdje opisano, humani ili ob protein murine ima ponajprije ED50 za smanjenje uzimanja hrane od 20 µg ili manje, i ED50 za smanjenje porasta tjelesne težine od 20 µg ili manje.

Alternativno, kod određivanja biološke aktivnosti humanog ili ob proteina murine u skladu s IP ispitivanjem na ob/ob miševima, kako je ovdje opisano, humani ili ob protein murine ima ponajprije ED20 za smanjenje uzimanja hrane od 20 µg ili manje, i ED20 za smanjenje porasta tjelesne težine od 20 µg ili manje. Općenito, prednost se daje fragmentima koji pokazuju gore navedenu biološku aktivnost.

Replikon je svaki genetički element (npr. plazmid, kromosom, virus) koji funkcionira kao autonomna jedinica DNA replikacije in vivo, tj. može se replicirati pod vlastitom kontrolom.

Vektor ekspresije je replikon, kao što je plazmid, fag ili kozmid, na koji se drugi segment DNA može pričvrstiti tako da uzrokuje replikaciju pričvršćenog segmenta. On uključuje transkripcijsku jedinicu koja uključuje skup (1) genetičkog elementa ili elemenata koji imaju regulacijsku ulogu u ekspresiji gena, na primjer, promotore ili stimulatore, (2) strukturnu ili kodnu sekvencu koja je transkribirana u mRNA i prevedena u protein, i (3) odgovarajuću transkripciju inicijacijskih i terminacijskih sekvenci.

Klon je skupina DNA molekula deriviranih od jedne DNA sekvence izvorne duljine i proizvedenih pomoću bakterija ili virusa primjenom postupka genetskog inženjeringa, koji često uključuju plazmide.

Signalna sekvenca je sekvenca nukleinske kiseline smještene na početku (kraju 5') kodne sekvence proteina koji se umnožava. Ta signalna sekvenca kodira signalni peptid, N-terminal na novo sintetiziranom proteinu, da usmjeri stanicu domaćina da premjesti protein prema van ili kroz staničnu membranu domaćina, i koji signalni protein je obično izvađen tijekom translokacije.

Startni kodon je kodon obično ATG lociran u kodnoj sekvenci proteina, i obično na kraju 5', i signalizira prvu amino kiselinu u proteinskoj sekvenci.

Stop-kodon je kodon bez smisla smješten u i obično na kraju 3' kodne sekvence proteina, i signalizira kraj rasta polipeptidnog lanca.

Otvoren okvir čitanja (ORF), (e. Open Reading Frame) je linearna vrsta tripleta kodona u dvostruko prekinutoj DNA, koji kodira sekvencu amino kiselina u stanici in vitro ili in vivo kad se stavi pod kontrolu odgovarajuće regulacijske sekvence. Granice ORF-a određene su sa startnim kodonom na kraju 5' i stop-kodonom na kraju 3'. On se također može označiti i kao "kodna sekvenca".

Promotorska sekvenca je regulacijsko područje DNA koje može vezati RNA polimerazu u stanicu i inicirati transkripciju, naniže od (smjer 3') otvorenog okvira čitanja, jednog ili više strukturnih gena. Sekvenca promotora obično se nalazi na kraju 5' signalne sekvence ili otvorenog okvira za čitanje i proteže se prema gore u smjeru 5' da uključi minimalni broj baza ili elemenata potrebnih za inicijaciju transkripcije polipeptida na razini koja se može detektirati iznad podloge.

Kodna sekvenca ili ORF je pod kontrolom promotorske sekvence kad RNA polimeraza transkribira kodnu sekvencu u mRNA.

Sastav koji uključuje A (gdje A je jednostruk polipeptid) je homogen glede A kad ne sadrži pomoću konvencionalnih sredstava dokazivu količinu kontaminirajućih proteina ili drugih endogenih materijala, na primjer, obojenje poliakrilamidnog gela. U okviru ovog izuma, pojam homogeno se odnosi na sastav koji uključuje jednostruk protein ili polipeptid, kad najmanje 95 masenih % sastava je jednostruk protein ili polipeptid.

U nastavku se opisuju metode rekombinantne ekspresije humanih i ob proteina murine u biološki aktivno i topivo stanje, oslobođenih od stanica, oslobođenih od drugih proteina sisavaca, od kojih se ob proteini mogu tada očistiti do homogenosti. Ti postupci opisani su u pojedinostima u primjerima.

1) Dobivanje mišjeg i humanog ob gena

cDNA (SEQ ID NO. 1), koja kodira ob protein murine i njegovu prirodnu signalnu sekvencu, opisali su Zhang, Y. i sur., gore. Ta cDNA murine je bila izolirana i izoštrena PCR postupkom upotrebom oligodezoksিনukleotidnog DNA prajmera konvencionalnim postupcima. Te DNA prajmere i metode za njihovo dobivanje opisali su Zhang, Y. i sur., gore.

cDNA (SEQ ID NO. 4), koja kodira humani ob protein i njegovu prirodnu signalnu sekvencu, dobivena je upotrebom istog oligodezoksিনukleotidnog DNA prajmera, kojeg su upotrijebili Zhang, Y. i sur., gore, za dobivanje ob gena murine. Primjenom uobičajenog postupka cDNA je bila izolirana iz lambda faga cDNA knjižnice izrađene od RNA derivirane iz humanog masnog tkiva.

Humana ili mišja ob cDNA može se dobiti ne samo iz cDNA knjižnica, već i drugim uobičajenim sredstvima, npr. kemijskom sintezom, ili kloniranjem genomne DNA, ili njenih fragmenata, očišćenim iz željenih stanica. Te postupke su opisali Sambrook i sur., u "DNA Cloning: A Practical Approach", Vol. I i II, D.N. Glover, izdanje 1985, MRL

Press, Ltd., Oxford, Velika Britanija; Benton i Davis, Science 196, 180-182 (1977); i Grunstein i Hogness, Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3961-3965 (1975). Za dobivanje humane ili mišje ob cDNA iz cDNA knjižnica, cDNA knjižnice se zaklone uobičajenim postupcima hibridizacije DNA metodama Bentona i Davisa, gore, ili Grunsteina i Hognessa, gore, upotrebom prajmera pripremljenih reverznom transkripcijom poliadencilirane RNA izolirane iz masnih stanica murine koje sadrže ob gen. Klonovi koji se hibridiziraju u prajmere analizirani su restrikcijskog cijepanja endonukleaze, elektroforezom gela agaroze, i dodatnim pokusima hibridizacije ("Southern blots"), uključiv elektroforezirane prajmere. Nakon izolacije nekoliko klonova koji su se hibridizirali na uzorke cDNA murine, hibridizirani segment jednog klona je subkloniran i sekvenciran uobičajenim postupcima.

Klonovi derivirani od genomske DNA mogu sadržavati regulatorska i intronska DNA područja dodatno uz kodna područja: klonovi derivirani od cDNA neće sadržavati intronske sekvence. Kod molekuskog kloniranja gena iz genomske DNA, stvaraju se DNA fragmenti od kojih će neki kodirati željeni gen. DNA se može cijepati na specifičnim stranama upotrebom različitih restrikcijskih enzima. Alternativno, za fragmentiranje DNA može se upotrijebiti DNaza u prisutnosti mangana, ili se DNA može sjeći fizički, kao na primjer sonikacijom. Linearni DNA fragmenti mogu se zatim odvojiti prema veličini standardnim postupcima, koji uključuju, ali se ne i ograničavaju se na njih, elektroforezu na agaru i poliakrilamidnom gelu i kromatografiju u koloni.

Bez obzira na izvor, humani ili ob gen murine može se molekularski klonirati u prikladan vektor za propagaciju gena metodama poznatim u struci. Može se upotrijebiti svaki komercijalno dostupan vektor. Na primjer, mišja cDNA može se umetnuti u vektor pCDNA3, a humana cDNA se može umetnuti u vektor pBluescriptSK⁻. Prikladne vektore za upotrebu s bakterijskim domaćinima opisali su Powels i sur., u "Cloning Vectors: A Laboratory Manual", 1985, Elsevier, N.Y. Kao istaknuti, ali ne ograničavajući, primjer upotrebljivih vektora za kloniranje, za bakterijsku upotrebu može se uključiti selekcijski marker i replikacije bakterijskog porijekla, deriviran od komercijalno dostupnih plazmida, koji su opet derivirani od dobro poznatog vektora za kloniranje pBR322 (ATCC 37017). Takovi komercijalni vektori uključuju, na primjer, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, [vedska]) i pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisc., SAD).

Nukleotidne sekvence humanog ili ob gena murine, umetnute u te komercijalno dostupne vektore, mogu se verificirati metodama poznatim u struci, standardnim postupcima sekvenciranja nukleotida.

Ovdje se mogu upotrijebiti i druge nukleinske kiseline koje kodiraju ob proteine vrsta drugačijih od humane ili murine. S tim u skladu, budući da je specifična DNA bila klonirana i sekvencirana u odnosu na humani i mišji ob gen, svaki životinjski adipocit se potencijalno može upotrijebiti kao izvor nukleinske kiseline ob proteina.

2) Konstrukcija vektora ekspresije za humani i ob protein murine

Humani ili ob gen murine kloniran u skladu s gore opisanim metodama upotrijebljen je za konstrukciju vektora ekspresije humanih i ob proteina murine.

Za ekspresiju biloške aktivnosti humanog i ob proteina murine pomoću transfektirane ili transformirane E. coli stanice domaćina i za sekreciju ob proteina u perioplazmu, može se upotrijebiti novi vektor ekspresije. Taj vektor ekspresije uključuje promotor i DNA sekvencu koji kodira fuzijski protein. Fuzijski protein se sastoji od dva dijela: prvi dio je signalni peptid za protein A vanjske membrane E. coli (sOmpA), a drugi dio fuzijskog proteina je humani ili ob protein murine (minus njihove vlastite prirodne signalne sekvence). DNA sekvenca koja kodira taj fuzijski protein također se sastoji od dva dijela: prvog dijela koji kodira peptid sOmpA i drugog dijela koji kodira humani ili ob protein murine (minus njihove prirodne signalne sekvence). Prvi dio DNA sekvence koji kodira sOmpA peptid je signalna sekvenca koju su opisali De Sutter, K. i sur., Gene 141, 163-170 (1994) i ima nukleotidnu sekvencu SEQ ID NO: 7. Drugi dio dvodjelne DNA sekvence kodira humane ili ob proteine murine i ima nukleotidnu sekvencu SEQ ID NO: 1 ili SEQ ID NO: 4, minus onaj dio nukleotidne sekvence koji kodira dotične prirodne signalne sekvence.

Signalni peptid šifriran sa sOmpA signalnom sekvencom SEQ ID NO: 7 ima sekvencu amino kiselina SEQ ID NO: 8 kako su izvijestili De Sutter, K. i sur., gore.

Novi vektor ekspresije ovog izuma dobiven je umetanjem promotora i DNA sekvence koja kodira fuzijski protein u konvencionalni vektor ekspresije prikladan za ekspresiju rekombinantnih proteina u stanicama domaćina E. coli.

Kod konstrukcije tog novog vektora ekspresije u skladu s ovim izumom, može se upotrijebiti svaki promotor koji je dovoljno dugačak da može kontrolirati transkripciju fuzijskog proteina, koji sadrži peptid sOmpA, i ob proteina u stanici domaćina E. coli. Ako se kao signalni peptid upotrebljava sOmpA, korisno je upotrijebiti oba promotora, lac-operator promotor ($P_{O_{lac}}$) i lipoproteinski promotor (P_{Lpp}). Drugi upotrebljivi promotori za takovu ekspresiju u E. coli uključuju promotor T7 RNA polimeraze, kojeg su opisali Studier i sur., J. Mol. Biol. 189, 113-130, (1986), lac

promotor, kojeg je opisao Lauer, J. Mol. Appl. Genet. 1, 139-147 (1981) i koji se može dobiti iz američke zbirke tipova kultura (American Type Culture Collection, ATCC) kao ATCC 37121, promotor tac, kojeg je opisao Maniatis u "Molecular Cloning: Laboratory Manual", Cold Spring Harbor 1982, i koji se može dobiti kao ATCC 37138, promotor alkalna fosfataza (phoA), i promotor trp, kojeg su opisali Goeddel i sur., Nucleic Acids Research 8, 4057-4075 (1980).
 5 Drugi promotori bili su obznanjeni i upotrijebljeni u E. coli, a bile su objavljene (Siebenlist i sur., Cell 20, 269-281 (1980) i pojednostosti glede njihovih nukleotidnih sekvenci, koje omogućuju stručnjaku da ih funkcionalno povezuje unutar vektora ekspresije ovog izuma.

Posebno, vektor ekspresije uključuje:

10 a) promotorsku sekvencu, i

b) DNA sekvencu koja kodira fuzijski protein, koji fuzijski protein uključuje SEQ ID NO: 3 ob proteina murine ili SEQ ID NO: 6 humanog ob proteina, i signalni peptid za protein A vanjske membrane E. coli.

15 Nadalje, opisana je metoda konstruiranja tog novog vektora ekspresije. Ta metoda je, nadalje, u pojedinostima je opisana u primjerima i zorno prikazana na slikama 2 i 3. Prvo, kodna sekvenca humanog ili mišjeg ob gena (minus njena prirodna signalna sekvenca) je ugrađena u plazmid koji sadrži sOmpA signalnu sekvencu, kao što je plazmid pT10sOmpArPDI. Taj pT10sOmpArPDI plazmid i njegovu konstrukciju i pripremu opisali su Sutter, K. i sur., gore.
 20 Jednom ugrađen u taj plazmid, humani ili mišji ob gen se spaja s tim sOmpA genom tvoreći "hibridnu sekvencu gena" u tom plazmidu. Gen sOmpA mora biti iznad područja 5' kodne sekvence ob gena. Nakon toga, promotori, kako su gore numerirani, a ponajprije lipoproteinski promotor (P_{lpp}) i lac promotor-opetator (PO_{lac}), ugrađeni su u taj plazmid koji sadrži hibridnu sekvencu gena tvoreći vektor ekspresije ovog izuma. Dvije izvedbe ovih vektora ekspresije identificirane su kao pLPPsOmpA mob i pLPPsOmpA hob1 i prikazane su na slikama 2 i 3.

25 Za konstruiranje takovog plazmida može se primijeniti bilo koji postupak poznat u struci. Čak štoviše, redosljed kojim netko fuzinira sOmpA i sekvence ob gena, ugrađuje sekvence gena u prikladni plazmid, i ugrađuje promotor da dođe do vektora ekspresije ovog izuma, nije kritičan. Na primjer, sOmpA sekvenca gena može se inicijalno fuzionirati na sekvencu humanog ili ob gena murine izravno tvoreći hibridnu sekvencu gena, a zatim se tu hibridnu sekvencu umeće u plazmid koji u sebi već ima ugrađene odgovarajuće promotore. Međutim, neophodno je da sOmpA sekvenca gena
 30 bude iznad poviše 5' kraja ob murine ili ob sekvence gena.

