



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0715345-7 A2



(22) Data de Depósito: 01/08/2007
(43) Data da Publicação: 18/06/2013
(RPI 2215)

(51) *Int.Cl.*:
A61K 39/00

(54) **Título:** VACINAS E MÉTODOS PARA CONTROLE DA ADIPOSIDADE

(30) **Prioridade Unionista:** 01/08/2006 US 60/821.071

(73) **Titular(es):** The Scripps Research Institute

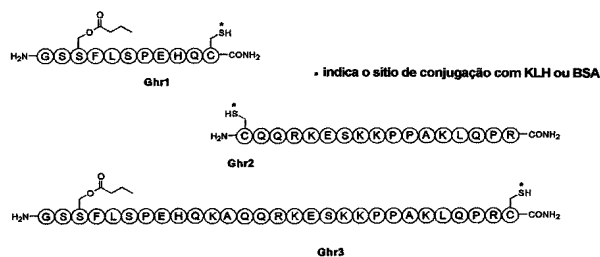
(72) **Inventor(es):** Eric P.Zorrilla, Kim D.Janda, Michael M. Meijler

(74) **Procurador(es):** NELLIE ANNE DAIEL-SHORES

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007074976 de 01/08/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/016976de 07/02/2008

(57) **Resumo:** VACINAS E MÉTODOS PARA CONTROLE DA ADIPOSIDADE. A invenção se refere aos imunoconjugados para impedir o ganho de peso e ao tratamento da obesidade em um indivíduo. Os imunoconjugados compreendem polipeptídeos de ghrelina específicos e uma fração veículo apropriada.



“VACINAS E MÉTODOS PARA CONTROLE DA ADIPOSIDADE”

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS CORRELATOS

Esse pedido reivindica prioridade com relação ao Pedido Provisório dos Estados Unidos número 60/821.071, depositado em 1º de agosto de 2006, que é incorporado como
5 referência em sua totalidade.

INTRODUÇÃO

A obesidade ameaça as vidas de milhões de pessoas mundialmente, através da comorbidez, por exemplo, doenças cardíacas, cânceres, diabetes do tipo 2, acidente vascular, artrite e depressão maior. Cerca de 1 bilhão de pessoas mundialmente estão acima do peso
10 ou obesas (índice de massa corpórea = $25-30$ ou >30 kg/m^2 , respectivamente) com taxas prevalentes desproporcionalmente altas em países ricos. Por exemplo, nos Estados Unidos da América, o National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) verificou que, em 2003-2004, aproximadamente 66% de todos os adultos americanos com 20 anos de idade ou mais velhos estavam acima do peso ou obesos. Quase 4 de cada 5 adultos ho-
15 mens com idades entre 40-59 anos também foram classificados dessa forma. Mesmo em crianças e adolescentes entre as idades de 6-11 e 12-19, 19% e 17%, respectivamente, estavam acima do peso. De modo alarmante, a prevalência da obesidade triplicou em adolescentes nas últimas duas décadas. O aumento no número de pessoas que estão acima do peso ou obesas se encontra em todas as idades, grupos raciais e étnicos e de ambos os
20 sexos e vem crescendo mundialmente. Por exemplo, a prevalência da obesidade em alunos pré-escolares urbanos na China teve um salto mais de 8 vezes entre 1989-1997, e a taxa de obesidade em adultos Britânicos subiu quase 3 vezes de 1980-2002. Em 2000, mais de 110.000 óbitos nos Estados Unidos estavam associados à obesidade, conforme mostrado pela análise ajustada de 3 coortes NHANES e o custo econômico da obesidade nos Estados
25 Unidos da América foi estimado como sendo de \$117 bilhões.

Até o momento, os tratamentos não cirúrgicos disponíveis para obesidade, incluindo medicamentos são paliativos e eficazes apenas enquanto o tratamento é mantido. Quando os tratamentos são descontinuados, o ganho de peso é inevitável. Para que os tratamentos contra obesidade funcionem, eles devem afetar a ingestão de energia, absorção, gasto
30 ou armazenamento. Embora muitos medicamentos tenham sido comercializados ou estejam atualmente sob investigação para o tratamento da obesidade, vários efeitos colaterais adversos se encontram atualmente sob investigação para o tratamento da obesidade, vários possuem efeitos colaterais adversos, incluindo insônia, astenia, incontinência fecal, hipertensão, taquicardia, anormalidades das válvulas do coração e mesmo a morte. Conseqüen-
35 temente, vários medicamentos para perda de peso foram banidos pela Food and Drug Administration, incluindo o primeiro aprovado para essa indicação, a desoxiefedrina (1946) e mais recentemente *d*-fenfluramina/fenfluramina (setembro de 1997) e alcalóides de efedrina

(abril de 2004).

Felizmente, a pesquisa nos últimos quinze anos revolucionou o entendimento dos mecanismos moleculares que controlam homeostaticamente o peso corpóreo e a gordura. Verificações já realizadas sustentam uma hipótese lipostática da homeostasia da energia, na qual o cérebro busca manter a energia armazenada constante, como tecido adiposo, por períodos de tempo maiores. Conseqüentemente, um sistema de retorno da homeostasia de energia neuro-humoral redundante, altamente integrado, através dos mecanismos comportamentais e metabólicos, serve para minimizar o impacto de flutuações de curto prazo no equilíbrio da energia e especialmente o equilíbrio de energia negativo na massa de gordura. A identificação dos genes cuja perda de mutações funcionais resulta em síndromes de obesidade monogênicas ou conferem resistência à obesidade em seres humanos ou roedores obteve pontos de entrada genéticos importantes para caracterização das vias interconectadas que regulam a homeostasia da energia. A identificação desses receptores de ligantes conduziu aos esforços de pesquisa para alvejar sinais em ambas as extremidades do espectro de energia, contudo, nenhuma vacina viável ou modalidade de tratamento se encontra disponível ainda.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

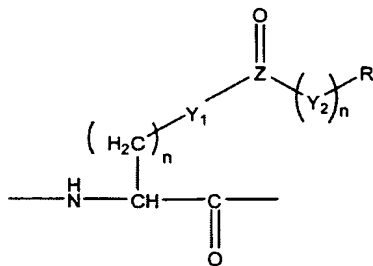
Os inventores descobriram que a modulação da biodisponibilidade do hormônio endócrino gástrico ghrelina através da imunização ativa com imunocombinados de polipeptídeo derivados de ghrelina obtém um meio para regular o equilíbrio de energia e ganho de peso lento enquanto sparing a massa magra.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção obtém um imunocombinado que compreende um polipeptídeo de ghrelina e uma fração veículo, onde o polipeptídeo de ghrelina é ligado à fração veículo por uma fração ligante. O imunocombinado de polipeptídeo de ghrelina compreende a seqüência que se segue:

Gly-Ser-A-Phe-Leu-B-C

onde A e B são definidos como se segue:

A é uma fração possuindo a seguinte estrutura:



onde: Y_1 e Y_2 são selecionados independentemente de O, CH_2 e NH; n é 0 ou 1; Z é C, PO ou SO; e R é um grupo hidrocarboneto saturado ou insaturado, ramificado ou linear, substituído ou não substituído tendo cerca de 3 a cerca de 10 átomos de carbono, ou é um

grupo cicloalquila ou arila tendo cerca de 3 a cerca de 13 átomos de carbono; e

B compreende uma subsequência de 0 a 23 resíduos de aminoácido consecutivos da SEQ ID NO: 2; e C compreende a fração veículo.

Em outro aspecto, a invenção obtém uma composição compreendendo uma quantidade imunogenicamente eficaz do imunoconjugado descrito acima e um veículo fisiologicamente aceitável.

Ainda em outro aspecto, a invenção obtém um método de indução de uma resposta imune antighrelina em um indivíduo compreendendo administração ao indivíduo de uma composição compreendendo uma quantidade imunologicamente eficaz do imunoconjugado descrito acima e um veículo fisiologicamente aceitável.

