



MD 2311 G2 2003.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2311 (13) G2

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 12 N 15/12; C 07 K 14/47;  
C 12 Q 1/68; C 12 N 5/10, 5/16;  
C 07 K 16/18; G 01 N 33/53;  
A 61 K 38/17, 7/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: 97-0100  (22) Data depozit: 1995.08.17  (31) Nr.: 08/292,345; 08/347,563; 08/438,431;  08/483,211  (32) Data: 1994.08.17; 1994.11.30; 1995.05.10;  1995.06.07  (33) Țara: US  (41) Data publicării cererii:  1998.04.30, BOPI nr. 4/1998</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de  acordare a brevetului:  2003.11.30, BOPI nr. 11/2003  (85) 1997.02.17  (86) PCT/US95/10479 1995.08.17  (87) WO 96/05309 1996.02.22</p>
<p>(71) Solicitant: THE ROCKEFELLER UNIVERSITY, US  (72) Inventatori: FRIEDMAN, Jeffrey, M., US; ZHANG, Yiyang, CH/US; PROENCA, Ricardo, US; MAFFEI, Margherita, IT/US; HALAAS, Jeffrey, L., US; GAJIWALA, Ketan, IN/US; BURLEY, Stephen, K., US  (73) Titular: THE ROCKEFELLER UNIVERSITY, US  (74) Rezentant : SIMANENKOVA Tatiana, MD</p>	

(54) Polipeptide de obezitate, fragment imunogen, analog, analog uman și analog uman redus, moleculă de acid nucleic izolată, moleculă de ADN, moleculă de acid nucleic marcată detectabil, vectori conținând molecula ADN, anticorp monoclonal, anticorp policlonal și compoziție farmaceutică pentru reducerea greutateii corporale a animalelor

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la ingineria genetică, în particular la polipeptide de obezitate, care pot fi utilizate pentru controlul greutateii mamiferelor, inclusiv și omului.

Pentru rezolvarea problemei cu privire la controlul obezității și a conținutului de grăsime la mamifere sunt propuse polipeptide de obezitate (OB) și molecule ale acizilor nucleici, care codifică polipeptidele indicate.

Polipeptida OB, care conține 145...167 aminoacizi, este capabilă să moduleze greutatea corporală și include secvența aminoacidică SEQ ID NOS: 2, 4, 5 sau 6. O altă polipeptidă OB are cel puțin 83% de omologie față de secvența aminoacidică a polipeptidei OB prezentată prin secvența SEQ ID NOS: 2, 4, 5 sau 6.

2  
5 Se propune fragment imunogen, analog, analog uman și analog uman redus ale polipeptidei OB, moleculă de acid nucleic izolată, care codifică polipeptida OB și moleculă de ADN utilizată în asigurarea expresiei polipeptidei OB.

10 Mai sunt propuși vectori de expresie în celulele mamiferelor, care includ molecule ale acidului nucleic, legate funcțional cu secvența care codifică expresia și anticorpi monoclonal și policlonal specifici pentru polipeptida OB.

15 Este propusă, de asemenea, o compoziție farmaceutică pentru reducerea greutateii corporale a animalelor conținând polipeptida OB.

Revendicări: 23

Figuri: 35

MD 2311 G2 2003.11.30

## MD 2311 G2 2003.11.30

3

### Descriere:

Prezenta invenție se referă la ingineria genetică, în special la polipeptide de obezitate, care pot fi utilizate pentru controlarea greutateii mamiferelor, inclusiv și a omului.

5 Obezitatea, definită ca un exces al grăsimii corporale relativ cu masa corporală fără grăsime, este asociată cu importante morbidități psihologice și medicale, cele medicale incluzând: hipertensiunea, lipidele sanguine ridicate și tipul II sau diabetul melitis non-insulinodependent (NIDDM). În SUA există de la 6 până la 10 milioane de indivizi cu NIDDM, incluzând 18% din populația cu vârsta de 65 ani (Harris et al. Int. J. Obes. 11: 275-283 (1987)). Circa 45% bărbați și 70% femei cu NIDDM sunt obezi, iar diabetul acestora se dezagravează substanțial sau este eliminat prin reducerea greutateii (Harris, Diabetes Care, 14(3): 639-648 (1991)). Obezitatea și NIDDM sunt boli ereditare, însă genele predispoziției n-au fost încă identificate. Baza genetică moleculară a acestor tulburări legate de metabolism este foarte importantă, dar foarte puțin înțeleasă.

15 Asimilarea, înmagazinarea și utilizarea energiei nutritive constituie un sistem central homeostatic decisiv pentru supraviețuirea metazoarelor. În cazul mamiferelor subterane, înmagazinarea în țesutul adipos a unor cantități mari de combustibil metabolic, cum ar fi trigliceridele, este crucială pentru supraviețuirea în perioadele în care acestea sunt lipsite de hrană. Necesitatea menținerii unui nivel fix de energie care se înmagazinează fără modificări continue în dimensiunile și forma organismului, determină obținerea unui echilibru între energia consumată și cea dezvoltată. Cu toate acestea, mecanismele moleculare care reglează echilibrul de energie urmează a fi elucidate. Izolarea moleculelor care transmit informația nutrițională și controlarea echilibrului de energie critice sunt decisive în ce privește înțelegerea mecanismului reglării greutateii corporale, atât în stare de sănătate, cât și în caz de boală.