Otkriveno je da upotrebom ovog novog vektora ekspresije, a posebno upotrebom signalne sekvence koja kodira sOmpA, humani ili ob proteini murine mogu se translocirati u prostor periplazme, gdje je signalni peptid odgovarajuće
 35 odvojen, ostavljajući tamo nedodirnutu humane ili ob proteine murine u topivom i biološki aktivnom obliku. Kad se nalaze u tom prostoru periplazme, ob proteini su djelotvorno izlučeni u slobodnu okolinu stanice oslobođeni od drugih proteina sisavaca nakon podvrgavanja stanica domaćina hladnom osmotskom šoku, i tijekom čega se ob proteini mogu očistiti do homogenosti u biološki aktivnom obliku.

40 3. Ekspresija humanih ili ob proteina murine u transformiranim stanicama E. coli

Nadalje, vektori ekspresije, konstruirani u skladu s gore opisanim postupcima, umetnuti su u stanicu domaćina E. coli da transformiraju E. coli. Može se upotrijebiti svaka vrsta E. coli, kao što je E. coli K-12, vrsta 294, kako je opisana u britanskom patentnom spisu br. 2055382 A (ATCC br. 31446). Druge vrste koje se mogu upotrijebiti u skladu s ovim
 45 izumom uključuju E. coli MC1061 [Casadaban i Cohen, J. Mol. Biol. 138, 179-207 (1980)], E. coli B, E. coli X 1776 (ATCC br. 31537), i E. coli W 3110 (ATCC br. 27325) ili druge vrste od kojih su mnoge deponirane i mogu se dobiti u priznatim institucijama za deponiranje mikroorganizama.

Transformirane stanice E. coli rasle su do odgovarajuće stanične gustoće i uzgajane su standardnim metodama. U tako
 50 izraslim i uzgojenim transformiranim E. coli domaćinima, vektori ekspresije ovog izuma djelotvorno i učinkovito omogućuju ekspresiju humanih ili ob proteina murine i translokaciju tih istih proteina u periplazmu domaćina E. coli stanica u topivom i biološki aktivnom obliku. sOmpA signalni peptid (tj. dio 1 fuzijskog proteina) je odsiječen tijekom translokacije fuzijskog proteina u periplazmu dajući biološki aktivan ob protein oslobođen od drugih proteina ili poipeptida sisavaca. Posebno, metoda proizvodnje biološki aktivnog rekombinantnog humanog ili obese proteina
 55 oslobođenog od proteina sisavaca uključuje faze:

a) konstruiranje vektora ekspresije koji ima promotorsku sekvencu, i DNA sekvencu koja kodira fuzijski protein, koji fuzijski protein uključuje SEQ ID NO: 3 ili SEQ ID NO: 6, i signalni peptid za protein A vanjske membrane E. coli;

60 b) umetanje vektora ekspresije u stanicu domaćina E. coli da transformira stanicu domaćina E. coli:

c) ekspresiju fuzijskog proteina u stanici domaćinu *E. coli*; i

d) obradu stanice domaćina *E. coli* s puferom za hladni osmotski šok da se oslobodi humani ili ob protein murine bez ostalih proteina sisavaca i bez signalnog peptida.

Rekombinantno proizvedeni humani ili ob proteini murine u topivom biološki aktivnom stanju u periplazmi transformiranih stanica *E. coli* su zatim očišćeni do homogenosti.

Rekombinantni humani ili ob proteini murine translocirani u staničnu periplazmu, u skladu s ovdje opisanim postupcima, mogu se učinkovito izlučiti izvan stanice podvrgavanjem stanica domaćina hladnom osmotskom šoku metodama poznatim iz struke koje su opisali Koshland, D. i Botstein, D., *Cell* 20, 749-760 (1980). Primjenom hladnog osmotskog šoka iz *E. coli* se oslobađaju ob proteini u njihovom biološki aktivnom stanju bez drugih proteina ili polipeptida sisavaca.

Humani ili ob proteini murine stavljeni u osmotsku tekućinu nakon hladnog osmotskog šoka transformiranih stanica *E. coli*, u skladu s gore opisanim postupkom, jesu biološki aktivni i mogu se očistiti kombinacijom kromatografije u koloni s anionskom izmjenom, kromatografijom u koloni s hidrofobnom interakcijom i gel filtracijom. Kromatografije anionske izmjene i hidrofobne interakcije mogu se provesti bilo kojim redoslijedom, međutim u oba slučaja moraju se provesti prije gel filtracije.

Anionska izmjena može se provesti s uobičajenim sredstvima. Kod anionske izmjene prednost se daje koloni Q Sepharose Fast Flow. Prikladna sredstva za kromatografiju anionske izmjene uključuju razne netopive matrice uključiv dietilaminoetil (DEAE) ili dietil-(2-hidroksipropil)amino-etil (QAE) skupine. Matrice mogu biti akrilamid, agar, dekstran, celuloza ili drugi tipovi koji se općenito koriste za čišćenje proteina. Za kromatografiju anionske izmjene naročito koristan materijal je DEAE-Sepharcel (Pharmacia, Uppsala, Švedska). Kad se upotrebljava sredstvo koje sadrži DEAE skupine, ekstrakti koji sadrže humane ili ob proteine murine apliciraju se kod slabo bazičnog pH, npr. 8,1. Vezani humani ili ob proteini murine mogu se isprati u još čistijem obliku primjenom gradijenta soli u prikladnom puferu kao što je Tris-HCl. Općenito, značajke gradijenta mogu se odrediti pokusima prethodnog ispiranja uključivši male količine rekombinantnog proteina.

Materijal koji sadrži humani ili ob protein murine dobiven primjenom kromatografije anionske izmjene, kad se kromatografija anionske izmjene primjenjuje kao prva faza čišćenja, podvrgava se zatim kromatografiji hidrofobne interakcije. Kromatografija hidrofobne interakcije je postupak odvajanja kojim se tvari razdvajaju na osnovi različitih snaga hidrofnih interakcija s materijalom stavljenim u kolonu i koji sadrži hidrofnne skupine. Tipično, kolona hidrofnne interakcije se najprije ekvilibrira pod uvjetima koji su povoljni za hidrofnno vezanje, npr. visoke ionske sile. Za ispiranje uzorka može se upotrijebiti opadajući gradijent soli.

Može se upotrijebiti bilo koja kolona za hidrofnnu interakciju. Prednost se daje hidrofnnoj koloni fenil Sepharose, međutim, također se može upotrijebiti i butil Sepharose. U skladu s izumom, materijal koji sadrži rekombinantni humani ili ob protein murine, koji je bio ispran iz anionske kolone, stavlja se na kolonu koja sadrži relativno jak hidrofnni gel, kao što je fenil Sepharose. Za poticanje hidrofnne interakcije s hidrofnnim gelom upotrebljava se otapalo koje sadrži, na primjer, amonijev sulfat koncentracije jače ili jednake 0,4 M, a preporuča se započeti s 0,4 M. Tako se kolona i uzorak podese na 0,4 M amonijevog sulfata u 50 Tris puferu, i uzorak se stavi u kolonu. Kolonu se ispere s 0,4 M amonijevim sulfatom. Zatim se ob protein ispiru s otapalom koje slabi hidrofnne interakcije, kao što je, na primjer, opadajući gradijent soli, etilen-glikol ili propilen-glikol, ili urea. Izvedba kojoj se daje prednost uključuje ispiranje kolone uzastopce s Tris puferom i Tris puferom koji sadrži 20% etilen-glikola.

Ob protein ispiru se uzastopce iz kolone s gradijentom opadajuće koncentracije amonijevog sulfata i rastućom koncentracijom etilen-glikola u Tris puferu. Skupna i uzatopna primjena kromatografije anionske izmjene i kromatografije u koloni hidrofnne interakcije, bilo kojim redoslijedom, daje humani ili ob protein murine rutinski određene čistoće od 90%.

Kromatografija gel filtracije slijedi nakon gore navedene faze kromatografija anionske izmjene i kromatografija u koloni hidrofnne izmjene, i može se provesti bilo kojim uobičajenim postupkom gel filtracije. Ob protein ispran iz kolone hidrofnne interakcije, ili kolone anionske izmjene, bez obzira koja je bila primijenjena posljednja, može se koncentrirati i dijalizirati na mali volumen pomoću membrane koja odsijeca molekulske mase od 10.000 (membrana AMICON-YM10). Zatim se koncentrirani materijal stavi na kolonu koja sadrži sredstvo za gel filtraciju, kao G100-Sephadex (Pharmacia, Uppsala, [vedska). Zatim se ob protein može odvojiti od drugih nečistoća na osnovi svoje molekulske mase standardnim postupcima upotrebom SDS-PAGE.

Skupna i uzastopna primjena kromatografije anionske izmjene, kromatografije u koloni hidroforne interakcije i gel filtracije rutinski daje humani ili ob protein čistoće od 95%.

Sekvenciranje N-terminalne amino kiseline na očišćenom humanom ili ob proteinu murine može se provesti metodama poznatim u struci, npr., elektrotransferom po metodi koju je opisao Laemli, U.K., *Nature* 227, 680-685 (1970) ili postupcima koje je opisao Matsudaira, P., *J. Biol. Chem.* 262, 10035-10038 (1987). Na primjer, fragmenti peptida mogu se stvoriti digestiranjem M trake (na nitrocelulozi) s endoproteazom lizina C i zatim se odvajaju pomoću sistema HPLC.

Biološka aktivnost očišćenih humanih i ob proteina murine ovog izuma je takova da davanje fragmenta ob proteina injekcijom čovjeku ili mišu rezultira smanjenjem uzimanja hrane i smanjenjem porasta težine u usporedbi s kontrolnim skupinama ili subjektima koji nisu primili injekciju.

Biološka aktivnost humanih i ob proteina murine, ili njihovih fragmenata, dobivenih i očišćenih u skladu s ovim izumom, može se ispitati rutinskim metodama, npr. ponovljenim ili jednostrukim intracerebroventrikularnim (ICV) ubrizgavanjem ob/ob miševima postupkom koji su opisali Haley, T.J. i sur., gore, kako je u pojedinostima opisano u primjerima 13 i 16. Na osnovi tog ICV ispitivanja može se utvrditi ED50 za smanjenje uzimanja hrane i ED50 za smanjenje porasta tjelesne težine. Dodatno, biološku aktivnost očišćenih humanih i ob proteina murine ili njihovih fragmenata može se utvrditi ponovljenim ICV ubrizgavanjem ob/ob miševima, kako je u pojedinostima opisano u primjeru 15. Na osnovi IP ispitivanja može se utvrditi ED20 za smanjenje uzimanja hrane i ED20 za smanjenje porasta tjelesne težine.

Biološka aktivnost humanih i ob proteina murine, ili njihovih fragmenata, dobivenih i očišćenih u skladu s ovim izumom, može se odrediti kod ljudi metodama poznatim u struci, npr. mjerenjem smanjenja uzimanja ispitnog obroka nakon IV davanja ob proteina debelim ispitnim dobrovoljcima u usporedbi s IV davanjem otopine soli kontrolnoj skupini, po metodi koju su opisali Muurahainen, N.E. i sur., *Am. J. Physiol* 260, 672-680 (1991), i kako je u pojedinostima opisana u primjerima 14 i 17. Alternativno, prikladnost očišćenih humanih ili ob proteina murine prema ovom izumu za smanjenje stupnja porasta težine (tj. induciranje gubitka težine) može se odrediti ponovljenim IV davanjem debelim dobrovoljcima po metodi koju su opisali Drent, M.L. i sur., *Int. J. Obesity* 19, 221-226 (1995), kako je u pojedinostima opisana u primjeru 18.

Humani i ob proteini murine prema ovom izumu, očišćeni u skladu s izumom, imaju biološku aktivnost i to:

1) Dat intracerebroventrikularnom (ICV) injekcijom 16-18 sati učvršćenim odraslim debelim ob/ob miševima tjelesne težine najmanje 30 g, dozom od 20 µg ili manjom, primjenom metode koju su opisali Haley i McCormick, gore, protein ili polipeptid:

a) reducira unošenje hrane tijekom 5 sati ispitivanja hranjenja za 50% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je dat vehikl (ED50 za smanjenje unošenja hrane); i

b) reducira porast tjelesne težine tijekom 24 sata nakon ICV injekcije za najmanje 50% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je dat vehikl (ED50 za redukciju porasta tjelesne težine);

2) Dat IP injekcijom neučvršćenim odraslim ob/ob miševima tjelesne težine najmanje 30 grama dva puta dnevno, na početku dnevnog svjetla i opet u 3 sata nakon početka faze mraka, jednom tjedno, u ukupnoj dnevnoj dozi od 20 µg ili manje, protein ili polipeptid:

(a) reducira 5-satno i 24-satno unošenje hrane za najmanje 20% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je dat vehikl (ED20 za smanjenje unošenja hrane); i

(b) reducira porast tjelesne težine tijekom 24 sata nakon prve IP injekcije za najmanje 20% u usporedbi s kontrolnim miševima kojima je dat vehikl (ED20 za redukciju porasta tjelesne težine).

Dodatno ta redukcija tjelesne težine i uzimanja hrane dešava se čak kod doze ispod 20 µg ili manje, čak kod doze date ICV injekcijom od 1 µg ili manje, posebno ako su ti proteini očišćeni do homogenosti.

Gore opisani biološki pokusi i pojedinosti u primjerima za određivanje biloške aktivnosti humanih i/ili ob proteina murine mogu se primijeniti za određivanje biloške aktivnosti fragmenata tih proteina, bilo da su ti fragmenti proizvedeni proteolitičkom degradacijom ob proteina, kemijskom sintezom rekombinantnom proteinskom ekspresijom dijela DNA sekvence za ob proteine ili bilo kojim načinom poznatim stručnjacima.