Em um aspecto adicional, a invenção obtém um método de controle de adiposidade em um indivíduo. O método engloba administração ao indivíduo da composição descrita acima.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 ilustra imunoconjugados de ghrelina-hapteno Ghr1 , Ghr2 e Ghr3 empregados para gerar respostas imunes específicas para ghrelina, conforme descrito nos exemplos.

A figura 2 representa graficamente os efeitos da vacinação com imunoconjugados de ghrelina-hapteno na homeostasia de energia corpórea integral, como uma função do ganho de peso corpóreo diário (painel A), ingestão diária de alimentos (painel B) e eficiência do alimento (painel C).

A figura 3 representa graficamente a relação da capacidade de ligação plasmática antighrelina para homeostasia de energia corpórea integral, adiposidade e taxas de ghrelina no cérebro/plasma, conforme demonstrado por comparações de indivíduos com titulações plasmáticas alta e baixa (painel A) em termos de afinidade de plasma (painel B), ganho de peso diário (painel C), ingestão diária de alimentos (painel D), eficiência da alimentação (painel E), massa seca isenta de gordura relativa (painel F), níveis de leptina no plasma (painel G) e taxa de ghrelina total no cérebro/plasma (painel G).

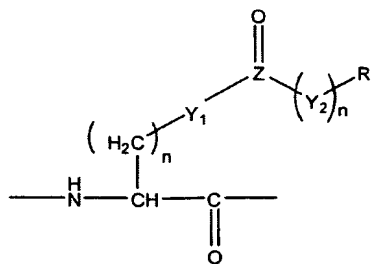
DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES ILUSTRATIVAS

A presente invenção obtém imunoconjugados de polipeptídeo de ghrelina, onde a porção de polipeptídeo de ghrelina do imunoconjugado inclui um resíduo de serina modificado na terceira posição do aminoácido, conforme descrito aqui. Os imunoconjugados são representados apropriadamente pela seqüência que se segue:

Gly-Ser-A-Phe-Leu-B-C

onde A e B são definidos como se segue:

A é uma fração possuindo a estrutura que se segue:



onde: Y_1 e Y_2 são selecionados independentemente de O, CH_2 e NH; n é 0 ou 1; Z é C, PO ou SO; e R é um grupo hidrocarboneto saturado ou insaturado, ramificado ou linear, substituído ou não substituído tendo cerca de 3 a cerca de 10 átomos de carbono, ou é um grupo cicloalquila ou arila tendo cerca de 3 a cerca de 13 átomos de carbono;

5 B compreende uma subseqüência de 0 a 23 resíduos de aminoácido consecutivos da SEQ ID NO: 2; e

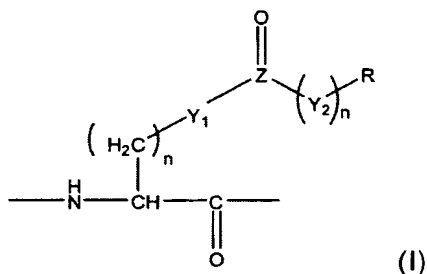
C compreende uma fração veículo.

Os imunoconjugados são apropriadamente incluídos em uma composição de vaci-
na com um veículo fisiologicamente aceitável. A invenção também obtém métodos de indu-
10 ção de uma resposta imune antighrelina em um indivíduo e controle da adiposidade em um indivíduo.

Polipeptídeos de ghrelina

Conforme empregado nesse documento e na técnica, o termo "polipeptídeo" se re-
fere a duas ou mais frações de aminoácido unidas por ligações amida e inclui ambos peptí-
15 deos e proteínas. Os polipeptídeos de ghrelina da invenção podem ser purificados ou sinté-
ticos. "Purificados" se refere ao material que é pelo menos parcialmente separado dos com-
ponentes que normalmente acompanham o mesmo em seu estado nativo. Como é aprecia-
do pelos versados na técnica, a pureza dos polipeptídeos é determinada tipicamente em-
pregando técnicas analíticas, tais como, eletroforese de gel poliácridimida ou cromatografia
20 de líquido de alto desempenho. Conforme usado aqui, "sintético" se refere a ambas as téc-
nicas de produção recombinante e preparado através de fase sólida, como é conhecido na
arte.

Os polipeptídeos de ghrelina da invenção possuem, no mínimo, uma seqüência de
aminoácidos compreendendo Gly Ser Xaa Phe Leu (SEQ ID NO:1), onde A indica um resí-
25 duo de serina modificado possuindo a estrutura da fórmula (I):



Com referência à fórmula (I), Y_1 e Y_2 são selecionados independentemente de O, CH_2 e NH; e n é 0 ou 1. Também na fórmula (I), Z é apropriadamente selecionado de C, PO ou SO R é um grupo hidrocarboneto saturado ou insaturado, ramificado ou linear, substituído ou não substituído tendo cerca de 3 a cerca de 10 átomos de carbono, ou é um grupo cicloalquila ou arila tendo cerca de 3 a cerca de 13 átomos de carbono. Conforme empregado nesse documento, "grupo hidrocarboneto" se refere a um grupo hidrocarboneto alifático possuindo um número específico de átomos de carbono na cadeia. O grupo hidrocarboneto pode compreender, por exemplo, um grupo alquila, alquenila ou alquinila. Em uma modalidade especificamente apropriada Y_1 é O, Z é C, n é 0 e R é $-CH_2CH_2CH_3$. Nas listagens de seqüência detalhadas a seguir A é identificado como Xaa.

O polipeptídeo de ghrelina pode compreender adicionalmente B, onde B é uma subsequência de término carbóxi do polipeptídeo de ghrelina de comprimento pleno. A subsequência inclui qualquer uma das SEQ ID NO:2 ou seqüência plena da SEQ ID NO: 2. Em outras palavras, o polipeptídeo de ghrelina compreende a SEQ ID NO: 1 e uma seqüência ou subsequência da SEQ ID NO: 2. Por exemplo, a seqüência de polipeptídeo de ghrelina plena pode compreender qualquer uma das seqüências que se seguem:

- Gly Ser Xaa Phe Leu (SEQ ID NO:1);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser (SEQ ID NO:3);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro (SEQ ID NO:4);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu (SEQ ID NO:5);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His (SEQ ID NO:6);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln (SEQ ID NO:7);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg (SEQ ID NO:8);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val (SEQ ID NO:9);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln (SEQ ID NO:10);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln (SEQ ID NO:11);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg (SEQ ID NO:12);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys (SEQ ID NO:13);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu (SEQ ID NO:14);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser (SEQ ID NO:15);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys (SEQ ID NO: 16);
- Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser

Lys Lys (SEQ ID NO: 17);

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro (SEQ ID NO:18);

5 Lys Lys Pro Pro (SEQ ID NO: 19);

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala (SEQ ID NO:20);

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala Lys (SEQ ID NO:21);

10 Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu (SEQ ID NO:22);

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln (SEQ ID NO:23);

15 Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro (SEQ ID NO:24); ou

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys/Arg Ala/Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg (SEQ ID NO:25),

onde Xaa é A, a seria modificada conforme definida acima. É também especifica-
mente contemplado que qualquer um dos aminoácidos listados acima pode ser substituído
20 por um aminoácido sintético apropriado, por exemplo, conforme descrito em Chemistry and
Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, ed. B. Weinstein (1983), incor-
porado nesse documento como referência.

É também contemplado que a seqüência de peptídeo de ghrelina corresponderá á
seqüência de ghrelina específica para as espécies a serem imunizadas e possuindo a serina
25 modificada na posição 3, conforme descrito nesse documento. Isso é contemplado, uma
vez que as seqüências entre as espécies seja conservada e possua apenas ligeiras varia-
ções, a reatividade cruzada entre os peptídeos e espécies é contemplada.

Frações veículo

Os imunoconjugados da invenção compreendem os polipeptídeos de ghrelina des-
critos acima covalente ou não covalentemente conjugados a C, uma fração veículo, usando
30 os métodos padrão conhecidos na arte. Uma "fração veículo," conforme empregado nesse
documento se refere a um parceiro de conjugação capaz de melhorar a imunogenicidade de
um polipeptídeo. Por exemplo, podem ser usados polipeptídeos, tais como, dextrano, mano-
se ou manano. As proteínas de membrana integral, por exemplo, de *E.coli* e outras bactérias
35 são também parceiros de conjugação úteis. As moléculas veículo tradicionais, tais como,
"keyhole limpet" hemocianina (KLH), toxóide de tétano, toxóide de difteria e albumina de
soro bovino (BSA) são também apropriados.