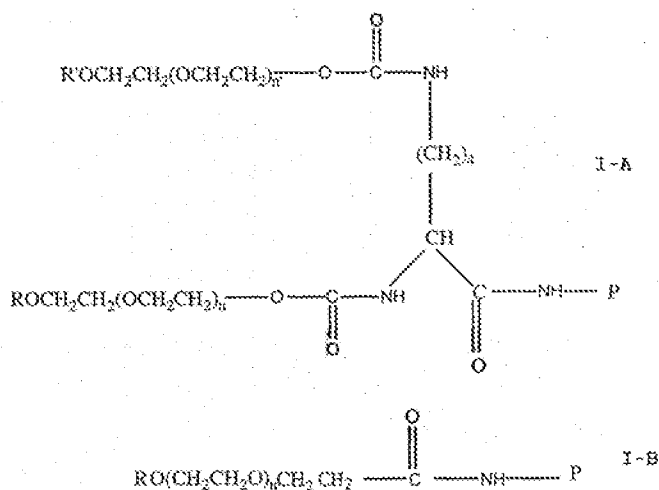
U skladu s daljnjom izvedbom ovog izuma, humani ili ob protein murine ovog izuma može se konjugirati s polietilen-glikolnim ili polipropilen-glikolnim homolimerima, koji mogu biti nesupstituirani ili supstituirani eterifikacijom jedne od hidroksi skupina na jednom od njenih krajeva s nižom alkilnom skupinom. Ti konjugati osiguravaju ob protein u postojanom obliku i poboljšavaju trajnost tih proteina. Dodatno, upotreba tih konjugata oblikovanih od polietilen-glikolnih ili polipropilenglikolnih homopolimera osigurava sredstvo za povećanje trajnosti aktivnosti ob proteina u tijelu. Čak štoviše, pronađeno je da ti konjugati pružaju dodatne prednosti, kao što je povećanje stabilnosti i vremena cirkulacije terapijskog ob proteina u tijelu, dok se istovremeno smanjuje imunogenost ob proteina. Ti pegilirani ob proteini mogu se također odmah apsorbirati u ljudskom tijelu i osigurati povećani ulazak u krvotok.

Homopolimeri polietilen-glikola ili polipropilen-glikola, kojima se daje prednost, a koji su konjugirani na ob protein, imaju molekulske mase otprilike 15 do 60 kDa, da proizvedu protein koji se može mono- ili poli-pegilirati s molekulama polietilen-glikola ili polipropilen-glikola. U prednostnom slučaju ob protein je ili mono- ili di-pegilirani u oblik konjugata s polietilen- ili polipropilen-glikolnim jedinicama, koje jedinice u konjugatu imaju ukupnu molekulska masu od 15 do 60 kDa, najbolje od 35 do 45 kDa. Općenito, konjugati se proizvode kao mješavina (sastav) polietien- i polipropilen-glikolnih konjugata, dok su polietien- i polipropilen-glikolni početni materijali čvrste tvari u obliku mješavine različitih homopolimera različitih molekulskih masa. Gore navedena molekulska masa je prosječna molekulska masa mješavine tako proizvedenih ob konjugata. Te mješavine se mogu rastaviti u pojedinačne konjugate uobičajenim sredstvima kao kromatografijom u koloni koja uključuje HPLC. Međutim, za obradu, ti konjugati općenito se koriste u obliku mješavine.

Polietilenglikolni i polipropilenglikolni polimeri (PEG) mogu biti pričvršćeni na ob protein preko slobodne N-terminalne amino kiseline proteina, tako da oblikuju konjugate na bilo koji uobičajen način. Metoda pričvršćivanja polietien- i polipropilen-glikola da se oblikuju konjugati s ob proteinom može biti bilo koja od dostupnih poznatih metoda. Polietien- ili polipropilen-glikol može biti kovalentno povezan preko N-terminalne amino kiseline proteina, kao također i preko različitih lizinskih ostataka ob proteina.

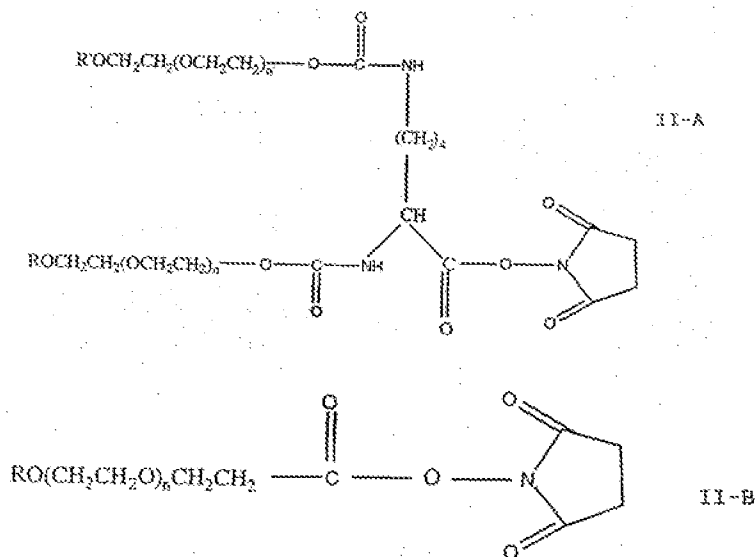
Dodatno, polietien- ili polipropilen-glikolni homopolimeri mogu se konjugirati na ob protein preko bi- ili poli-funkcionalnih veznih skupina. Kod proizvodnje konjugata mono-polietilen- ili polipropilen-glikolnih homopolimera upotrebljavaju se di-funkcionalni linkeri i homopolimer se konjugira na jednu funkcionalnu skupinu linkera, čime se N-terminalna amino kiselina, kao i lizinska skupina ob proteina može konjugirati na drugu funkcionalnu skupinu tog linkera. Tri- ili poli-(polietilen- ili polipropilen-glikol)-polimerni konjugati s ob proteinom oblikovani su upotrebom tri-funkcionalnog ili poli-funkcionalnog linkera. Homopolimer se može konjugirati na dvije ili više od tih funkcionalnih skupina s jednom zadržanom funkcionalnom skupinom linkera koja dodiruje ob protein. Među tim linkerima su oni poli-funkcionalni linkeri koji imaju aminske i karboksi funkcionalne skupine. Aminske skupine se mogu konjugirati s funkcionaliziranom hidroksi skupinom polietilen- ili polipropilen-glikola da se dobije amidno povezivanje. Karboksi skupine se mogu konjugirati s aminskim skupinama na ob proteinu da se oblikuje amidna veza i s funkcionaliziranom hidroksi skupinom na glikolu da se oblikuje ester. Među mnogim tipovima skupina za povezivanje, koje se mogu koristiti za tvorbu konjugata između ob proteina i PEG, su one obznanjene u U.S patentnima 4,902,502, 5,034,514, 4,609,546, 5,122,614 i 4,847,325.

U skladu izvedbom ovog izuma, kojoj se daje posebnu prednost, su konjugati formula



gdje P je ovdje opisani humani ili ob protein murine; a n i n' su cijeli brojevi čiji zbroj je od 300 do 1200, tako da je prosječna molekulska masa PEG jedinice od 15 do 60 kDa, a ukupna molekulska masa konjugata je od 30 kDa do 80 kDa; i R i R' su niži lakil.

- 5 Spojevi formula I-A i I-B mogu se proizvesti od poznatih polimernih materijala



- 10 tako da se kondenziraju s humanim ili ob proteinom murine ovog izuma. Za tvorbu amida može se primijeniti bilo koja konvencionalna metoda reakcije aktiviranog estera s aminom. U gore prikazanoj reakciji, kao primjer uzeti sukcinimidil ester je otpusna skupina koja uzrokuje tvorbu amida. Ako se za tvorbu spoja I-B koristi spoj formule II-B, reakcija s humanim ili ob proteinom murine ovog izuma može se provesti na isti način koji je opisan u svezi s pretvorbom spoja formule II-A u spoj formule I-A. Upotrebu tih sukcinimidil-estera, kao što je spoj formule II-A, za
- 15 proizvodnju konjugata s proteinima obznani su Monfardini i sur., Bioconjugate Chem., 6, 62-69 (1995).

- U slučaju spoja I-A zbroj n i n' je od 300 do 1500, tako da se dobije konjugat koji ima ukupnu prosječnu molekulsku masu PEG jedinica od 15 do 60 kDa, a ponajprije od 35 do 45 kDa. U prednostnoj izvedbi spoja formule I-A zbroj n i n' je od približno 800 do 1200, s prosječnim zbrojem n i n' koji je od 850 do 1000. Općenito, prednostni omjer n prema
- 20 n' u spojevima formule I-A i II-A je od 0,5 do 1,5, a ponajprije od 0,8 do 1,2. U slučaju spoja formule I-B, da se dobije spoj koji ima 300 do 1500 PEG jedinica, s ukupnom molekulskom masom od 15 do 60 kDa, a ponajprije od 35 do 45 kDa, n je ponajprije između 300 i 1500. U prednostnoj izvedbi n je od približno 850 do 1000.

- Humani ili ob proteini murine proizvedeni u skladu s ovim izumom mogu se proizvesti kao farmaceutski sastavi prikladni za ubrizgavanje s kompatibilnim farmaceutski prihvatljivim nosiocem ili vehiklom metodama poznatim u struci. Može se upotrijebiti bilo koji uobičajen noseći materijal. Noseći materijal može biti organski ili anorganski, prikladan za enteralno, perkutano ili parenteralno davanje. Prikladni nosioci uključuju vodu, želatinu, gumu arabiku, laktozu, škrob, magnezijev stearat, talk, biljna ulja, polialkilen-glikole, petrolej žele i slično. Nadalje, farmaceutski pripremcima mogu sadržavati druga farmaceutski aktivna sredstva. Dodaci, kao što su sredstva za poboljšanje okusa, konzervansi, stabilizatori, emulgatori, puferi i slično mogu se dodati sukladno prihvatljivoj praksi farmaceutskog miješanja. Među prednostnim nosiocima za formuliranje homogenih ob proteina ovog izuma jesu humani serum albumin, humani plazma proteini, itd.
- 25
- 30

- Davanje rekombinantnog ob proteina, humanog ili od murine, ili njihove kombinacije, rezultira smanjenjem uzimanja hrane i gubitkom težine debelih ljudi i životinja. Zbog toga davanje ob proteina nadopunjuje taj protein koji je važan za regulaciju tjelesne težine. Farmaceutski sastavi koji sadrže humane ili ob proteine murine mogu se formulirati s jakom učinkovitošću za davanje na različite načine ljudima ili životinjama koji pate od nenormalnog povećanja tjelesne težine, same ili kao dijela drugih medicinskih stanja ili bolesti, kao što je tip II diabetesa mellitusa. Mogu se koristiti razni postupci davanja injekcija, između ostalog subkutanih, intravenskih i intraperitonealnih injekcija. Prosječne količine ob proteina mogu varirati i posebno ih treba temeljiti na preporukama i propisivanju kvalificiranog liječnika ili veterinaru.
- 35
- 40

Humani ili ob protein murine proizveden u skladu s ovim izumom može se također koristiti u metodama zaklanjanja za identifikaciju receptora ob proteina.

Dolje dati primjeri nemaju svrhu ograničiti izum ni na koji način.

Kratki opis crteža

Slika 1 shematski prikazuje dva klona humanog ob proteina; tj., hob c11 i hob c12, gdje je shematski označeno mjesto i tipove restrikcijskih strana smještenih na krajevima 5' i 3' sekvence humane ob cDNA.

Slika 2 shematski prikazuje konstrukciju pLPPsOmpA mob vektora ekspresije.

Slika 3 shematski prikazuje konstrukciju pLPPsOmpA hob1 vektora ekspresije.

Primjer 1

Dobivanje humane ob cDNA

Humana ob cDNA dobivena je zaklanjanjem komercijalno dostupnog cDNA knjižnice lambda faga ("Clontech") proizvedene od RNA derivirane iz humanog masnog tkiva. Iz te knjižnice, hibridizacijom knjižnice lambda faga dobivena su dva lambda faga, od kojih je svaki sadržavao približno 2,5 kilobazni fragment koji je odgovarao sekvenci humane cDNA. Tim postupkom identificirana su dva klona, tj. hob1 cDNA i hob2 cDNA. Humani ob gen subloniran je u plazmidni vektor DNA pBluescriptSk⁻, komercijalno dostupan od Stratagene. Dobiveni vektori, koji sadrže te sekvence humanog ob gena, nazvani su pBluescriptSk⁻hob1 i pBluescriptSk⁻hob2.

Sekvenca humanog ob gena u tim pBluescriptSk⁻hob1 i pBluescriptSk⁻hob2 bila je potvrđena sekvenciranjem nukleotida. Sekvence amino kiselina proteina izvedenog od nukleotida sekvenciranjem odgovarale su humanom ob proteinu kodiranom sa SEQ ID br. 4 i kako su objavili Zhang, Y. i sur., gore. pBluescriptSk⁻hob1 ima T-C mutaciju iza stop kodona hob1 cDNA. Ta mutacija rezultira gubitkom StuI restrikcijske strane, inače predoređene da bude prisutna u nukleotidnoj sekvenci hob 1 kako slijedi:

hob1

...GGG.TGC.TGA GGCCT TGA...

Gly Cys stop

pBluescriptSk⁻-hob1

...GGG.TGC.TGA GGCCT TGA...

Gly Cys stop

pBluescriptSk⁻-hob2

...GGG.TGC.TGA GGCCT TGA...

Gly Cys stop

Budući da je mutacija smještena u pBluescriptSk⁻hob1 iza stop kodona sekvence humane ob cDNA, to ne vodi do promjene u sekvenci amino kiselina humanog ob proteina, kako su objavili Zhang, Y. i sur., gore.

Smatra se da ako je nukleotidna sekvenca cDNA prisutna u pBluescriptSk⁻hob2, analizom restrikcijskog enzima bilo je pokazano da taj plazmid ima StuI stranu restrikcije smještenu iza stop kodona sekvence humane ob cDNA.

Dodatno uz činjeicu da pBluescriptSk⁻hob1 ima mutaciju u StuI strani restrikcije iza stop kodona, pBluescriptSk⁻hob1 također ima EcoRI stranu restrikcije iza ORF u hob1 cDNA koje nema u hob2 cDNA (vidi sliku 1).

Primjer 2

Konstrukcija plazmida za ob protein murina (mob)

ob cDNA sekvence SEQ ID NO. 1 murine dobivena je postupkom kojeg su opisali Zhang, Y. i sur., gore, i zatim je umetnuta u pCDNA3 vektor, koji je komercijalno dostupan od tvrtke Invitrogen (San Diego, Kalifornija, SAD). Tako dobiven ob gen murine bio je upotrijebljen za konstrukciju vektora ekspresije pLPPsOmpA-mob za ekspresiju ob proteina murine (mob). Taj vektor ekspresije i njegova konstrukcija u pojedinostima su prikazani na slici 2.

Prvi stupanj konstrukcije bila je provedba fuzije signal-kodne sekvence iz sOmpA gena u zrelo kodno područje ob gena murine, tj. bez njene prirodne signalne sekvence. DNA fragment od 501 bp, koji kodira zreli ob protein murine, umetnut u pCDNA3 vektor, bio je izoštren od vektora lančanom reakcijom polimeraze (PCR) upotrebom Vent DNA polimeraze (New England Biolabs), prednji prajmer (prajmer 1), koji započinje s prvim nukleotidom kodona koji kodira valin (koji je prva amino kiselina u zreлом mob) (Zhang, Y. i sur., gore), i reverzni prajmer (prajmer 2) koji

odgovara području mob, koje sadrži stop kodon za mob. Prajmer 2 također sadrži sekvencu koja odgovara restrikcijskoj strani Hind III.

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

Prajmer 2: 5' TCCCAAGCTT TCAGCATTCAGGGCTAAC 3'
HINDIII stop

Izoštren fragment 501 bp DNA bio je očišćen elektroforezom pomoću gela agara i fosforiliran upotrebom T4 polinukleotid kinaze ("Boehringer") i zatim probavljen s restrikcijskim enzimom HindIII da nastane 5' izlazni kraj na mjestu prajmera 2. Dobiveni fragment ima tupi kraj koji odgovara prvom nukleotidu cDNA koji kodira zreli mob, i 5' izlazni kraj koji odgovara cijepljenoj strani HindIII.

Nadalje, OmpA plazmid pT10sOmpArPDI, dobiven po metodi De Suttera, K. i sur., gore, bio je fuzioniran na mob gen da nastane plazmid pT10sOmpAmob. Za tu provedbu bio je kloniran mob fragment povezivanjem pomoću T4 ligaze ("New England-Biolabs") u pT10sOmpArPDI vektor DNA, koji je prethodno bio probavljen s restrikcijskim enzimima NaeI i HindIII metodama poznatim u struci (Sambrook, J. i sur., u "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", drugo izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Taj pT10sOmpArPDI plazmid bio je deriviran od plazmida p714 [Parker i Wiley, Gene 83, 117-134 (1989)]. Taj plazmid sadrži cDNA koja kodira zreli rat protein disulfid izomerazu (rPDI) cDNA fuzioniran na sekvencu sOmpA.

Ta fuzija zadnjeg kodona u sOmpA (alanin) na prvi kodon u cDNA zrelog rPDI (glicin) stvorila je naeI restrikcijsku stranu, koja je nakon cijepljenja s NaeI otpustila posljednji kodon u sekvenci sOmpA i prvi kodon u cDNA koji kodira rPDI sekvencu kao tupe krajeve.

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

HindIII strana postoji na kraju cDNA koji kodira rPDI. Zbog toga, daljnjom probavom tog plazmida s HindIII otpušten je glavni dio rPDI cDNA i stvoren 5' izlazni kraj kompatibilan s jednim od krajeva fragmenta PCR. Dobiveni plazmid, gdje cDNA kodira rPDI, bio je premješten pomoću cDNA, koja kodira zreli mišji ob, i nazvan je pT10sOmpAmob i prikazan je na slici 2.

Ligand DNA uveden je u E. coli, rod MC1061, primjenom standardne elektroporacije i dobivene kolonije bile su zaklonjene za prisutnost fragmenta ob DNA murine pomoću analize restrikcijskog enzima. Klon pT10sOmpAmob ima sekvencu koja kodira zreli ob protein murine fuzioniran na sekvencu koja kodira sOmpA.

Nadalje, ekspresija mob u E. coli, u tom pT10sOmpAmob, bila je provedena pod kontrolom lipoproteinskog promotora (P_{lpp}) i lac promotor-operatora (PO_{lac}). Da bi se to učinilo, sekvenca sOmpA-mob hibridnog gena bila je prenešena iz plazmida pT10sOmpAmob u plazmid vektor pLPPsOmpArPDI standardnim postupkom koji su opisali De Sutter i sur., gore. Plazmid pLPPsOmpArPDI bio je deriviran, kako je već bilo gore spomenuto, od plazmida p714 [Parker i Wiley, Gene 83, 117-134 (1989)]. Za taj korak, plazmid pT10sOmpAmob DNA bio je cijepljen s restrikcijskim enzimima XbaI i HindIII. Fragment koji sadrži sOmpA-mob koji kodira DNA bio je zatim povezan u plazmid pLPPsOmpArPDI, od kojeg je sOmpA-rPDI, koji kodira DNA, prethodno premješten cijepljenjem s restrikcijskim enzimima XbaI i HindIII. Dobiveni plazmid nazvan je pLPPsOmpAmob.

Primjer 3 Ekspresija ob proteina murine u E.coli (MC1061)

Ekspresija ob proteina murine u E. coli provedena je kako slijedi. Plazmid pLPPsOmpAmob, konstruiran sukladno primjeru 2, bio je umetnut elektroporacijom u E. coli, rod MC1061. Stanice E. coli (MC1061), koje su udomile plazmid pLPPsOmpAmob, rasle su preko noći pri 28°C u Luria-Bertania ("Difco Laboratories") mediju nadopunjenim s antibiotikom karbenicilinom (100 µg/ml, "Beecham"). Zatim je ta kultura uzeta kao cjepivo (strostruko razrjeđenje) za 30 ml prekončne kulture pri 28°C u istom mediju. Zatim je ta kultura stostruko razrijeđena u 3 litre (tj., 6 x 0,5 l u erlenmayer tikvice od 1 l) u gornjem mediju i mućkana 4 sata pri 28°C u New Brunswick zračnoj mućkalici (300 okr/min) dok se je postigla gustoća od A_{600} 0,3 do 0,5. U to vrijeme lac promotor bio je uveden dodatkom 2 mM krajnje koncentracije izopropil-β-D-tiogalaktopiranozida (IPTG, "Boehringer"), kako su opisali De Sutter i sur., gore.

Zatim su stanice bile inkubirane pribl. 5 sati pri 28°C, sve dok se je postigla stanična gustoća A_{600} od 1,3 do 1,5. Zatim su stanice skupljene centrifugiranjem 6 minuta u JA10 rotoru (centrifuga Beckman, model J2-21 ili J2-21M) pri 6750 okr/min (8000 x g) pri 4°C. Supernatant je bio uklonjen i stanični talog je brzo opet suspendiran u 250 ml ledeno hladnog pufera za osmotski šok (100 mM Tris-HCl, pH 7,4 koji je sadržavao 20% saharoze 10 mM EDTA) i inkubiran na ledu tijekom 10 do 20 minuta, kako su opisali Koshland i Botstein, gore.

Nakon toga suspenzija je prenesena u plastične cijevi centrifuge i stanice su skupljene centrifugiranjem 5 minuta pri 8200 okr/min (8000 x g) pri 4°C u rotoru JA20. Supernatant je brzo uklonjen, a stanični talog brzo je opet suspendiran u 120 ml ledeno hladne vode uz snažno mućkanje i inkubiran na ledu dodatnih 10 minuta. Zatim je suspenzija centrifugirana 6 minuta u rotoru JA20 pri 4°C kod 11.500 okr/min (16.000 x g) i skupljen je supernatant koji odgovara frakciji periplazme (tekućina osmotkog šoka) (pribl. 120 ml). Do krajnje koncentracije od 0,05%, odnosno 50 mM, dodani su natrijev azid i Tris-HCl (pH 7,5). Tekućina za osmotski šok, koja sadrži ob protein murine, bila je odložena pri -20° do daljenje upotrebe.

Primjer 4

Ekspresija ob proteina murine u E. coli (MC1061)

Ekspresija ob proteina murine bila je provedena u skladu s postupkom opisanim u primjeru 3, osim što je umjesto karbenicilina mediju Luria-Bertaria bio dodan antibiotik triacilin (100 µg/ml).

Primjer 5

Čišćenje ob proteina murine od osmotske tekućine za E. coli

ob protein murine, koji se nalazi u 120 ml smrznute tekućine za osmotski šok, u skladu s primjerom 4, bio je očišćen kako slijedi. Da se uklone netopivi sastojci 120 ml tekućine za osmotski šok, koja sadrži ob protein murine, odmrznuto je i centrifugirano 20 minuta pri 4°C kod 16.000 okr./min u rotoru JA20. Supernatant je zatim stavljen izravno u kolonu koja je sadržavala 30 ml osnovnog volumena Q-Sepharose Fast Flow ("Pharmacia") uravnotežene s puferom 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). Nakon ispiranja s 50 mM pufera Tris-HCl (pH 7,5), mob protein je ispran s 50 mM puferom Tris-HCl (pH 7,5) koji je sadržavao 0,1 M NaCl.

Zatim je k materijalu ispranom iz kolone koja je sadržavala Q-Sepharose Fast Flow dodan čvrsti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do konačne koncentracije od 1,0 M i smjesa je stavljena na kolonu koja sadrži 7,5 ml osnovnog volumena Butyl-Sepharose Fast Flow ("Pharmacia") prethodno ekvilibriranog s 50 mM pufera Tris-HCl (pH 7,5) koji je sadržavao 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nakon ispiranja s puferom Tris-HCl (pH 7,5) koji sadrži 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mob protein je ispran primjenom gradijenta koncentracije od 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u 50 mM puferu Tris HCl do 20% etilenglikola u vodi. mob protein ispran je iz kolone Butyl-Sepharose Fast Flow pri samom kraju gradijenta, a većina nečistoća isprana je mnogo ranije. Kako je utvrđeno elektroforezom pomoću srebrne mrlje poliakrilamidnog gela (PAGE), čistoća mob proteina u toj fazi bila je 90%.

mob protein u materijalu ispranom iz kolone koja je sadržavala Butyl-Sepharose Fast Flow dalje je očišćen kromatografijom s gel filtracijom. Za provedbu tog čišćenja, mišji ob protein koncentriran je pri 4°C na volumen od 1 ml na membrani YM10 ("Amicon") pomoću koncentracijske 8MC ("Amicon"), i stavljen je na kolonu (1,0 cm x 50 cm) koja je sadržavala 39 ml G100-Sephadex-a ("Pharmacia") prethodno ekvilibriranog u fosfatno puferiranoj otopini soli. Frakcije koje su sadržavale mob protein bile su zatim skupljene i protein je koncentriran na membrani YM10. Kako je potvrđeno s PAGE i srebrnom mrljom, u toj fazi mob protein bio je čišći od 95%. SDS-PAGE pokazuje traku jednostrukog proteina kod Mr 15.000.

Primjer 6

Analiza sekvence ob proteina murine

Sekvenca N-terminalne amino kiseline dobivenog ob proteina murine i očišćenog postupcima opisanim gore u primjerima 2, 3, 4 i 5 bila je provedena u skladu s postupkom koji je opisao Laemli, U.K., gore. Nakon elektrotransfera elektroforeziranog proteina u ploču od staklenih vlakana prevučenu s poli(4-vinil N-metilpiridinijevim jodidom), kako su opisali Bauw, G. i sur., J. Biol. Chem. 7, 194-196 (1988), traka proteina s Mr 15.000 izrezana je iz membrane i sekvenca N-terminalne amino kiseline utvrđena je Edmanovom degradacijom na sekvenatoru 470A sa plinskom fazom opremljenom sa 120A kontinuiranim feniltio-hidantionskim analizatorom amino kiseline ("Applied BioSystems"). Sekvenca N-terminalne amino kiseline ob proteina murine dobivena gore opisanim postupkom bila je Val-Pro-Ile-Gln koja je odgovarala zreom ob proteinu murine SEQ ID NO: 3.

Primjer 7

Konstrukcija vektora ekspresije vektora humanog ob proteina (hob)

Humani ob gen, dobiven u skladu s postupcima primjera 1, bio je upotrijebljen za konstrukciju vektora ekspresije pLPPsOmpAhob1 za ekspresiju humanog ob proteina. Ta konstrukcija bila je slična konstrukciji pLPPsOmpAmob, koja je opisana u primjeru 2 i u pojedinostima je prikazana na slici 3. Povezivanje tri fragmenta bilo je potrebno za kompletiranje DNA fragmenta koji je sadržavao ulaznu kodnu sekvencu zrelog humanog ob.

U prvom stupnju konstrukta, sekvenca hob nukleotida, koja započinje s prvim nukleotidom kodona koji kodira prvu amino kiselinu zrelog humanog ob proteina (valin), fuzionirana je na signal-kodnu sekvencu na OmpA (sOmpA), tako da je sekvenca sOmpA poviše kraja 5' kodne sekvence hob nukleotida. Taj DNA fragment dobiven je izoštavanjem u PCR smjesi koja je sadržavala plazmid pBluescriptSK⁺hob1, Vent DNA polimerazu, i dva prajmera. Prednji prajmer (prajmer 1) započet je s prvim nukleotidom kodona koji kodira prvu amino kiselinu zrelog humanog ob proteina, a suprotni prajmer (prajmer 2) sadržavao je sekvencu humane cDNA koja nosi stop kodon. Reakcijom izoštavanja dobiven je DNA fragment od 501 bp koji nosi sekvencu koja kodira zreli humani ob protein. Kraj 5' tog DNA fragmenta bio je zatim fosforiliran s T4 polinukleotidnom kinazom i probavljen s restriktivnim enzimom HindIII, i dobiven je 353 bp DNA fragment koji ima kraj blunt koji odgovara prvom nukleotidu cDNA koji kodira zreli hob (položaj odgovara prajmeru 1), i izlazni kraj 5' koji odgovara cijepljenjoj strani HindIII. Taj 353 bp DNA fragment očišćen je elektroforezom na gelu agara i kloniran u pT10sOmpArPDI plazmid koji je bio prethodno probavljen s restriktivnim enzimima Nae I i HindIII. Dobiveni plazmid pT10sOmpAhob1 (djelomičan) ima DNA fragment koji kodira dio zrelog humanog ob proteina (amino-terminalni dio) fuzioniran na sekvencu koja kodira sOmpA.

Prajmer 1: 5' GTGCCCATCCAAAAAGTC 3'

Prajmer 2: 5' TCCCAAGCTTTCAGCACCCAGGGCTGAG 3'
stop

U drugom stupnju, DNA sekvenca koja kodira karboksi terminalni dio humanog ob proteina, tj. fragment 2, bio je povezan na DNA fragment koji kodira amino-terminalni dio zrelog hob, a dobiveni fragment, koji kodira ulaznu sekvencu zrelog hob fuzioniranog na sOmpA, bio je premješten na plazmid pLPPsOmpArPDI da izazove ekspresiju zrelog humanog ob proteina u E. coli pod kontrolom lipoproteinskog promotora i lacpromotor-operatora. Da se provede, plazmid pT10sOmpAhob1 (djelonično) bio je probavljen sa XbaI i HindIII i 400 bp DNA fragment 1 od hob bio je izoliran elektroforezom na gelu agara (fragment 1). Dalje je plazmid pBluescriptSK⁺hob1 bio cijepljen s HindIII i EcoRI, i izoliran je 450 bp elektroforezom na gelu agara (fragment 2). Konačno, plazmid pLPPsOmpArPDI cijepljen je s XbaI i EcoRI, i vektorski fragment izoliran je elektroforezom na gelu agara (fragment 3). DNA fragmenti 1, 2 i 3 bili su zatim povezani jedan na drugi i mješavina dobivena povezivanjem uvedena je u E. coli, rod MC1061. Kolonija koja je sadržavala konačni proizvod konstrukcije plazmid pLPPsOmpAhob1 upotrijebljena je za ekspresiju i izlučivanje zrelog humanog ob proteina.