Frações de ligação

Como é conhecido na técnica, existe uma ampla variedade de métodos disponíveis para ligação dos polipeptídeos às frações conhecidas, qualquer um dos quais sendo apropriadamente adaptado para uso com a invenção. A maioria das estratégias envolve a conjugação do polipeptídeo a uma molécula derivatizada na fração veículo através da formação de uma ligação covalente entre os grupos reativos no polipeptídeo e veículo. Apropriadamente, um ou mais aminoácidos possuindo um grupo reativo incorporado à seqüência de polipeptídeo de ghrelina é usado para ligar o polipeptídeo à fração veículo. Frações de ligação apropriadas são aquelas possuindo grupos amino, grupos carboxila ou grupos sulfidrila. Conforme será apreciado, os grupos funcionais de aminoácidos na seqüência do polipeptídeo de ghrelina podem ser usados como uma fração de ligação para acoplar o polipeptídeo ao veículo. Tais aminoácidos podem incluir lisina, arginina, cisteína, aspartato, glutamato, tirosina e/ou histidina. O acoplamento de dissulfeto usando resíduos de cisteína fora do domínio de ligação do anticorpo do polipeptídeo de ghrelina é uma estratégia de acoplamento especificamente apropriada, onde a cisteína é introduzida apropriadamente usando tecnologia recombinante padrão. Em uma concretização, um resíduo de cisteína é posicionado no término do polipeptídeo de ghrelina, por exemplo, no término carbóxi ou amino.

Dispositivos apropriados adicionais de ligação das frações de polipeptídeo aos veículos são conhecidos na arte e podem ser usados com a presente invenção.

Composições imunogênicas

Os imunoconjugados de ghrelina, conforme descrito acima, são apropriadamente incluídos em uma quantidade imunogenicamente eficaz em uma composição com um veículo fisiologicamente aceitável. Uma "quantidade imunogenicamente eficaz," conforme empregado nesse documento e na técnica, é uma quantidade de um imunoconjugado que é capaz de induzir uma resposta imune que engaja significativamente agentes que compartilham aspectos imunológicos com o imunógeno, isto é, ghrelina endógena, nativa. Um veículo "fisiologicamente aceitável" é qualquer veículo que seja apropriado para administração *in vivo* (por exemplo, administração transdérmica ou parenteral) ou uso *in vitro*, isto é, cultura d célula.

Apropriadamente, as composições compreendendo imunoconjugados de ghrelina da invenção podem ser formuladas para uso *in vivo*, isto é, administração terapêutica ou profilática a um indivíduo. Nas modalidades específicas, as composições são formuladas como composições de vacina. Conforme usado aqui, uma "vacina" é uma composição que é capaz de induzir uma resposta imune em um indivíduo, incluindo porém não limitado à produção de anticorpos sequestrantes.

A preparação das vacinas que contêm seqüências de polipeptídeo como ingrediente ativo é geralmente bem entendida na técnica, conforme exemplificado pelas Patentes US

números 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792 e 4.578.770, todas incorporadas nesse documento como referência. Tipicamente, tais vacinas são preparadas como injetáveis, tanto como soluções líquidas ou suspensões; formas sólidas apropriadas para formulação em solução ou suspensão antes da injeção podem também ser preparadas. A
5 preparação pode também ser emulsionada. O imunoconjugado de ghrelina pode ser misturado com excipientes que são farmacêuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Excipientes apropriados são, por exemplo, água, salmoura, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e combinações dos mesmos. Além disso, caso desejado, a vacina pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como, agentes umectantes ou
10 emulsionantes, agentes de tamponamento de pH ou adjuvantes que melhoram a eficácia das vacinas, conforme descrito abaixo.

As vacinas são administradas convencionalmente de forma parenteral, por injeção, por exemplo, subcutânea, intracutânea, intradérmica, subdérmica ou intramuscular. Formulações adicionais que são apropriadas para outros modos de administração incluem suposi-
15 tórios e, em alguns casos, formulações orais, bucais, sublinguais, intraperitoneal, intravaginal, anal, epidural, espinal e intracraniana. Para os supositórios, ligantes tradicionais e veículos podem incluir, por exemplo, polialcaleno glicóis ou triglicerídeos; tais supositórios podem ser formados de misturas contendo o ingrediente ativo na faixa de 0,5% a 10%, preferivelmente 1 a 2%. As formulações orais incluem ambos excipientes empregados normalmente, tais como, por exemplo, classificações farmacêuticas de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, celulose, carbonato de magnésio e semelhantes. Essas
20 composições tomam a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de liberação prolongada ou pós e contêm 10 a 95% do ingrediente ativo, preferivelmente 27 a 70%.

Conforme apreciado, as vacinas são administradas de modo compatível com a formulação de dosagem e em tal quantidade de modo a serem profilática ou terapeuticamente eficazes e imunogênicas. A quantidade a ser administrada depende do indivíduo a ser tratado incluindo, por exemplo, a capacidade do sistema imune do indivíduo de fornecer resposta imune e o grau de proteção desejada. As faixas de dosagem apropriadas são de cerca de
30 0,1 µg/kg de peso corpóreo a cerca de 10 mg/kg peso corpóreo, tal como na faixa de cerca de 500 µg/kg de peso corpóreo a cerca de 1.000 µg/kg de peso corpóreo. Regimes apropriados para administração inicial e doses de reforço são também contemplados e são tipificados por uma administração inicial seguida por inoculações subseqüentes ou outras administrações.

35 Algumas modalidades da vacina de imunoconjugado de ghrelina da invenção são suficientemente imunogênicas, porém para outras, a resposta imune será melhorada se a vacina compreender, adicionalmente, uma substância adjuvante. Os adjuvantes e seu uso

são bem conhecidos na arte. O termo "adjuvante" se refere nesse documento a uma substância que é 1) não propriamente capaz de promover uma resposta imune contra o imunoconjugado da vacina, porém que seja 2) não obstante capaz de melhorar a resposta imune contra o imunoconjugado. Vários métodos para obtenção de um efeito adjuvante são conhecidos. Os princípios gerais e métodos são detalhados em "The Teoria and Practical Application of Adjuvantes", 1995, Duncan E. S. Stewart-Tull (ed.), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6, e também em "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvantes", 1995, Gregoriadis G e outros (eds.), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9, ambos sendo incorporados como referência nesse documento. Um adjuvante especificamente apropriado para uso com a invenção é o hidróxido ou fosfato de alumínio (alume), geralmente usado como solução a 0,05 a 0,1% em salmoura tamponada.

Métodos para induzir resposta imune antighrelina

Algumas modalidades da invenção obtêm um método de indução de uma resposta imune antighrelina em um indivíduo. Um "indivíduo" é um vertebrado, apropriadamente um mamífero, mais apropriadamente um ser humano. Indivíduos apropriados podem também incluir animais domésticos, por exemplo, gatos, cachorros e cavalos. Conforme será apreciado, para fins de estudo, o indivíduo é apropriadamente um modelo animal, por exemplo, um camundongo ou rato. Será apreciado que para outras espécies, por exemplo, cães, gatos, cavalos ou camundongos, a porção de polipeptídeo de ghrelina do imunoconjugado pode ser selecionada com base nas espécies. Conforme usado aqui, uma "resposta imune antighrelina" se refere especificamente à indução de um efeito terapêutico ou de seqüestro de ghrelina profilático, que é mediado pelo sistema imune do indivíduo. Tal resposta imune promove, apropriadamente, a limpeza ou controle imune da ghrelina endógena no indivíduo, tal que, efeitos amplos no sistema são observados no indivíduo, por exemplo, prevenção ou lentidão de ganho de peso, sparing de massa magra corpórea, eficiência de alimentação diminuída e adiposidade relativa diminuída.