Primjer 8

Ekspresija humanog ob proteina u E. coli (MC1061)

pLPPsOmpAhob1 konstruiran u skladu s primjerom 7 upotrijebljen je za transformaciju E. coli, roda MC1061, za ekspresiju humanog ob proteina u topivi biološki aktivan oblik u periplazmi stanica domaćina E. coli. Umetanje plazmida u te stanice domaćina E. coli provedeno je elektroporacijom. E. coli stanice (MC1061) koje su udobile plazmid pLPPsOmpAhob1 rasle su pri 28°C u mediju Luria-Bertania ("Difco Laboratories") kojem je dodat antibiotik karbencilin (100 µg/ml, "Beecham") do odgovarajuće gustoće, nakon čega je uveden lac promotor dodatkom izopropil-β-D-tiogalaktopiranozida (IPTG, "Boehringer") krajnje koncentracije 2 mM, kako su opisali De Sutter i sur., gore. Stanice su dalje rasle dok je stanična gustoća dosegla 1,3 A₆₀₀. Zatim su stanice skupljene centrifugiranjem (8000 x g pri 4°C) i stanični talog je opet brzo suspendiran u ledeno hladnom puferu za osmotski šok (100 mM Tris-HCl, pH 7,4 koji sadrži 20% saharoze i 10 mM EDTA) i inkubiran 10 minuta na ledu kako su opisali Koshland i Botstein, gore.

Nakon toga, stanice su opet skupljene centrifugiranjem kao gore i stanični talog je opet suspendiran u ledeno hladnoj vodi i inkubiran 10 minuta na ledu. Suspenzija je zatim centrifugirana 5 minuta kod 16.000 x g i supernatant (tekućina za osmotski šok) je pokupljen. Dodat je natrijev azid i Tris-HCl (pH 7,5) do konačne koncentracije od 0,05%, odnosno i 50 mM. Tekućina za osmotski šok, koja je sadržavala humani ob protein, odložena je do daljnje upotrebe pri -20°C.

Primjer 9

Ekspresija humanog ob proteina u E. coli (Mc1061)

Ekspresija humanog ob proteina provedena je primjenom postupka iz primjera 8, osim što je umjesto karbencilina mediju Luria-Bertaria dodan antibiotik triacilin (100 µg/ml).

Primjer 10Čišćenje humanog ob proteina od E. coli osmotske tekućine

Za čišćenje humanog ob proteina u tekućinu za osmotski šok primjera 9 dodan je NaCl do krajnje koncentracije tekućine od 0,1 M i tekućina je zatim izravno izlivena na kolonu koja je sadržavala 30 ml osnovnog volumena Q-Sepharose Fast Flow ("Pharmacia") prethodno ekvilibrirane s puferom 50 mM Tris-HCl (pH 7,5).

Zatim, k materijalu ispranom iz kolone koja je sadržavala Q-Sepharose Fast Flow dodan je čvrsti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do konačne koncentracije od 1,0 M i smjesa je stavljena na kolonu koja sadržavala 7,5 ml osnovnog volumena butil-Sepharose Fast Flow ("Pharmacia") prethodno ekvilibriranog s 50 mM puferom Tris-HCl (pH 7,5) koji je sadržavao 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nakon ispiranja s puferom Tris-HCl (pH 7,5) koji je sadržavao 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hob protein je ispran primjenom gradijenta koncentracije od 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u 50 mM puferu Tris HCl (pH 7,5) do 20% etilenglikola u vodi. hob protein ispran je iz kolone butil-Sepharose Fast Flow pri samom kraju gradijenta, dok je većina nečistoća isprana mnogo ranije. Kako je utvrđeno elektroforezom pomoću srebrne mrlje poliakrilamidnog gela (PAGE), čistoća mob proteina u toj fazi bila je 90%.

hob protein u materijalu ispranom iz kolone koja je sadržavala butil-Sepharose Fast Flow dalje je očišćen kromatografijom s gel filtracijom. Za tu provedbu humani ob protein koncentriran je pri 4°C na volumen od 1 ml na YM10 ("Amicon") membrani pomoću koncentracijske 8MC ("Amicon"), i stavljen je na kolonu (1,0 cm x 50 cm) koja je sadržavala 39 ml G100-Sephadex ("Pharmacia") prethodno ekvilibriranog u fosfatno puferiranoj otopini soli. Frakcije koje su sadržavale mob protein bile su zatim skupljene i protein je koncentriran na YM10 membrani. U toj fazi mob protein bio je čišći od 95% kako je potvrđeno s PAGE i srebrnom mrljom. SDS PAGE analiza eluata potvrdila je traku jednostrukog protein kod Mr 15.000.

Primjer 11Čišćenje humanog ob proteina od E. coli osmotske tekućine

Za čišćenje humanog proteina u tekućini za osmotski šok iz primjera 9 primijenjen je postupak iz primjera 10 sa slijedećim izuzetkom. Prije dodatka čvrstog $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ k protočnom materijalu provedeni su slijedeći postupci s obzirom na tekućinu osmotskog šoka iz primjera 9.

Humani ob protein u tekućini za osmotski šok iz primjera 9 stavljena je izravno na kolonu koja je sadržavala 30 ml osnovnog volumena Q-Sepharose Fast Flow ("Pharmacia") prethodno ekvilibriranog s puferom 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). Nakon ispiranja s puferom 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) hob protein je ispran s puferom 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) koji je sadržavao 0,1 M NaCl.

Primjer 12Sekvenčna analiza humanog ob proteina

Sekvenčna analiza N-terminalne amino kiseline humanog ob proteina, dobivenog i očišćenog postupcima opisanim gore u primjerima 7-11, bila je provedena u skladu s postupkom koji je opisao Laemli, U.K., gore. Nakon elektrotransfera elektroforeziranog proteina u pločicu od staklenog vlakna prevučenu s poli(4-vinil N-metilpiridinijevim jodidom), kako su opisali Bauw, G. i sur., gore, traka proteina s Mr 15.000 izrezana je iz membrane i sekvenca N-terminalne amino kiseline određena je Edmanovom degradacijom na sekvenatoru 470A s plinskom fazom opremljenom sa 120A kontinuiranim feniltio-hidantionskim analizatorom amino kiseline ("Applied BioSystems"). Sekvenca s N-terminalnom amino kiselinom hob proteina, dobivena gore opisanim postupkom, bila je Val-Pro-Ile-Gln koja je odgovarala zreloom humanom ob proteinu SEQ ID NO: 6.

Primjer 13Biološka aktivnost ob proteina murine:Intracerebroventrikularno (ICV) ubrizgavanje u ob/ob miševe

Biološka aktivnost ob proteina murine, očišćenog u skladu s primjerom 5, bila je utvrđena primjenom ICV metode kako slijedi. Infuzijske kanile ugrađene su u bočnu šupljinu mozga anesteziranih ženki debelih ob/ob miševa (starosti 6-13 tjedana) upotrebom slijedećih koordinata (2 mm bočno od središnje linije; 0,6 mm u odnosu prema bregmi; 2 mm dolje) na osnovi metoda koje su opisali Haley i McCormick, gore. Kraj kanile montiran je na lubanju pomoću draguljarskog vijka i zubarskog cementa. Miševi su bili smješteni pojedinačno u plastične kaveze sa slobodnim pristupom hrani (osim tijekom noći prije ICV injekcije) i vodi. Nakon oporavka od kirurškog zahvata, što je utvrđeno dnevnim uzimanjem hrane i porastom tjelesne težine, miševi su proučavani u nekoliko slučajeva iza intracerebroventrikularne (ICV) injekcije od 1 µl jedne od slijedećih ispitnih otopina:

- 1) lažna CSF;
- 2) otopina s bakterijskom kontrolom;
- 3) ob protein (0,6 do 1 μ l/mišu); ili
- 4) bez infuzije.

ICV injekcija jedne od gornjih ispitnih otopina svakom mišu bila je popraćena s 1 μ l lažnog CSF za čišćenje kanile. Za svrhe ovog pokusa, otopina s bakterijskom kontrolom bila je uzorak identično obrađen i pripremljen u skladu s postupcima provedenim u primjerima 2-4, osim da plazmid umetnut u bakterije E. coli nije bio prisutan u ob genu murine.

Prije ICV injekcije miševi su bili zatvoreni 18 sati (preko noći). Miševi su bili blago umireni i za ubrizgavanje 1 μ l ispitne otopine u kanilu smještenu u lateralnoj šupljini upotrijebljena je 10 μ l Hamilton injekcija učvršćena s komadićem prethodno kalibrirane polietilenske (PE) cjevčice (PE20). Miševi su odmah stavljeni u ispitni kavez s posudom s hranom koja je sadržavala prethodno odvagnutu količinu tabletirane mišje hrane i bočicom vode. Miševi su vizuelno promatrani, a uzimanje hrane bilo je mjereno slijedećih sedam sati. Mjerenja uzimanja hrane provedena su 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 i 7 sati nakon ICV-injekcije. Tjelesna težina svake životinje izmjerena je prije ICV injekcije i 24 sata kasnije. Uspješnost postavljanja kanile bila je dokazano povećanim uzimanjem hrane 2 sata iza ICV injekcije od 10 ug neuropeptida Y kod miševa zatvorenih 2 sata u skladu s postupkom koji su opisali Morley, J.E. i sur., American J. Physiol. 253, 516-522 (1987).

Rezultati gore opisanog ICV ispitivanja bili su slijedeći:

A. Smanjenje uzimanja hrane

Tijekom prvih 30 minuta nakon ICV injekcije gotovo svi miševi jeli su s kratkom pritajenošću i konzumirali su približno 0,5 grama. Miševi, koji nisu dobili injekciju ili su dobili lažni CSF, nastavili su jesti tijekom slijedećih 6,5 sati i nakon 7 sati pojeli su ukupno 3,2 grama (tablica 1). Nasuprot tome, miševi obrađeni s ICV ob proteinom prestali su jesti nakon prvih 30 minuta i više nisu jeli. Tako se je njihovo ukupno uzimanje hrane zadržalo tijekom slijedećih 6,5 sati na približno 0,5 grama (tablica 1). Miševi, koji su dobili ICV vehikl kontrolnu otopinu, također su prestali jesti nakon 30 minuta, i počeli su opet jesti tek nakon 6 do 7 sati.

B. Smanjenje porasta tjelesne težine

Promjena tjelesne težine u 24 sata kod miševa kojima je ubrizgana vehikl kontrolna otopina bila je malo manja u usporedbi s miševima kojima je ubrizgan lažni CSF ili onima koji nisu dobili injekciju (tablica 1). Međutim, postotak promjene tjelesne težine kod miševa kojima je ubrizgan ob protein bio je skoro nula i bio je značajno manji u usporedbi s miševima kojima je ubrizgana vehikl kontrolna otopina (tablica 1).

C. Zaključak

Dokazan je promatrani učinak izravno datog rekombinantnog mišjeg ob proteina (1,1 μ g/mišu u 1 μ l u mozak) i značajno smanjenje uzimanja hrane i porasta tjelesne težine ženki ob/ob miševa. To pokazuje da ob protein može djelovati izravno na mozak i može se povezati s učinkom intraperitonealno ubrizganog ob proteina. Taj primjer također potvrđuje biološku aktivnost bakterijski umnoženog rekombinantnog ob proteina murine kod ženki debelih ob/ob miševa u skladu s izumom.

Tablica 1

Obrada	Uzimanje hrane		Porast tjelesne težine (0-24 sata)	
	g	%**	g	%
Umjetni CSF	3,2 $\pm$ 0,2	100	3,8 $\pm$ 0,3	100
Vehikl kontrola	0,9 $\pm$ 0,3	28,1	2,9 $\pm$ 0,2	76
ob protein (1 μ g/mišu)	0,5 $\pm$ 0,1*	15,6	0,3 $\pm$ 0,5*	8

* označava signifikantne razlike između ob proteina i lažnih Cerebro Spinal Fluid (CSF) skupina s p<0,05.

** označava postotak kontrole.

Primjer 14Biološka aktivnost ob proteina murine datog intravenski (IV) ob/ob miševima

Biološka aktivnost ob proteina murine dobivenog i očišćenog u skladu s primjerima 2, 3, 4 i 5 bila je ispitana intravenskim (IV) ubrizgavanjem ob/ob miševima kako slijedi.

Mušjacima i ženkama debelih ob/ob miševa (starosti 6-13 tjedana) ugrađene su trajne vratne kanile pod pentobarbitalnom anestezijom (80 mg/kg tjelesne težine) u skladu metodom koju su opisali Mokhtarian A., i sur., *Physiol. Behav.* 54, 895-898 (1993). Miševi su pojedinačno smješteni u plastične kaveze pod konstantnim uvjetima okoline sa ciklusima od 12 sati mraka i 12 sata svjetla. Dnevno su mjerene tjelesne težine, a vidljivost i održavanje kanila bilo je potvrđeno svaki drugi dan infuzijom $\leq 0,1$ ml sterilne otopine heparin/soli (50 U/ml u 0,9% soli). Nakon oporavka od kirurškog zahvata, što je utvrđeno porastom tjelesne težine, miševi su zatvoreni 16-18 sati (preko noći). Slijedeće jutro miševi su bili izvagani i stavljeni u ispitne kaveze na 45 minuta da se prilagode prije pokusa. Voda je bila trajno dostupna. Miševima je intravenski ubrizgan ob protein (3 μ g u 0,1 ml) ili ekvivalentan volumen kontrolnog vehikla ili otopine soli (0,9%). Budni miševi bili su blago smireni i za ubrizgavanje 0,1 ml ispitne otopine popraćene s 0,05 ml otopine heparin/soli bilo je upotrijebljeno 0,5 ml otopine inzulina. Pokusne životinje bile su odvojene najmanje tri dana. Neposredno zatim miševi su odmah premješteni u ispitne kaveze s prethodno izvaganim petrijevim zdjelicama s tabletama mišje hrane.