Uma resposta imune antighrelina é apropriadamente avaliada pelos ensaios descritos nos exemplos a seguir. A indução de uma resposta imune antighrelina em um indivíduo, de acordo com a invenção pode ser acompanhada por administração ao indivíduo das composições de imunoconjugado de ghrelina descritas acima.

Métodos de controle da adiposidade

Algumas modalidades da invenção fornecem um método de controle de adiposidade em um indivíduo. "Controle de adiposidade," conforme empregado nesse documento, inclui, porém não está limitado à prevenção ou lentidão de ganho de peso, sparing de massa magra corpórea, diminuição de eficiência da alimentação e diminuição de adiposidade relativa no indivíduo. Os métodos de controle de adiposidade podem ser realizados por administração ao indivíduo das composições de imunoconjugado de ghrelina descrita acima. Mais

apropriadamente, a invenção previne o desenvolvimento da obesidade no indivíduo.

A administração a um indivíduo das composições de imunoconjugado de ghrelina de acordo com a invenção parece exibir efeitos benéficos em uma maneira dependente da dose. Assim, dentro de limites amplos, espera-se que a administração de quantidades grandes das composições de imunoconjugado de ghrelina controle a adiposidade a um grau maior que a administração de uma quantidade menor. Além disso, a eficácia também é contemplada em dosagens abaixo do nível no qual a toxicidade é vista. Adicionalmente, na prática, doses maiores são geralmente usadas, onde o tratamento terapêutico da obesidade é o fim desejado, enquanto doses menores são geralmente usadas para fins profiláticos ou de ganho de peso lento.

Será apreciado que a dosagem específica administrada em um dado caso será ajustada de acordo com a condição do indivíduo e outros fatores médicos relevantes que possam modificar a atividade do imunoconjugado de ghrelina ou a resposta do indivíduo, como é bem conhecido pelos versados na técnica. Por exemplo, a dose específica para um paciente em particular depende da idade, peso corpóreo, estado geral de saúde, dieta e tempo e modo de administração, taxa de excreção e medicamentos usados em combinação. As dosagens para um dado paciente podem ser determinadas usando considerações convencionais, tais como por meio de um protocolo farmacológico ou profilático convencional e apropriado.

A dosagem máxima para um indivíduo é a dosagem maior que não causa efeitos colaterais indesejáveis ou intoleráveis. O número de variáveis com relação ao regime de tratamento ou profilático individual é grande, sendo esperada uma faixa considerável de doses. É antecipado que dosagens de imunoconjugado na faixa de cerca de 0,1 µg/kg de peso corpóreo a cerca de 10 mg/kg de peso corpóreo são contempladas, tal como na faixa de cerca de 500 µg/kg de peso corpóreo a cerca de 1.000 µg/kg de peso corpóreo que prevenirão ou reduzirão os sintomas em pelo menos 50% em comparação aos sintomas de pré-tratamento. É especificamente contemplado que preparações de vacina e composições da invenção possam aliviar o ganho de peso, sem prover uma cura ou em algumas modalidades, possam ser usadas para curar ou prevenir a obesidade.

É especificamente contemplado que qualquer modalidade de qualquer método ou composição da invenção possa ser usada com qualquer outro método ou composição da invenção.

Conforme empregado nesse relatório descritivo e nas reivindicações apenas, as formas singulares “um, uma” e “o, a” incluem referências ao plural, a menos que o contexto indique claramente de outra forma. Assim, por exemplo, referência a uma composição contendo um “polipeptídeo” inclui uma mistura de dois ou mais polipeptídeos. Deve ser apreciado que o termo “ou” é empregado geralmente em seu sentido incluindo “e/ou” a menos que

o teor claramente indique de outra forma.

É também especificamente entendido que qualquer valor numérico citado nesse documento inclui todos os valores do valor mais baixo ao valor mais alto, isto é, todas as combinações possíveis de valores numéricos entre o valor mais baixo e o valor mais alto enumerados sendo considerados como expressamente declarados nesse pedido. Por exemplo, se uma faixa é declarada como sendo de 1% a 50%, entende-se que os valores, tais como, 2% a 40%, 10% a 30% ou 1% a 3%, etc., estejam expressamente enumerados nesse relatório descritivo.

EXEMPLOS

Os exemplos que se seguem são fornecidos de modo a ajudar no entendimento adicional da invenção. Os materiais e condições específicos empregados se destinam a ilustração e não como uma limitação do escopo razoável das reivindicações apenas.

Exemplo 1. Síntese do imunoconjugado de ghrelina-hepateno

Ghr1-Ghr3 foram sintetizados e acoplados à proteína veículo “keyhole limpet” hemocianina (KLH), rendendo imunoconjugados Ghr1-KLH, Ghr2-KLH e Ghr3-KLH. Para a síntese dos peptídeos, todos os haptenos e substratos foram preparados em uma escala de 1,0 mmol como amidas de término C usando protocolos DIC/HOBt por escrito sob encomenda para Fmoc/fBu SPPS em um sintetizador de peptídeo automatizado CS Bio 136. Para os peptídeos portando uma esterificação de cadeia lateral Ser-3, 10 mmol do ácido de requisito são pré-ativados com 5 mmol de DIC em 10 mL de DCM por 20 minutos, após o que, 10 mL de DMF foram adicionados. A pasta resultante foi adicionada à resina de peptídeo parcialmente protegida, seguido por 0,5 mmol de DMAP e misturada por agitação orbital por toda a noite. As clivagens do teste TFA foram usadas para verificar a acilação quantitativa, para conjugações Lys (Mca) a resina-peptídeo foi agitada com 0,2 eq. Pd (PPh₃)₄ e 10 eq. de ácido *N,N'*-dimetilbarbitúrico em 1:1 DMF:DCM por 12 horas. A amina livre não mascarada recente foi então neutralizada por tratamento com DIEA/DMF a 5%, após o que ácido 7-metoxicoumarinil-4-acético foi acoplado de acordo com os protocolos DIC/HOBt. Para conjugações de ácido *n*-butanóico, 5 mmol de ácido *n*-butanóico foram pré-ativados com 5 mmol de DIC em 10 mL de DCM por 20 minutos, após o que, 10 mL de DMF foram adicionados. A pasta resultante foi adicionada à resina-peptídeo protegida, seguido por 0,5 mmol de DMAP, deixada reagir por 1 hora e todo o procedimento realizado duas vezes para obter *n*-butanoilação quantitativa. Após lavagem com DMF e DCM (cada um com lavagem de fluxo 2 x 20 sec.), as resinas-peptídeo completadas foram secas em vácuo por toda a noite. A desproteção global e clivagem foram realizadas por tratamento em bateladas com 95:2.5:2.5 TFA:água:triisopropilssilano (TIPS) por 2 horas, seguido por filtração e remoção de TFA por evaporação giratória. Os peptídeos foram então triturados de 10 volumes de Et₂O (pré-resfriados a -20°C) e isolados por centrifugação. Após lavagem da microesfera duas vezes

mais com Et₂O, os peptídeos foram extraídos em AcOH a 50% e purificados por RP-HPLC diretamente.

Ghrelin(1-10) Ser-3(butanoil) hapteno, Ghr1. ESI-MS: Teoria, Mw (peso molecular) = 1.406,4; M^{1+} = 1407,4, M^{2+} = 704,2. Observado, M^{1+} = 1.408,3, M^{3+} = 704,0.

5 Ghrelin(13-28) hapteno, Ghr2. ESI-MS: Teoria, Mw (peso molecular) = 2.166,5; M^{2+} 1.084,3, M^{3+} = 723,2. Observado, M^{2+} = 1.084,5, M^{3+} = 723,2

Ghrelin de rato (1-28) Ser-3(butanoil) hapteno, Ghr3. ESI-MS: Teoria, Mw (peso molecular) = 3.506,0; M^{2+} = 1.754,0, M^{3+} = 1.169,7. Observado, M^{2+} = 1754.1, M^{3+} = 1.169,7.

Exemplo 2. Indivíduos e protocolo de vacinação

10 Ratos Wistar machos, maduros (n=17, M±SEM: 413±8 g no início, 502±12 g na 4ª imunização; Charles River, Hollister, CA) foram individualmente alojados em um viveiro com ciclos de 12 horas:12 horas claro/escuro (as 6:00 horas as luzes eram ligadas), umidade a ~60% e temperatura controlada a 22°C com acesso à vontade a ração e água. A dte de ração em microesferas (LM-485 Diet 7012; Harlan Teklad, Madison, WI, USA) é um cereal
15 extrusado, à base de milho, compreendido de carboidrato a 65%, gordura a 13%, proteína a 21%, energia metabolizável 3,41 kcal/g. Os procedimentos se adequaram ao National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH número da publicação 85-23, revisto em 1996) e os "Principles of laboratory animal care" (<http://www.nap.edu/readingroom/books/laabrats>) e foram aprovados pelo Institutional Animal
20 Care and Use Committee of The Scripps Research Institute.

Os ratos maduros com peso e idade combinados foram imunizados usando protocolos do nosso laboratório conforme descrito em Qi e outros, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol immunochemical studies: Haptens, monoclonal antibodies, and a convenient synthesis of radiolabeled Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Journal of Medical Chemistry, (2005), 48:7389-7399,
25 incorporados nesse documento como referência. O processo de imunização envolveu cinco imunizações por 12 semanas. Ratos combinados em peso e idade receberam imunizações (i.p. 0,4 mL) 90 minutos antes do ciclo de escuro nos dias de experimento 0, 21 35, 56 e 84. As três primeiras imunizações consistiram em adjuvante em emulsão Ribi MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research Inc.) contendo 250 µg de Ghr1-KLH, Ghr2-KLH, Ghr3- KLH ou
30 KLH em 100 mM PBS, pH 7,4. As duas últimas empregaram alume (Pierce) como o adjuvante. O sangue da cauda foi coletado uma semana após imunização, centrifugado e o plasma analisado quanto às titulações de anticorpo e afinidade de ligação de ghrelin.

Exemplo 3. Titulações de anticorpo da vacina no plasma e afinidade de ligação de ghrelin em ratos vacinados

35 Os ratos foram vacinados conforme descrito no Exemplo 2. As titulações de anticorpo no plasma foram determinadas por ELISA. Placas de ELISA (96 poços, COSAR 3590) contendo 3 ng por poço de Ghr3-BSA em 50 µL de 10 mM de PBS, pH 7,2 foram secas por

toda a noite, seguido por fixação de rotina de etanol e bloqueio com blotto (leite isento de gordura) em PBS. As amostras de plasma de rato foram diluídas em série começando com uma diluição de 1:100 em blotto. A ligação do plasma foi permitida por 1 hora em uma câmara úmida a 37°C. Após a lavagem, 200 ng por poço de conjugado de IgG anti-rato de cabra com fosfatase alcalina (Southern Biotech) em 50 µL de PBS-blotto foram adicionados e incubados por 1 hora em uma câmara úmida a 37°C. As placas foram completamente lavadas com água, secas ao ar e desenvolvidas por adição de 200 µL por poço de 200 µM de *p*-nitrofenilfosfato (Pierce) em 100 mM de ácido 4-morfolinopropanossulfônico (MOPS), pH 7,4. Após 3 horas a temperatura ambiente, a absorvência foi medida em 405 nm em um leitor de microplaca (Molecular Devices). Os resultados são mostrados na tabela 1, a seguir.

A especificidade da ghrelina do plasma foi determinada usando dois ensaios: um ensaio de diálise de equilíbrio e um ELISA de competição. A diálise de equilíbrio foi realizada usando diluições em série de [¹²⁵I]-ghrelina de rato (Ser-3-*n*-octanoil, Bachem, diluída *in situ* com ghrelina não marcada) como ligante e quantidades de plasma constantes (diluição 1:1 em PBS, pH 7,4). Os poços em uma placa de microtitulação (12 por amostra) foram cheios com 170 µL de ghrelina radiomarcada em PBS, e uma segunda placa foi preparada com poços contendo plasma de ratos (que foram imunizados com os imunocombinados de ghrelina-KLH ou apenas com KLH) em PBS (170 µL/poço). Todas as duas placas foram conectadas hermeticamente aos poços cheios voltados um para o outro e separados com uma membrana de diálise (corte de 14.000 Da). As placas foram anexadas verticalmente a um agitador e foram agitadas por 24 horas a temperatura ambiente, após o que, elas foram cuidadosamente separadas. A membrana foi descartada e de cada poço foram transferidos 100 µL para os tubos para contagem com γ-radiação. A média nas diferenças em DPM (desintegrações por minuto) entre poços opostos foi determinada para cada diluição de ghrelina, rendendo constantes de ligação aparentes ($K_{d,app}$). Os resultados são mostrados na tabela 1, a seguir.

Para ELISA de competição, placas (96 poços) foram revestidas por toda a noite a 4°C com conjugado de ghrelina-BSA preparado recentemente. As placas foram bloqueadas com leite desnatado a 4%, lavadas e as amostras de sangue foram adicionadas em diluições apropriadas. As placas foram lavadas e Ser-3 *n*-octanoil ghrelina foi adicionada aos poços em uma série de concentrações iniciando em 100 µM. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C, completamente lavadas e conjugado (Pierce) de peroxidase de raiz-forte-anticamundongo de cabra (HRP) foi adicionado. Após um período de incubação de 1 hora a temperatura ambiente, as placas foram completamente lavadas novamente e o substrato de HRP (kit de substrato TMB; Pierce) foi adicionado, a reação se desenvolveu por 15 minutos e parou por adição de 2 M H₂SO₄. A absorvência (450 nm) foi lida e os valores colocados em gráfico usando GraFit (Erithacus Software Ltd). A concentração de antígeno livre na qual o

valor de absorvência é de 50% da absorvência máxima foi considerado a média $K_{D.app}$ do plasma para ghrelina. Os resultados são mostrados na tabela 1 a seguir.

Tabela 1

	Titulações de vacina (x100)		Afinidade do plasma $K_{D.app}$ após 13 semanas para			Taxa de seletividade
			<i>n</i> -octanoil ghrelina		Des-octanoil ghrelina	
Grupo de imunização	9 semanas	13 semanas	ELISA (nM)	Diálise de equilíbrio (nM)	ELISA (nM)	($K_{D.app}$ -des-octanoil- la/($K_{D.app}$ - <i>n</i> -octanoila)
Ghr1-KLH(<i>n</i> =5)	1 ± 3	34 ± 12	1.461 ± 569	45 ± 22	47.655 ± 235	98 ± 48
Ghr2-KLH(<i>n</i> =5)	23 ± 12	13 ± 3	> 50.000	> 20.000	14.308 ± 11.916	<0,3 ± 0,2
Ghr3-KLH(<i>n</i> =5)	56 ± 15	137 ± 51	619 ± 173	243 ± 192	26.010 ± 10.231	41 ± 12
KLH (<i>n</i> =3)	2 ± 1	2 ± 1	> 50.000	> 20.000	>50.000	N.D.

Os dados são expressos como M ± SEM. As titulações e afinidade de plasma foram transformadas com log para calcular as médias, taxas de seletividade e para análise estatística. Os valores refletem transformações antilog.

Conforme mostrado na Tabela 1, ambos imunoconjugados de ghrelina Ghr1-KLH e Ghr3-KLH produziram boas respostas imunes (titulações de anticorpo na vacina aumentadas) na nona semana ou após a quarta imunização. As respostas foram de especificidade apropriada, uma vez que os anticorpos promovidos por Ghr1-KLH não tiveram reação cruzada com Ghr2-BSA e os anticorpos promovidos por Ghr2-KHL da mesma forma tiveram baixa afinidade para Ghr1-BSA (dados não mostrados). Embora cada grupo de imunização tivesse promovido uma resposta imune contra o imunoconjugado com o qual eles foram vacinados, apenas os ratos dos grupos imunizados com Ghr1-KLH ou Ghr3-KLH desenvolveram boa afinidade de ligação de plasma para ghrelina *n*-octanoilada, a forma de circulação putativamente ativa. O plasma dos ratos vacinados com Ghr1-KLH ou Ghr3-KLH não estava potencialmente ligado pela forma des-octanoila inativa da ghrelina, que predomina na circulação (razão de pelo menos 1,8:1) (Sato e outros, Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration (2005), Endocrinology, 146:2510-6, incorporado aqui como referência) e pode de outra forma competir para neutralização do anticorpo, resultando em especificidade maior para acila versus des-acil ghrelina.