Miševi su promatrani vizualno, a uzimanje hrane bilo je mjereno slijedećih sedam sati i to 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 i 7 sati nakon IV-injekcije. Tjelesna težina svake životinje izmjerena je prije IV injekcije i opet 24 sata kasnije. Dvije odvojene skupine kaniliranih miševa (11 ob/ob i 12 mršavih) bilo je uzeto za pet pojedinačnih pokusa. Većina miševa primila je mišji ob protein i jednu ili obje kontrolne injekcije pravilnim redoslijedom. U ovom pokusu korištene su dvije odvojene pripreve mišjeg ob proteina. Ovdje prikazani podaci su kombinacija rezultata tih pojedinačnih replikacija.

A. Rezultati

Rezultati gornjeg pokusa su slijedeći:

Tijekom prvih 30 minuta nakon IV injekcije većina debelih i mršavih miševa jela je s kratkom pritajenošću i konzumirali su približno 0,3-0,5 grama. Uzimanje hrane kod debelih miševa, kojima je ubrizgana otopina soli i kontrolni vehikl, povećano je tijekom pokusa. Ukupno uzimanje hrane kod debelih ob/ob miševa kojima je ubrizgan kontrolni vehikl nije se razlikovalo od uzimanja hrane kod slično zatvorenih debelih miševa kojima je bila ubrizgana otopina soli. Nasuprot tome, uzimanje hrane kod debelih ob/ob miševa, kojima je ubrizgan rekombinantni ob protein, bilo je značajno reducirano i ostalo je potisnuto na 57% (tablica 2). Tijekom perioda promatranja nisu bili opaženi nikakvi drugačiji učinci na ponašanje u skupinama koje su dobile kontrolni vehikl i u skupinama koje su dobile ob protein. Prema očekivanjima, 24 sata nakon injekcije porast tjelesne težine nije se razlikovalo u obrađenim skupinama (tablica 2) zbog ograničenog trajanja djelovanja jednostrukog IV bolusa mišjeg ob proteina.

C. Zaključci

Ovi rezultati pokazuju da rekombinantni mišji ob protein značajno smanjuje ukupno uzimanje hrane tijekom 7 sati nakon IV davanja (3 μ g/mišu) kod debelih ob/ob miševa. Sposobnost rekombinantnog mišjeg ob proteina da smanjuje uzimanje hrane kod debelih ob/ob miševa u skladu je s rezultatima uzimanja hrane dobivenim nakon ponovljene IP injekcije ob proteina kod debelih ob/ob miševa. Taj primjer također potvrđuje biološku aktivnost bakterijski umnoženog rekombinantnog mišjeg ob proteina kod ženki debelih ob/ob miševa.

Tablica 2

Obrade	Uzimanje hrane (0-7 sati)		Porast tjelesne težine (0-24 sata)	
	g	%**	g	%
Otopina soli (n = 4)	1,8 $\pm$ 0,2		2,9 $\pm$ 0,3	
Vehikl kontrola (n = 7)	1,4 $\pm$ 0,3	100	2,2 $\pm$ 0,6	100
ob protein (1 μ g/mišu), (n = 8)	0,8 $\pm$ 0,2*	57	1,4 $\pm$ 0,6	64

Podaci predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ sem. n = označava broj pojedinačnih miševa, sem znači "standardno odstupanje od prosjeka" (e. standard error of the mean),

* označava signifikantne razlike između skupina koje su primile ob proteina i onih koje su primile lažni CSF s $p < 0,05$.

** označava postotak kontrole.

Primjer 15

Biološka aktivnost ob proteina murine: ponovljena IP injekcija kod ob/ob miševa

Biološka aktivnost ob proteina murine, dobivenog i očišćenog u skladu s primjerima 2-5, bila je ispitana ponovnim intraperitonealnim (IP) ubrizgavanjem debelim ob/ob miševima kako slijedi.

Proučavane su tri skupine od po šest ženki debelih ob/ob miševa. Miševi su stavljani u plastične kaveze (po tri u jedan kavez) pod konstantnim uvjetima okoline sa ciklusima od po 12 sati mraka i 12 sati svjetla. Svaki dan mjereno je uzimanje hrane tijekom 24 sata i tjelesna težina. Nakon perioda prilagođavanja na uvjete okoline i dnevne obrade i injekcija, miševi su razvrstani u tri skupine obrade. Svaki miš dobio je dvije intraperitonealne (IP) injekcije svakog dana obrade (kratko prije početka faze mraka ciklusa mrak/svjetlo i tri sata nakon početka faze mraka) od 0,1 ml slijedećih ispitnih otopina:

- 1) otopina soli (0,9%);
- 2) bakterijska kontrolna otopina; ili
- 3) ob protein murine (3 μ g/0,1 ml).

Bakterijska kontrolna otopina bila je uzorak identično proizveden i pripremljen u skladu s postupcima dobivanja i čišćenja ob proteina murine provedenim u primjerima 2-4, s izuzetkom da plazmid umetnut u E. coli bakterije nije bio prisutan u ob genu murine. Miševi su bili obrađeni dva puta dnevno tijekom pet dana i zatim dva dana nije bilo nikakve obrade. Uzimanje hrane u svakom kavezu bilo je mjereno 2, 3, 5 i 24 sata nakon prve IP injekcije svakog dana obrade.

A. Rezultati

Smanjenje uzimanja hrane

Tijekom pokusa od jednog tjedna uzimanje hrane nije se razlikovalo kod miševa koji su primili otopinu soli i bakterijsku kontrolnu injekciju u danima obrade i danima kad nije bilo obrade (tablica 3). Međutim, uzimanje hrane smanjeno je kod šest miševa kojima je tijekom pokusa u danima obrade ubrizgano 6 μ g ob proteina. Smanjenje uzimanja hrane bilo je opaženo 2, 3, 5 i 24 sata nakon prve injekcije u danima obrade u skupini miševa koji su primili ob protein u usporedbi sa kontrolnim skupinama koje su primile bakterijsku kontrolnu i otopinu soli.

Smanjenje porasta tjelesne težine

Ukupni porast tjelesne težine tijekom 5 dana obrade kod skupine koja je primila ob protein bilo je $-3,3 \pm 0,7$ grama u usporedbi s $-0,9 \pm 0,2$ grama i $-0,7 \pm 0,4$ grama kod kontrolnih skupina koje su primile otopinu soli, odnosno bakterijsku kontrolnu otopinu (tablica 3).

Zaključak

Ovaj primjer pokazuje da dvije dnevne IP injekcije bakterijski umnoženog rekombinantnog ob proteina murine (6 μ g/mišu/danu) rezultira signifikantnim, dokazivim smanjenjem uzimanja hrane i značajnim smanjenjem stupnja porasta težine obrađenih ženki ob/ob miševa u usporedbi s kontrolnim ob/ob miševima obrađenim s otopinom soli i bakterijskom kontrolnom otopinom. Ti rezultati potvrđuju da je bakterijski umnožen ob protein biološki aktivan i može se očekivati učinak protiv debljanja na genetički debelim ob/ob miševima u skladu s ovim izumom. U tablici 3 rezultati za dva i pet sati predstavljaju prosječno dnevno uzimanje hrane, dok rezultati za 24 sata pokazuju ukupno uzimanje hrane za pet dana.

Tablica 3. Ponovljeno IP davanje ob proteina murine kod ob/ob miševa.

Obrada		Uzimanje hrane (g/3 miša)				Povećanje tjelesne težine grami	
		2 sata		5 sati		24 sata	
		g	% kontr.	g	% kontr.	g	% kontr.
bez	inj-	5,5 $\pm$ 0,5		14,5 $\pm$		44,3 $\pm$	-0,9 $\pm$ 0,2

ekcije			0,5		3,5		
kontrola	7,0±0,5	100	16,5±	100	49,5±	100	-0,7±0,4
			1,5		6,1		
ob protein	3,5±	50	5,5±	33	25,5±	52	-3,3±
	0,5*		1,0*		4,6*		0,7*

Podaci predstavljaju srednju vrijednost ± standardno odstupanje za šest ob/ob miševa u svakoj skupini. Uzimanje hrane je prosječno ukupno uzimanje hrane za kaveze sa po tri miša tijekom 5 dana obrade i to 2, 5 i 24 sata nakon prve IP injekcije. Porast tjelesne težine je ukupna promjena tjelesne težine tijekom pet dana obrade.

* označava signifikantne razlike između skupina koje su primile ob protein i skupina koje su dobile vehikl sa $p < 0,05$.

Primjer 16

Biološka aktivnost humanog ob proteina:

intracerebroventrikularna (ICV) injekcija ob/ob miševima

Metode primijenjene za određivanje biološke aktivnosti humanog ob proteina intracerebroventrikularnom ICV injekcijom ob/ob miševima bile su jednake kao u primjeru 13 s izuzetkom da su ispitne otopine bile:

Rekombinantni humani ob protein proizveden u primjeru 11 (0,05 µg) u fosfatno puferiranoj otopini soli (PBS) koja je sadržavala 0,1% mišjeg seruma albumina; i PBS koji je sadržavao 0,1% (masa/volumen) mišjeg seruma albumina (albuminska kontrola) kao vehikl kontrolnu otopinu.

A. Smanjenje uzimanja hrane

Tijekom prvih 30 minuta nakon ICV injekcije gotovo svi miševi jeli su s kratkom pritajenošću i konzumirali su približno 0,5 grama. Miševi koji nisu dobili injekciju nastavili su jesti tijekom sljedećih 6,5 sati i za 7 sati uzeli su ukupno 1,8 grama hrane (tablica 4). Miševi koji su dobili ICV kontrolnu otopinu albumina također su prestali jesti nakon 30 minuta i opet su počeli jesti tek nakon približno između 3 i 7 sati. Suprotno tome, miševi koji su ICV dobili humani ob protein jeli su značajno manje u prvih 30 minuta (0,2 grama) i jeli su vrlo male količine tijekom sljedećih 6,5 sati. Njihovo ukupno uzimanje hrane ostalo je potisnuto tijekom sljedećih 6,5 sati na približno 0,4 grama (tablica 4).

B. Smanjenje porasta tjelesne težine

Promjena tjelesne težine u 24 sata kod miševa kojima je ubrizgana vehikl kontrola bila je malo manja u odnosu prema skupini kojoj je ubrizgan lažni CSF ili skupini kojoj nije ubrizgano ništa (tablica 4). Međutim, postotak promjene tjelesne težine kod miševa kojima je ubrizgan humani ob protein bila je skoro nula (tablica 4).

C. Zaključak

Promatrani učinak izravno datog rekombinantnog humanog ob proteina (0,05 µg/mišu u 1 µl) u mozak koji dovodi do potisnutog i značajnog smanjenja uzimanja hrane i smanjenja porasta tjelesne težine ženki ob/ob miševa pokazuje da ob protein može djelovati izravno na mozak i u skladu je s učinkom ob proteina datog IP injekcijom. Ovaj primjer također potvrđuje biološku aktivnost bakterijski umnoženog rekombinantnog humanog ob proteina kod ženki debelih ob/ob miševa.

Tablica 4: ICV davanje humanog ob proteina ob/ob miševima

Obrade	Uzimanje hrane (0,7 sati)		Porast tjelesne težine (0-24 sata)	
	g	%**	g	%**
bez injekcije (n=3)	1,8±0,2		3,1±0,4	
kontrolna, albumin	1,0±0,4	100	1,7±0,6	100
humani ob protein (1 µg/mišu) (n=5)	0,4±0,2*	40	0,0±0,8	0

Podaci predstavljaju srednju vrijednost ± standardno odstupanje. n je broj pojedinačnih miševa.

*pokazuje signifikantne razlike između skupina koje su primile humani ob protein i skupina koje su primile lažni CSF sa $p < 0,05$.

** pokazuje postotak kontrole.

Primjer 17Biloška aktivnost ob proteina kod debelih ispitanika:
Smanjenje izumanja ispitnog obroka nakon IV davanja

Biloška aktivnost humanog i ob proteina murine dobivenih i očišćenih u skladu s primjerima 7-11, određena je mjerenjem uzimanja ispitnog obroka nakon IV davanja ljudima kako slijedi.

Mršavi i debeli dobrovoljci predstavljeni su s ispitnim obrocima stalnog kaloričnog sadržaja u laboratoriju za jelo u dva slučaja primjenom metode koju su opisali Muurahainen, N.E. i sur., gore. Barem jedan sat prije davanja obroka, unutarnji IV kateter stavljen je u antekubitalnu ili venu podlaktice i držan je otvoren s heparinskom komorom. Stupnjevanje vizuelno analogne gladi određeno je 15 minuta prije, 15 minuta nakon davanja obroka, i pri završetku ispitnog obroka. Zatim je 20 minuta prije davanja obroka IV infuzijom dat humani ili ob protein murine ili otopina soli. Svaki ispitanik je upućen da od ispitnog obroka jede koliko hoće, sve dok se zadovolji. Izjerena je količina ispitnog obroka koju je uzeo svaki ispitanik. Svaki ispitanik primio je zatim infuzijom ili humani (0,5 mg/kg tjelesne težine) ili ob protein murine (0,5 mg/kg tjelesne težine) ili otopinu soli i izračunata je razlika uzetog ispitnog obroka pod tim uvjetima. U skupini koja je primila humani ili ob protein murine smanjena je količina konzumiranog obroka za najmanje 20%.

Primjer 18Biloška aktivnost ob proteina kod debelih dobrovoljaca:
Izazivanje gubitka težine ponovnim IV davanjem

Biloška aktivnost humanog i ob proteina murine, dobivenog i očišćenog u skladu s primjerima 7-11, određena je mjerenjem gubitka težine nakon ponovljenog IV davanja ob proteina slijedećom metodom.

Proučen je gubitak težine po metodi koju su opisali Drent, M.L. i sur., gore, s placebo usporedbenim, dvostrukim slijepim pokusom. Debeli dobrovoljci s indeksom tjelesne težine (e. Body mass indeks, BMI) većim od 27 izvagani su i stavljeni na dijetu s 1500 kcal tijekom 2-4 tjedna ispitnog perioda. Na kraju ispitnog perioda svi debeli ispitanici, koji su izgubili najmanje 1 kg tjelesne težine, nasumce su združeni u dvije skupine obrade za gubitak težine tijekom faze ispitivanja. Dobrovoljci su dobivali dnevno IV humani ili ob protein murine (0,5 mg/kg/danu) ili placebo (otopinu soli) tijekom najmanje 6 tjedana. Tjelesna težina zapisivana je tjedno. Nakon 6 tjedana obrade dobrovoljci koji su primili humani ili ob protein murine pokazali su signifikantno smanjenje tjelesne težine u usporedbi sa skupinom koja je primila placebo.