Exemplo 4. Ganho de peso pós-imunização, ingestão de alimento e eficiência de a-

alimentação

Os ratos foram imunizados conforme descrito no Exemplo 2. O peso corpóreo e a ingestão de alimentos foram determinados diariamente (0,1 g de precisão), 2 horas antes do início do ciclo de escuro durante semanas após as quarta e quinta imunizações, quando as

5 titulações dos anticorpos estavam maximizadas. A eficiência de alimentação foi calculada como ganho de peso corpóreo por unidade de ingestão de energia (mg/kcal).

A figura 2 mostra a razão correspondente de ganho de peso corpóreo, ingestão diária de alimentos e eficiência de alimentação de ratos imunizados como uma função da vacina que os indivíduos receberam, uma vez que as titulações de vários ratos aumentou na

10 faixa de 1:10.000. Os ratos que receberam os imunocorregulados Ghr1-KLH e Ghr3-KLH ganharam menos peso por dia que os ratos imunizados com Ghr2-KLH ou KLH através do período de observação de 7 dias após a 4ª imunização (figura 2ª). Isso ocorreu a despeito dos ratos comerem (figura 2B) e beberem (não mostrado) normalmente, indicando uma eficiência de alimentação reduzida de indivíduos vacinados com Ghr1-KLH e Ghr3-KLH (figura

15 2C). Antes disso, durante as semanas 5-8, quando as titulações eram modestas e ainda em elevação, as diferenças relacionadas à vacina no ganho de peso diário (KLH: $1,22 \pm 0,32$ versus Ghr3-KLH: $0,92 \pm 0,12$ e Ghr1-KLH: $1,01 \pm 0,15$ g/dia) e eficiência de alimentação (KLH: $44,4 \pm 5,5$ versus Ghr3-KLH: $28,5 \pm 3,0$ e Ghr1-KLH: $33,6 \pm 4,4$ mg/kcal) estavam na mesma direção, porém correspondentemente menores, sustentando a dependência proposta na afinidade de ligação de antighrelina no plasma.

20

Exemplo 5. Relação das taxas de capacidade de ligação de antighrelina no plasma para homeostasia de energia corpórea integral, adiposidade e ghrelina no cérebro/plasma

De modo a determinar se a capacidade de ligação de antighrelina na circulação está relacionada à atenuação de ganho de peso corpóreo, os indivíduos vacinados conforme

25 descrito no Exemplo 2 foram divididos naqueles que desenvolveram titulações de anticorpo alta ou baixa ao Ghr3-BSA (figura 3, painel A) e comparados nas semanas após a 4ª e 5ª imunizações. Conforme mostrado na figura 3, painel B, cada indivíduo com titulações altas de Ghr3-BSA também exibiu boa afinidade de plasma para *n*-octanoil ghrelina por competição. Análise ELISA ($K_{D-app} < 650$ nM), superiores a uma ordem de grandeza na média em

30 relação aqueles com titulações Ghr3-BSA mais baixas. Aqueles ratos com capacidade de ligação de ghrelina no plasma maior ganharam ~0,5 g menos peso por dia em relação aos com afinidade de plasma inferior para ghrelina (mostrado na figura 3, painel C), a despeito da ingestão normal de alimentos (figura 3, painel D), novamente indicando eficiência de alimentação diminuída (figura 3, painel E), com o mesmo perfil de resultados observados após

35 cada imunização. Mesmo os ratos com capacidade de ligação de ghrelina no plasma mais baixa, porém mensurável, exibiram eficiência de alimentação reduzida em comparação aos controles KLH (figura 3, painel E).

Os tratos gastrintestinais foram removidos de carcaças congeladas (25°C). As carcaças foram então secas (70°C) para massa constante de modo a determinar o teor de água e então extraídas com éter petróleo em um aparelho Soxhlet para determinar a massa seca isenta de gordura compreendida de ambas proteína e cinzas, em comparação à massa de gordura (Dobush e outros, (1985), Canadian Journal of Zoolology, 63:1917-1920, incorporado nesse documento como referência). Conforme mostrado na figura 3, painel F e Tabela 2, a seguir, a análise das carcaças mostrou que os ratos com respostas antighrelina fortes ganharam massa seca isenta de gordura preferivelmente em relação à massa de gordura, quando comparados aqueles com respostas imunes antighrelina mais fracas, e não diferem em teor de água.

Tabela 2

Grupo	Massa seca isenta de gordura (%)			Massa de gordura (%)	Água (%)
	Proteína	Cinza	Total		
Titulações altas de Ghr3-BSA (n=5)	22,9 ± 0,2*	2,9 ± 0,1	25,8 ± 0,2*	13,6 ± 1,6*	60,6 ± 1,4
Titulações baixas de Ghr3-BSA (n=9)	22,0 ± 0,4	2,8 ± 0,1	24,8 ± 0,4	17,1 ± 1,3	58,2 ± 1,0

Os dados são expressos como M ± SEM, *p<0,05, *p=0,06 versus grupo de titulação baixa de Ghr3-BSA, teste-t corrigido de Welch.

Concentrações totais de ghrelina (octanoila e des-octanoila combinadas) em amostras de plasma e de cérebro de ratos foram determinadas com o emprego de um kit de imunoensaio de enzima de ghrelina (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA). Os extratos de tecido foram obtidos usando os seguintes métodos descritos em Shibata e outros; (48) >95% de recuperação da ghrelina foram reportados). Em resumo, os cérebros integrais foram congelados em pedaços em 2-metilbutano resfriados em gelo seco e armazenados a -80°C antes do uso. O tecido cerebral foi fatiado em 10-15 pedaços e fervido por 7 minutos em água (10 mL) e ácido acético (580 µL, 100%) foi adicionado após resfriamento, para render 1 M de AcOH. A suspensão foi homogeneizada com um Tekmar Tissumizer e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi liofilizado, redissolvido em tampão EIA (Phoenix Pharmaceuticals) e analisado seguindo-se as instruções do fabricante. Consistente com a diminuição relativa na gordura, os níveis de plasma terminal do hormônio de adipócito, leptina, foram reduzidos nos ratos com afinidade de plasma forte para ghrelina

(figura 3, painel G). Os níveis de insulina na circulação não diferem confiavelmente como uma função da afinidade de ligação de ghrelina no plasma obtida (M+SEM: Alta: $0,8 \pm 0,2$ versus Baixa: $1,3 \pm 0,2$ ng/mL). Possivelmente consistente com uma passagem reduzida da circulação de ghrelina para o compartimento central, a razão dos níveis da ghrelina total no cérebro/plasma foi reduzida nos ratos em relação à sua capacidade de ligação antighrelina no plasma (figura 3, painel H).

Exemplo 6. Níveis de mediadores inflamatórios no plasma em ratos vacinados

De modo a examinar a possibilidade de que os efeitos de vacinação possam resultar de uma resposta imune sistêmica não específica, mediadores pró-inflamatórios, incluindo interleucina-1 β , interleucina-6, fator- α de necrose de tumor, proteína-1 quimioatraente de monócito e inibidor de ativador de plasminogênio total tipo 1 foram medidos em ratos vacinados, conforme descrito no Exemplo 2.

Os ratos foram sacrificados por decapitação no dia de experimento 92, 1-4 horas no ciclo de escuro e o sangue foi coletado em tubos de polipropileno resfriado contendo um coquetel de 0,5 M de EDTA (~1/10 v/v) e inibidor de protease (~1/100 v/v) (Sigma, St. Louis, MO). O plasma foi obtido por centrifugação (3.000 rpm, 4°C, 20 minutos) e armazenado a -80°C, até análise por um painel de adipocina de rato multiplexo (Linco, St. Charles, MO), um imunoenensaio com base em tecnologia xMAP™ usando instrumentação Luminex®. O limite da sensibilidade para TNF- α , MCP-1 e IL-1 β foi de 4,9 pg/mL e para leptina, IL-6, insulina e PAI-1 total foi de 12,2 pg/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio típico foi < 4%.

Conforme mostrado na Tabela 3 a seguir, os níveis de plasma eram baixos na base absoluta através dos grupos de tratamento e não relacionado á especificidade do plasma para ghrelina acilada.

Tabela 3

Grupo	IL-1 β		PAI-1 total	IL-6		TNF- α	MCP-1	
	Pg/mL	Pg/mL	Detec tável	Pg/mL	Detec tável	Pg/mL	Detect ável	Pg/mL
Titulações altas de G-hr3-BSA (n=5)	18 $\pm$ 8	452 $\pm$ 315	2/5	101 $\pm$ 70	0/5	<4,9	3/5	177 $\pm$ 158
Titulações baixas de Ghr3-BSA (n=9)	38 $\pm$ 8	220 $\pm$ 88	3/9	157 $\pm$ 90	1/9	7 $\pm$ 2	4/9	79 $\pm$ 32

KLH (n=3)	27 ± 11	266 ± 210	2/3	221 ± 123	0/3	<4,9	1/3	30 ± 25
-----------	------------	--------------	-----	--------------	-----	------	-----	---------

Os dados são expressos como M ± SEM ou como a frequência dos níveis detectáveis.

Exemplo 7. Estatísticas

Análises de variação (ANOVA) foram empregadas para identificar as diferenças do grupo. Testes LSD protegidos de Fisher foram usados para comparações *posthoc*. Testes t de Welch, corrigidos para múltiplas comparações, foram usados para comparar os grupos com variação desigual. De modo a reduzir a heterogeneidade da variação e obter uma distribuição mais normal, os dados para IL-6, TNF- α , PAI-1 total, MCP-1, titulações de anticorpo no plasma, constantes de afinidade de ligação de ghrelina aparentes do plasma e razões de ghrelina total no cérebro/plasma foram primeiro transformadas com log para análise estatística, incluindo cálculo das razões de seletividade de titulação. Os valores correspondentes apresentados nas Tabelas ou figuras representam transformações antilog. Análise dos quadrados ϕ foi usada para testar se os indivíduos diferiram na frequência dos níveis de citocina na circulação detectáveis. O pacote de software era o Systat 11.0 (SPSS, Chicago, 111., USA).

LISTAGEM DE SEQUENCIA

<110> THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
 <120> VACINAS E MÉTODOS PARA CONTROLE DA ADIPOSIDADE
 <130> 017968-9004-WO00
 <140> PCT/US2007/074976
 <141> 08-01-2007
 <150> US 60/821.071
 <151> 08-01-2006
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <400> 1
 Gly Ser Xaa Phe Leu
 1 5
 <210> 2
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa na posição 6 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa na posição 7 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 2
 Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro
 1 5 10 15
 Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
 20
 <210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 3

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 4

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 5

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 6

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 7

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (11)..(11)

<223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).

<400> 8

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa

1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS,

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (11)..(11)

<223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (12)..(12)

<223> Xaa na posição 11 é tanto Ala (A) quanto Val (V).

<400> 9

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa

1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (11)..(11)

<223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (12)..(12)

<223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).

<400> 10

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln

1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (11)..(11)

<223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (12)..(12)

<223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).

<400> 11

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln

1 5 10

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (11)..(11)

<223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (12)..(12)

<223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).

<400> 12

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg

1 5 10 15

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (11)..(11)

<223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (12)..(12)

<223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).

<400> 13

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (11)..(11)

<223> Xaa na posição 11 é selecionada de Lys (K) ou Arg (R).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (12)..(12)

<223> Xaa na posição 12 é selecionada de Ala (A) ou Val (V).

<400> 14

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (11)..(11)

<223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (12)..(12)

<223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).

<400> 15

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser

<210> 16
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 16
 Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Glu Ser Lys
 <210> 17
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 17
 Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Glu Ser Lys Lys
 20

<210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 18
 Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Glu Ser Lys Lys Pro
 20
 <210> 19
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 19
 Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Glu Ser Lys Lys Pro Pro
 20

<210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 20
 Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala
 20
 <210> 21
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 21
 Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys
 20

<210> 22
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 22

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu

20 25

<210> 23
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 23

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln

20 25

<210> 24
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 24

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro

20 25

<210> 25
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Homo sapiens ou Rattus Norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).
 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 é tanto Lys (K) quanto Arg (R).
 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na posição 12 é tanto Ala (A) quanto Val (V).
 <400> 25

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Xaa Xaa Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 26

<211> 27

<212> PRT

<213> Felis catus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 26

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu

1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 27

<211> 28

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 27

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg

20 25

<210> 28

<211> 28

<212> PRT

<213> Canis Lupus Familiaris

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 28

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 29

<211> 28

<212> PRT

<213> Macaca Mulatta

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 29

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Ala Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 30

<211> 28

<212> PRT

<213> gallus gallus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 30

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys

1 5 10 15

Asp Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg Leu His Arg Arg

20 25

<210> 31

<211> 28

<212> PRT

<213> Equus caballus

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 é uma serina modificada da fórmula (I).

<400> 31

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His His Lys Val Gln His Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Lys Pro Arg

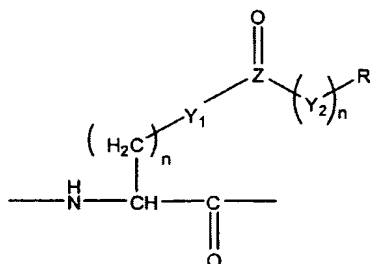
20 25

REIVINDICAÇÕES

1. Imunoconjugado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) um polipeptídeo de ghrelina compreendendo Gly-Ser-A-Phe-Leu-B-C,
onde:

A compreende:



onde:

Y_1 e Y_2 são selecionados independentemente de O, CH_2 e NH;

cada n é independentemente selecionado de 0 ou 1;

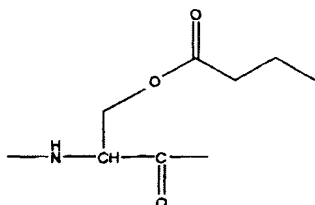
Z é C, PO ou SO; e

10 R é um grupo hidrocarboneto saturado ou insaturado, ramificado ou linear, substituído ou não substituído tendo cerca de 3 a cerca de 10 átomos de carbono, ou é um grupo cicloalquila ou arila tendo cerca de 3 a cerca de 13 átomos de carbono;

B compreende uma subsequência de 0 a 23 resíduos de aminoácido consecutivos da SEQ ID NO: 2; e

15 b) C compreende a fração veículo,
onde o polipeptídeo de ghrelina é ligado à fração veículo por uma fração ligante.

2. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que A compreende



20 3. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que B compreende resíduos de aminoácido 1 a 5 da SEQ ID NO: 2.

4. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a fração ligante é um resíduo de cisteína.

25 5. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o resíduo de cisteína é posicionado em um término do polipeptídeo de ghrelina.

6. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o término é o término carbóxi.

7. Imunoconjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o veículo é KLH ou BSA.

5 8. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma quantidade imunologicamente eficaz do imunoconjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e um veículo fisiologicamente aceitável.

10 9. Método de indução de uma resposta imune antighrelina em um indivíduo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administração ao indivíduo da composição de acordo com a reivindicação 8.

10 10. Método de controle de adiposidade em um indivíduo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administração ao indivíduo da composição de acordo com a reivindicação 8.

15 11. Imunoconjugado de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que Y_1 é O, Z é C, n é 0 e R é $CH_2CH_2CH_3$.