Primjer 19A. Priprava ob proteina iz stanica E. coli konjugiranog s polietilen glikolom

50 g istaloženih stanica E. coli, pripremljenih kako je opisano u primjeru 8, prije ponovnog suspendiranja suspendirano je s 11 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), koji je sadržavao 5 mM EDTA. Suspenzija je inkubirana 15 minuta pri 37°C, razrijeđena s dodatnih 11 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), koji je sadržavao 5 mM EDTA.

Nakon toga suspenzija je homogenizirana pomoću homogenizera 15 minuta kod 50% postavljene snage. Suspenzija je izbistrena centrifugiranjem jedan sat kod 8000 okr./min, pri 4°C. Talog je izvađen. Supernatant je razrijeđen s vodom do vodljivosti od 1,8 mS i stavljen izravno na kolonu napunjenu s 200 ml Q-Sepharose Past Flow (jaka smola za anionsku izmjenu iona), prethodno ekvilibriranu s 50 mM Tris-HCl (pH 8,5). Nakon ispiranja s ravnotežnim puferom apsorbirani ob protein ispran je iz kolone s istim ravnotežnim puferom koji je dodatno sadržavao 100 mM NaCl. Eluat dobiven nakon obrade kolone s ravnotežnim puferom koji je sadržavao natrijev klorid, nazvan je Q-Sepharose eluat.

K Q-Sepharose eluatu dodan je čvrsti NaCl do krajnje vodljivosti od 82 mS. Nakon toga eluat je stavljen na kolonu za hidrofobnu interakciju (HIC) napunjenu s 200 ml butil-Sepharose Fast Flow, prethodno ekvilibrirane s 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), koja je sadržavala 1M NaCl. Neapsorbirani materijali bili su isprani s ravnotežnim puferom, a apsorbirani ob protein ispran je s 50 mM amonijevim acetatom (pH 6,9) za proizvodnju HIC eluata. Pomoću HPLC revernih faza utvrđena je čistoće ob proteina u HIC eluatu od 95%. Očišćen ob protein je koncentriran na 3,7 mg/ml primjenom membrane (YM-10) za odvajanje po veličini. Membrana za odvajanje po veličini bila je membrana koja ne propušta molekule od 10.000 daltona ili veće. Nakon te faze koncentriranja pomoću membrane za odvajanje po veličini, ob protein je diafiltriran u 100 mM boratni pufer (pH 8,0) koji je bio upotrijebljen kao zaliha otopine ob proteina.

B. Pegilacija humanog ob proteina.

Za provedbu ove reakcije pegilacije bio je upotrijebljen reagens PEG₂-NHS formule II-A, gdje R je CH₃, zbroj n i n' je u području od 820 do 1040 s prosječnim zbrojem koji je približno 930 i koji ima prosječnu molekulsku masu od 40 kDa, a nabavljen je od tvrtke Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama. To je bila mješavina reagenata PEG₂-NHS formule II-A, gdje omjer n prema n' je približno 1,0, a zbroj n i n' je u području od 820 do 1040 jedinica s prosječnom molekulskom masom lanca PEG u toj mješavini koja je bila približno 20 kDa, tako da je prosječna molekulska masa reagensa bila približno 40 kDa s prosječnim zbrojem n i n' u toj mješavini od pribl. 930. K 2 mg ili 0,54 ml od 3,7 mg/ml zalihe otopine očišćenog humanog ob, pripremljene u postupku A (125 nmola ob proteina), dodano je 250 mola gore spomenute otopine reagensa PEG₂-NHS.

Ta otopina sadržavala je 10 mg ili 0,1 ml od 100 mg/ml otopine reagensa PEG₂-NHS u 1 mM HCl. Ukupna reakcijska smjesa nadopunjena je do 0,67 ml dodatkom 100 mM boratnog pufera pH 5,0. Konačni molni omjer proteina i reagensa bio je 1:2. Ta smjesa miješana je 4 sata pri 4°C i reakcija je zaustavljena dodatkom 1 µl ledene octene kiseline da se dobije konačni pH od 4,5. Dobivena reakcijska smjesa (0,67 mL) razrijeđena je s vodom na 27 ml otopine koja je prenesena u kolonu koja je sadržavala 1,7 ml karboksi metilirane kationske smole za ionsku izmjenu (Perseptives, Framingham, Massachusetts). Kolona je ekvilibrirana s 3,3 µM pufera HEPES/MES/natrijev acetat, pH 5,0. Razrijeđena reakcijska smjesa stavljena je u kolonu i neapsorbirani reagens PEG₂-NHS ispran je iz kolone. Apsorbirani pegilirani i nemodificirani ob proteini su razrijeđeni s postupnim gradijentom soli (15 volumena kolone svaki) od 80, 150 i 500 mM NaCl. 2 ml tih eluata skupljeni su odvojeno i uzorci svake frakcije bili su podvrgnuti analizi SDS-PAGE. Eluati iz te analize klasificirani su kao visoko pegilirani konjugati, željeno razgranati mono-PEG-ob (PEG₂-ob) i nemodificirani ob protein. Svaka od tih frakcija klasificirana je dalje u gore navedenu skupinu i drugu lokvicu koja je sadržavala željeni razgranati mono-PEG₂-ob protein. Taj željeni protein imao je strukturu spoja formule I-A, pri čemu je zbroj n i n' bio približno 820-1040, s prosjekom koji je bio približno 930, R i R' su CH₃, a prosječna molekulska masa svakog PEG lanca bila je približno 20 kilodaltona. Pegilirani proizvod imao je prosječnu molekulsku masu od pribl. 56 kDa. Lokvica koja je sadržavala PEG₂-ob koncentrirana je na 3,7 mg/ml pomoću membrane YM 10. YM 10 je veličinska membrana koja zadržava molekule koje imaju molekulsku masu od 10.000 daltona ili veću. Nakon postupka razdvajanja po veličini, koncentrirani materijal bio je diafiltriran u pufer PBS (pH 7,3) i odložen zamrznut pri -20°C. Taj odložen proizvod bio je pegilirani ob protein formule I-A gdje je zbroj n i n' bio približno 820 do 1040, a prosječna molekulska masa svakog ob lanca bila je približno 20 kDa. Prosječna molekulska masa PEG proteina u ovoj mješavini konjugata ob proteina bila je 56 kDa.

Primjer 20

Biološko ispitivanje pegiliranog humanog ob proteina: jednostruka IP injekcija ob/ob miševima

Metode

Proučavane su dvije skupine od po šest ženki debelih ob/ob miševa. Miševi su stavljani u plastične kaveze (po tri miša u jednom kavezu) pod konstatnim uvjetima okoline sa ciklusima od 12 sati mraka i 12 sati svjetla. Svaki dan mjerena je tjelesna težina i uzimanje hrane u 24 sata. Nakon perioda prilagodbe na uvjete okoline, dnevnu obradu i injekcije, miševi su razvrstani u dvije skupine za obradu. Svaki miš primio je jednu intraperitonealnu (IP) injekciju prvog dana pokusa (neposredno prije početka ciklusa mrak/svjetlo) od 0,1 ml slijedeće otopine: otopinu soli (0,9%); ob protein iz zalihe otopine pripremljena u odlomku A primjera 19 (30 µg/0,1 ml); pegiliranu kontrolnu otopinu (jednako pripremljen i očišćen uzorak bez humanog ob proteina) ili pegilirani ob protein (30 µg/0,1 ml) pripremljen kako je opisano u primjeru 19. Miševi su dobili samo jednu injekciju prvog dana. Slijedeća tri dana i opet šestog dana mjereno je dnevno uzimanje hrane u svakom kavezu i tjelesna težina svakog miša.

Rezultati

A) Smanjenje uzimanja hrane

Dnevno uzimanje hrane nije se razlikovalo kod jednostruko obrađenih miševa koji su primili otopinu soli i pegiliranu kontrolnu otopinu dva uzastopna dana (tablica 5). Međutim, dnevno uzimanje hrane bilo je smanjeno kod šest miševa kojima je ubrizgano 30 µg humanog ob proteina i pegilirani ob protein trećeg dana obrade (5,2, 8,2 prema 11,9, 11,4 g) u usporedbi s miševima koji su primili otopinu soli i pegiliranu kontrolnu otopinu. Uzimanje hrane kod miševa kojima je ubrizgan humani ob protein vratilo se je na kontrolnu razinu, dok je uzimanje hrane kod miševa kojima je ubrizgan pegilirani humani ob protein ostalo smanjeno narednih dana pokusa. Smanjenje uzimanja hrane bilo je opaženo 48 sati nakon jednostruke injekcije kod skupine kojoj je dat pegilirani humani ob protein. Ukupno uzimanje hrane tijekom 24 sata kroz tri dana pokusa bilo je signifikantno smanjeno na 49% od kontrolne skupine kod skupine koja je dobila pegilirani humani ob protein u usporedbi sa kontrolnom skupinom koja je primila otopinu soli i pegiliranu kontrolnu otopinu.

B) Smanjenje porasta tjelesne težine

Promjena tjelesne težine nije bila različita kod miševa kojima je jednostruko ubrizgana kontrolna otopina soli i pegilirana otopina dva naredna dana (tablica 6). Međutim, tjelesna težina bila je smanjena kod šest miševa kojima je ubrizgano 30 µg humanog ob proteina i pegilirani humani ob protein na dan obrade (-0,9, -0,7 prema 0,1, 0,3 g) u usporedbi s miševima kojima je ubrizgana otopina soli i pegilirana kontrolna otopina. Tjelesna težina miševa kojima je dat humani ob protein vratila se je na kontrolnu razinu, dok je tjelesna težina miševa koji su primili pegilirani ob humani protein nastavila opadati narednih dana pokusa.

Neprestano smanjenje tjelesne težine opaženo je 48 sati nakon jednostruke injekcije kod skupine koja je primila pegilirani humani ob protein. Ukupna promjena tjelesne težine za 6 dana pokusa bila je -1,6 grama u usporedbi s 0,4 grama skupine koja je primila ob protein, 0,7 grama kod skupine koja je primila otopinu soli i 1,1±0,2 grama kod skupine koja je primila pegiliranu kontrolnu otopinu (tablica 6).

Zaključak

Ovaj primjer pokazuje da je jednostruka injekcija pegiliranog humanog ob proteina (30 µg/mišu) rezultirala značajnim, dokazivim smanjenjem uzimanja hrane i značajnim opadanjem tjelesne težine obrađenih ženki ob/ob miševa kroz tri dana u usporedbi s ob/ob miševima koji su primili otopinu soli i pegiliranu kontrolnu otopinu. Ovi rezultati pokazuju da pegilirani humani ob protein ima dokazivu, jaku biološku aktivnost i ima očekivano djelovanje protiv debljine kod genetički debelih ob/ob miševa.

Tablica 5. Dnevno uzimanje hrane kod ob/ob miševa koji su dobili jednu IP injekciju pegiliranog humanog ob proteina.

Obrada	Uzimanje hrane (3 miša/dan)					
	dan 1		dan 2		dan 3	
	g	% kontr.	g	% kontr.	g	% kontr.
otopina soli	11,9	100	13,7	100	13,6	100
ob protein	5,2	43,7	11,7	85,4	12,5	92
pegilirana	11,4	95,8	4,5	106	13,4	99
kontr. otopina						
pegilirani ob protein	8,2	68,9	6,0	43,8	4,9	36

Podaci predstavljaju srednje vrijednosti za skupine po 6 ob/ob miševa. Uzimanje hrane je prosječno dnevno uzimanje hrane po kavezima s tri miša svakog dana pokusa nakon jedne IP injekcije prvog dana. Treba primijetiti stalno smanjenje dnevnog uzimanja hrane samo kod skupine koja je primila pegilirani ob protein.

Tablica 6. Promjena tjelesne težine ob/ob miševa koji su dobili jednu IP injekciju pegiliranog humanog ob proteina.

Obrada	Promjena tjelesne težine (grami)			
	dan 1	dan 2	dan 3	dan 6
otopina soli	0,1	0,6	0,01	-0,01
ob protein	-0,9	1,1	0,2	ND
pegilirana kontr. otopina	0,3	0,4	0,6	-0,2
pegilirani ob protein	-0,7	-0,6	-0,9	0,6

Podaci predstavljaju srednje vrijednosti za skupine po 6 ob/ob miševa. Miševi su primili samo 1 injekciju prvog dana. Promjena tjelesne težine je promjena tjelesne težine svakog dana pokusa. Treba primijetiti stalno smanjenje tjelesne težine samo kod skupine koja je primila pegilirani ob protein. ND u tablici znači da nije određeno (e. not determined).

Prilog

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

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

(ii) TITLE OF INVENTION: Recombinant Obese (ob) Proteins

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 8

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 702 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

CAAGGTGCAA GAAGAAGAAG ATCCCAGGGA GGAAATGTG CTGGAGACCC CTGTGTGGGT	60
TCCTGTGGCT TTGGTCCTAT CTGTCTTATG TTCAAGCAGT GCCTATCCAG AAAGTCCAGG	120
ATGACACCAA AACCCATCATC AAGACCATTG TCACCAGGAT CAATGACATT TCACACACGC	180
AGTCGGTATC CGCCAAGCAG AGGGTCACTG GCTTGGACTT CATTCCTGGG CTTACCCCCA	240
TTCTGAGTTT GTCCAAGATG GACCAGACTC TGGCAGTCTA TCAACAGGTC CTCACCAGCC	300
TGCCTTCCCA AAATGTGCTG CAGATAGCCA ATGACCTGGA GAATCTCCGA GACCTCCTCC	360
ATCTGCTGGC CTTCTCCAAG AGCTGCTCCC TGCCTCAGAC CAGTGGCCTG CAGAAGCCAG	420


```

AGAGCCTGGA TGGCGTCTCTG GAAGCCTCAC TCTACTCCAC AGAGGTGGTG GCTTTGAGCA      480
GGCTGCAGGG CTCTCTGCAG GACATTCTTC AACAGTTGGA TGTTAGCCCT GAATGCTGAA      540
GTTTCAAAGG CCACCAGGCT CCCAAGAATC ATGTAGAGGG AAGAAACCTT GCCTTCCAGG      600
GGTCTTCAGG AGAAGAGAGC CATGTGCACA CATCCATCAT TCATTTCTCT CCTTCTGTA      660
GACCACCCAT CCAAAGGCAT GACTCCACAA TGCTTGACTC AA                          702

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 167 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: not relevant
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 146 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: not relevant
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Cys
145

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 690 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 167 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: not relevant
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

```

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

```

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

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

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

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

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

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
165

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 146 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: not relevant
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Cys
145

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 63 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: double
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTAGCCGAG 60
GCC 63

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 21 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS: not relevant
 - (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

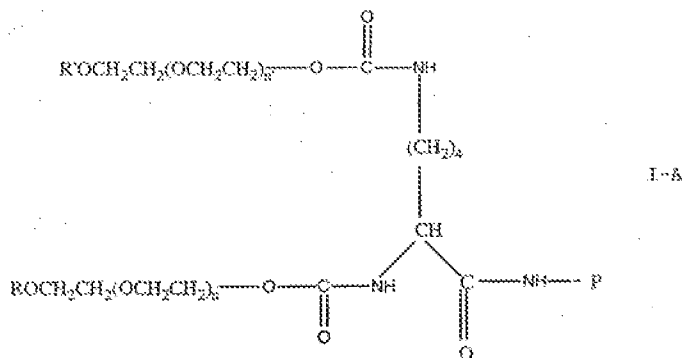
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

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

PATENTNI ZAHTEJEVI

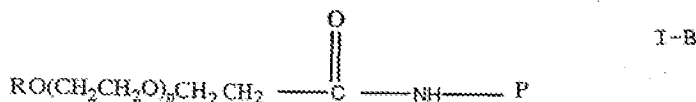
- 5 1. Homogeni biološki aktivan humani obese protein ili njegov fragment, **naznačen time**, da fragment ima biološku aktivnost rečenog proteina.
2. Protein ili fragment prema zahtjevu 1, **naznačen time**, da biološku aktivnost rečenog proteina ili fragmenta karakterizira smanjenje uzimanja hrane kod sisavaca i smanjenje stupnja porasta težine kod sisavaca.
3. Protein prema zahtjevu 1, **naznačen time**, da uključuje SEQ ID NO:6.
- 10 4. Rekombinantni biološki aktivan humani obese protein oslobođen od drugih proteina sisavaca ili njegov fragment, **naznačen time**, da fragment ima biološku aktivnost rečenog proteina.
5. Protein ili fragment prema zahtjevu 4, **naznačen time**, da biološku aktivnost rečenog proteina karakterizira smanjenje uzimanja hrane kod sisavaca i smanjenje stupnja porasta težine kod sisavaca.
6. Protein prema zahtjevu 4, **naznačen time**, da uključuje SEQ ID NO: 6.
- 15 7. Homogeni biološki aktivan obese protein murine ili njegov fragment, **naznačen time**, da fragment ima biološku aktivnost rečenog proteina.
8. Protein ili fragment prema zahtjevu 7, **naznačen time**, da biološku aktivnost rečenog proteina ili fragmenta karakterizira smanjenje uzimanja hrane kod sisavaca i smanjenje stupnja porasta težine kod sisavaca.
9. Protein prema zahtjevu 7, **naznačen time**, da uključuje SEQ ID NO: 3.
- 20 10. Rekombinantni biološki aktivan obese protein murine oslobođen od drugih proteina ili njegov fragment, **naznačen time**, da fragment ima biološku aktivnost rečenog proteina.
11. Protein prema zahtjevu 10, **naznačen time**, da biološku aktivnost rečenog proteina karakterizira smanjenje uzimanja hrane kod sisavaca i smanjenje stupnja porasta težine kod sisavaca.
12. Protein prema zahtjevu 10, **naznačen time**, da uključuje SEQ ID NO: 3.
- 25 13. Vektor ekspresije, **naznačen time**, da uključuje:
 - a) promotorsku sekvencu, i
 - b) DNA sekvencu, koja kodira fuzijski protein, koji fuzijski protein uključuje ob protein murine sekvence SEQ ID NO: 3 ili humani ob protein sekvence SEQ ID NO: 6, i signalni peptid za protein A vanjske membrane bakterije E. coli, koji vektor ekspresije može umnožiti fuzijski protein u stanicama domaćina E. coli.
- 30 14. Vektor ekspresije prema zahtjevu 13, **naznačen time**, da promotorska sekvenca sadrži oba, lac-promotor operator i lipoproteinski promotor.
15. Fuzijski protein, **naznačen time**, da uključuje humani ili obese protein murine, i signalni peptid za vanjski protein A membrane bakterije Escherichia coli.
16. Fuzijski protein prema zahtjevu 15, **naznačen time**, da obese protein murine uključuje SEQ ID NO: 3 i da humani obese protein uključuje SEQ ID NO: 6.
- 35 17. DNA sekvenca koja uključuje prvi i drugi dio, **naznačen time**, da
 - (a) prvi dio je sOmpA genska sekvenca sekvence SEQ ID NO: 7 koja kodira sOmpA peptid; i
 - (b) drugi dio je nukleotidna sekvenca koja kodira ob protein murine ili nukleotidna sekvenca koja kodira humani ob protein.
- 40 18. DNA sekvenca prema zahtjevu 17, **naznačena time**, da ob protein murine uključuje SEQ ID NO: 3.
19. DNA sekvenca prema zahtjevu 17, **naznačena time**, da humani ob protein uključuje SEQ ID NO: 6.
20. Organizam domaćin Escherichia coli, **naznačena time**, da je transformiran s vektorom ekspresije prema zahtjevu 13.
21. Metoda proizvodnje biološki aktivnog rekombinantnog humanog ili ob proteina murine oslobođenog od drugih proteina sisavaca, **naznačena time**, da uključuje stupnjeve:
 - a) konstrukciju vektora ekspresije koji ima promotorsku sekvencu, i DNA sekvencu koja kodira fuzijski protein, koji fuzijski protein uključuje SEQ ID NO: 3 ili SEQ ID NO: 6, i signalni peptid za vanjski protein A membrane bakterije E. coli;
 - b) umetanje vektora ekspresije u stanicu domaćina E. coli zbog transformacije stanice domaćina E. coli;
 - 50 c) ekspresiju fuzijskog proteina u stanici domaćina E. coli; i
 - d) obradu stanice domaćina E. coli s puferom za hladni osmotski šok zbog oslobađanja humanog ili ob proteina murine od ostalih proteina sisavaca i signalnog peptida.
22. Sekvenca humanog ob gena, **naznačena time**, da uključuje SEQ ID NO. 4.
23. Metoda proizvodnje homogenog biološki aktivnog rekombinantnog humanog ili ob proteina murine, **naznačena time**, da uključuje podvrgavanje osmotske tekućine, koja sadrži humani ili ob protein murine, kombinaciji kromatografije u koloni za anionsku izmjenu, kromatografiji u koloni za hidrofobnu interakciju i gel filtraciji.
- 55 24. Sastav, **naznačen time**, da uključuje jedan ili više konjugata polietilen-glikola i/ili polipropilen-glikola, povezanih na humani ili ob protein murine prema zahtjevima 1 do 12, prosječne molekulske mase polietilen-glikolnih ili polipropilen-glikolnih jedinica, u rečenom konjugatu unutar rečenog sastava, su između 15 kDa i 60 kDa.

25. Sastav koji uključuje jedan ili više konjugata formule:



naznačen time, da P je humani ili ob protein murine prema zahtjevima 1 do 12, n i n' su cijeli brojevi čiji zbroj je od 300 do 1500, prosječna molekulska masa polietilen-glikolnih jedinica u rečenom konjugatu unutar rečenog sastava je od 15 kDa do 60 kDa, a R i R' su niži alkil.

26. Sastav prema zahtjevu 25, **naznačen time**, da je zbroj n i n' od približno 800 do 1200 i da je prosječna molekulska masa polietilen-glikolnih jedinica u rečenom konjugatu, unutar rečenog sastava, od 35 do 45 kDa.
27. Sastav koji uključuje jedan ili više konjugata formule:



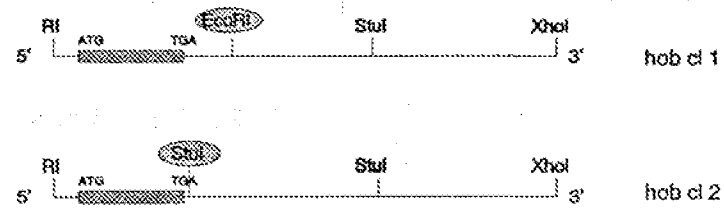
naznačen time, da P je humani ili ob protein murine prema zahtjevima 1 do 12, n je cijeli broj čiji zbroj je od 300 do 1500, prosječna molekulska masa polietilen-glikolnih jedinica u rečenim konjugatima, unutar rečenog sastava, je od 15 kDa do 60 kDa, i R je niži alkil.

28. Sastav prema zahtjevu 27, **naznačen time**, da n je od približno 850 do 1000, a prosječna molekulska masa polietilen-glikolnih jedinica u rečenim konjugatima, unutar rečenog sastava, je od 35 do 45 kDa.
29. Humani ili ob protein murine prema zahtjevima 1 do 12 ili sastav prema zahtjevima 24 do 28, **naznačeni time**, da su terapijski aktivna sredstva.
30. Humani ili ob protein murine prema zahtjevima 1 do 12 ili sastav prema zahtjevima 24 do 28, **naznačeni time**, da su terapijski aktivna sredstva za liječenje, prevenciju ili suzbijanje debljine i s njom povezanih bolesti.
31. Farmaceutski sastav, **naznačeni time**, da sadrži humani ili ob protein murine prema zahtjevima 1 do 12 ili sastav prema zahtjevima 24 do 28 i kompatibilan, farmaceutski prihvatljiv noseći materijal.
32. Upotreba humanog ili ob protein murine prema zahtjevima 1 do 12 ili sastava prema zahtjevima 24 do 28, **naznačena time**, da se koristi za pripremu farmaceutskih sastava.
33. Upotreba humanog ili ob proteina murine prema zahtjevima 1 do 12 ili sastava prema zahtjevima 24 do 28, **naznačena time**, da se koristi za pripremu farmaceutskih sastava za liječenje, prevenciju ili suzbijanje debljine i s njom povezanih bolesti.
34. Upotreba humanog ili ob proteina murine prema zahtjevima 1 do 12, **naznačena time**, da se koristi za identifikaciju receptora ob proteina.
35. Upotreba vektora ekspresije prema zahtjevima 13 i 14, **naznačena time**, da se koristi za proizvodnju humanog ili ob proteina murine prema zahtjevima 1 do 12.
36. Upotreba DNA sekvence prema zahtjevima 17 do 19, **naznačena time**, da se koristi za proizvodnju humanog ili ob proteina murine prema zahtjevima 1 do 12.
37. Upotreba organizma domaćina Escherichia coli, **naznačena time**, da se koristi za proizvodnju humanog ili ob proteina murine prema zahtjevima 1 do 12.
38. Homogeni biološki aktivan rekombinantni humani ili ob protein murine, **naznačen time**, da se priprema postupcima prema zahtjevima 21 ili 23.
39. Metoda za liječenje, prevenciju ili suzbijanje debljine i s njom povezanih bolesti, **naznačen time**, da uključuje davanje humanog ili ob proteina murine prema zahtjevima 1 do 12 ili sastava prema zahtjevima 24-28.
40. Postupci, farmaceutski sastavi, procesi i metode, **naznačeni time**, da su uglavnom kao gore opisani.

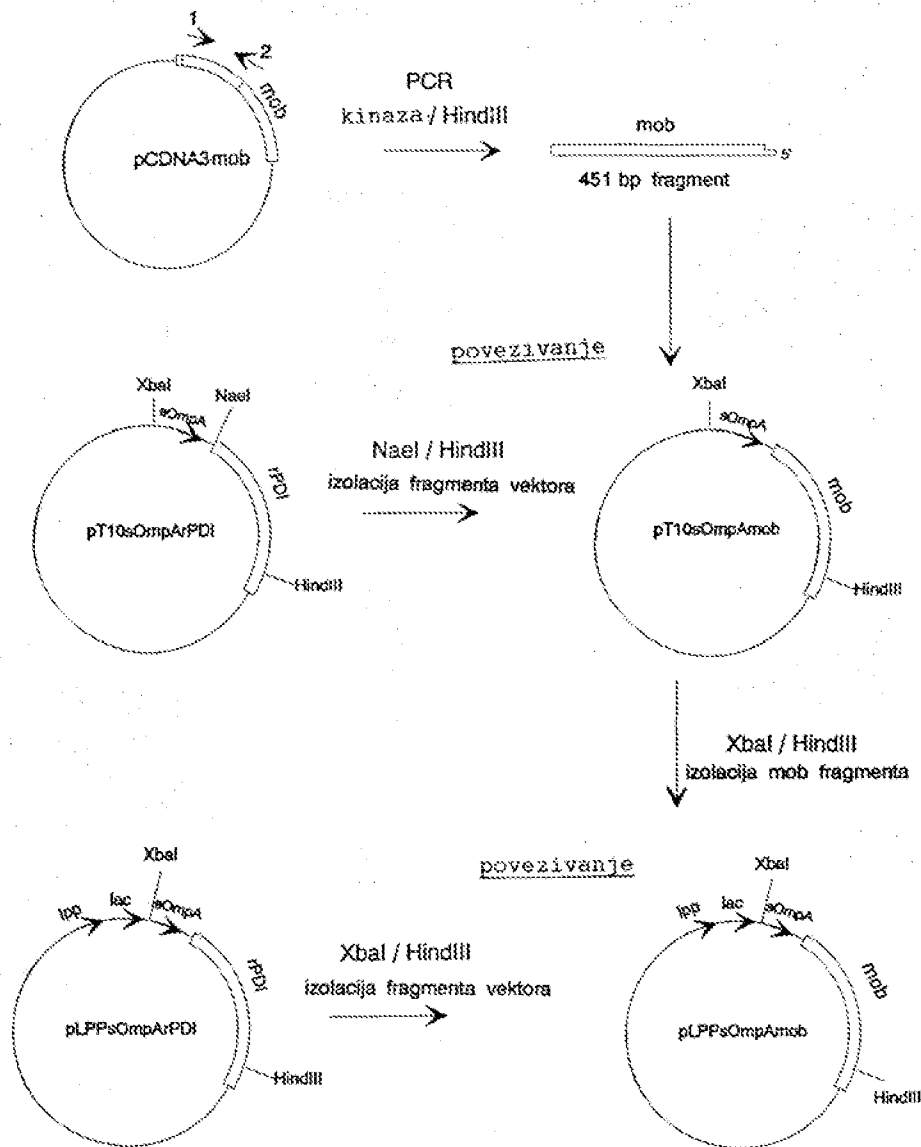
SAŽETAK

Proteini koji moduliraju tjelesnu težinu životinja i ljudi za liječenje, prevenciju i suzbijanje debljine i popratnih bolesti ili stanja, i rekombinantna ekspresija tih biološki aktivnih proteina u očišćenim i homogenim oblicima.

Slika 1



slika 2



slika 3