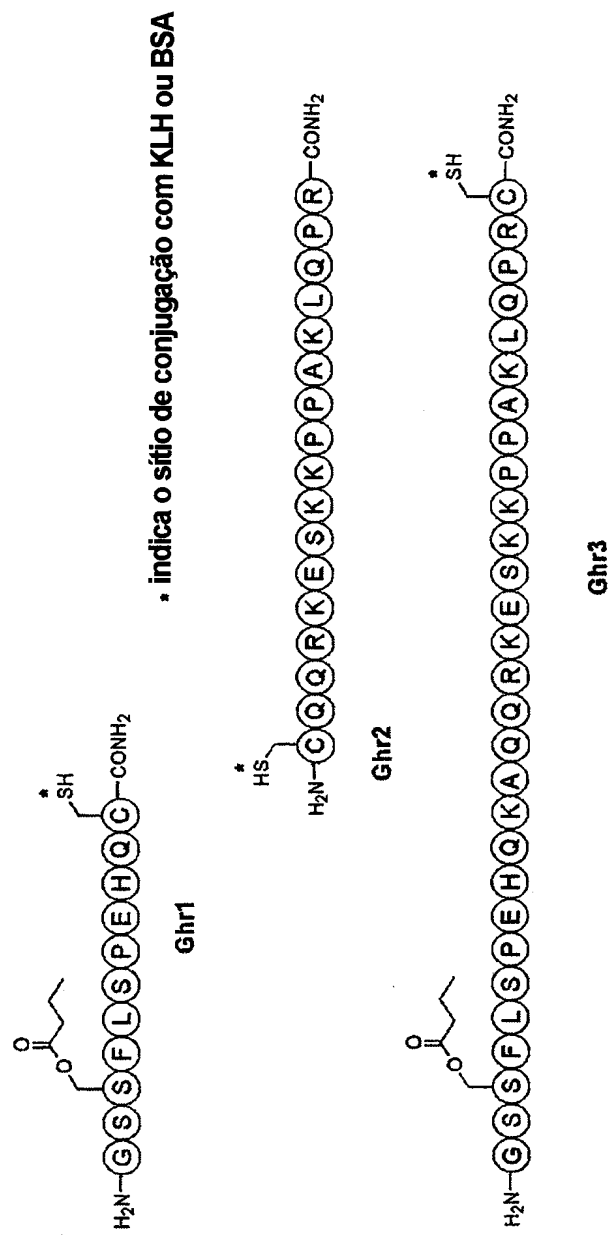
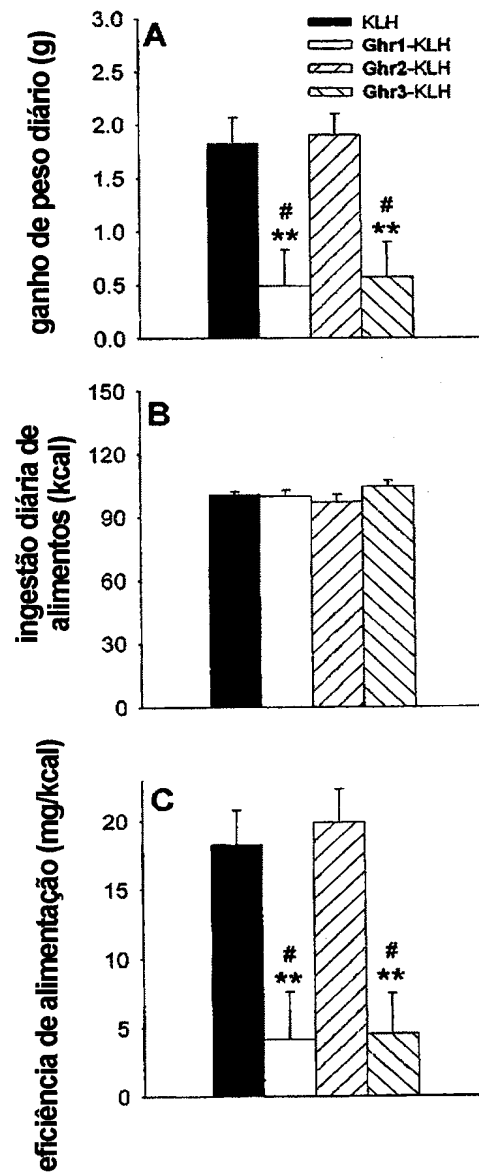


FIG. 1

**FIG. 2**

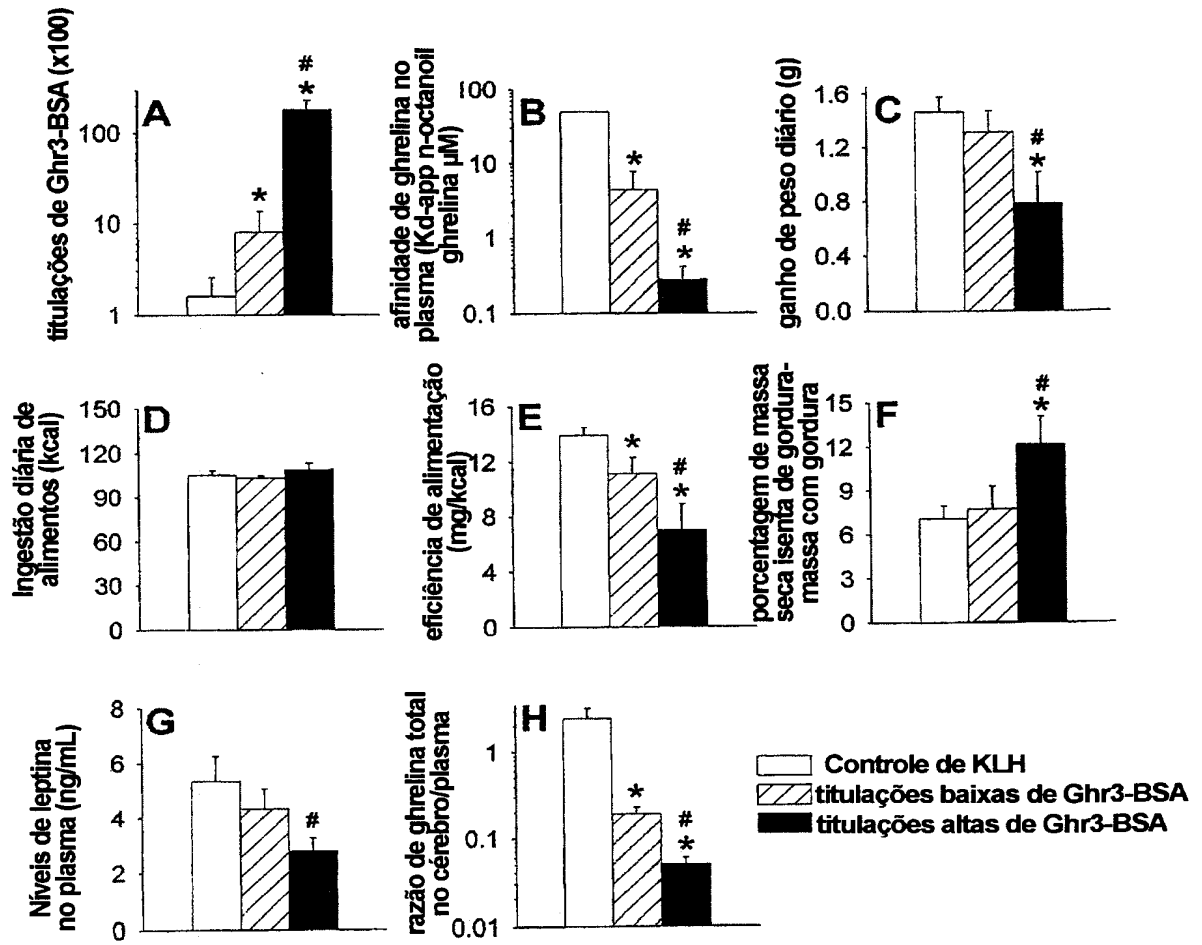


FIG. 3

RESUMO

“VACINAS E MÉTODOS PARA CONTROLE DA ADIPOSIDADE”

A invenção se refere aos imunoconjugados para impedir o ganho de peso e ao tratamento da obesidade em um indivíduo. Os imunoconjugados compreendem polipeptídeos de ghrelina específicos e uma fração veículo apropriada.

5