20 Nivelul individual al adipozității este determinat genetic. Examinarea gradului de concordanță a greutateii corporale și adipozității la gemenii monoziгоți, dizigoți sau adoptivi, precum și a părinților biologici ai acestora, a demonstrat că moștenirea obezității (0,4...0,8) depășește indicii multor altor trăsături considerate actualmente de natură genetică substanțială, cum ar fi schizofrenia, alcoolismul și ateroscleroza (Stunkard et al. N. Engl. J. Med. 322: 1483-1487 (1990)). Au fost raportate și asemănările familiale, privind ratele consumului de energie (Bogardus et al. Diabetes, 35: 1-5 (1986)). Analiza genetică a populațiilor delimitate geografic a demonstrat că un număr relativ mic de gene poate constitui 30...50% din variația compoziției corporale (Moll et al. Am. J. Hum. Genet. 49: 1243-1255 (1991)). Cu toate acestea, nici una din genele responsabile de obezitate la populația generală, n-a fost cartografiată genetic în ce privește localizarea unui anumit cromozom.

35 Pentru rozătoare, modelele de obezitate includ șapte mutații aparent monogenetice. Mutațiile de obezitate studiate mai intens la șoareci au fost genele ob (obezitate) și genele db (diabet). În cazul prezenței lor pe aceeași tulpină genetică de bază, rezultă fenotipuri metabolice și de comportament care nu se disting, sugerându-se că aceste gene pot să funcționeze în același mod fiziologic (Coleman et al. Diabetologia, 14: 141-148 (1978)). La șoareci, homozigoții pentru fiecare mutație sunt hiperfagi și hipometabolici, conducând la un fenotip obez, care se remarcă la vârsta de o lună. Greutatea acestor animale tinde să se stabilizeze în jurul a 60...70 g (comparativ cu greutatea de 30...35 g la șoarecii mator). Animalele OB și DB manifestă o mulțime de alte modificări metabolice și hormonale, ceea ce face dificilă identificarea defectului primar atribuibil mutației (Bray et al. Am. J. Clin. Nutr. 50: 891-902 (1989)). Fiecare dintre modelele de obezitate în cazul rozătoarelor este însoțit de modificări ale metabolismului hidraților de carbon, care sunt asemănătoare celor umane în cazul diabetului de tipul II.

40 În unele cazuri severitatea diabetului depinde parțial de tulpină genetică de bază la șoareci (Leiter, Endocrinology, 124: 912-922 (1989)). Pentru ambele gene ob și db, șoarecii congenici C57BL/Ks dezvoltă un tip de diabet sever, cu necroză esențială  $\beta$  celulară și atrofie insulară, ceea ce are ca rezultat insulinopenia relativă. Spre deosebire de aceștia, șoarecii congenici C57BL/6J ob și db dezvoltă un diabet insulinorezistent trecător, care este eventual compensat prin hipertrofia  $\beta$  celulară, asemănătoare diabetului uman de tipul II.

50 Fenotipul ob și db la șoareci se aseamănă cu obezitatea la oameni, însă se manifestă altfel decât la dezvoltarea diabetului - șoarecii mutați mănâncă mai mult și consumă mai puțină energie în raport cu martorii slabi (la fel ca oamenii obezi). Acest fenotip este aproape similar cu cel întâlnit la animalele cu leziuni ale hipotalamusului ventromedian, ceea ce demonstrează că ambele mutații pot interfera cu abilitatea de integrare proprie sau de răspuns la informația nutrițională din sistemul nervos central. Susținerea acestei ipoteze apare ca rezultat al experimentelor de parabioză (Coleman, Diabetologia, 9: 294-298 (1973)), care demonstrează că la șoarecii ob este deficitar factorul circulant de saturație și că șoarecii db sunt rezistenți la efectele factorului ob (posibil din cauza unui receptor defect ob). Aceste experimente au condus la concluzia că obezitatea la acești șoareci mutați poate rezulta din diverse defecte, într-o legătură aferentă și (sau) centru integrativ al mecanismul de feedback postulat, care controlează compoziția organismului.

## MD 2311 G2 2003.11.30

4

Prin utilizarea markerilor moleculari și clasici genetici, genele ob și db au fost cartate în forma cromozomului proximal 6 și respectiv mid cromozomului 4 (Bahary et al. Proc. Nat. Acad. Sci. Usa 87: 8642-8646 (1990); Friedman et al. Genomics, 11: 1054-1062 (1991)). În ambele cazuri, cartarea mutațiilor în zonele genomului de șoarece, similare cu cele umane, demonstrează că, dacă există omologi umani de ob și db, aceștia sunt conform desenelor, cromozomi umani 7q și respectiv cromozomi umani lp. Defectele în gena db are ca rezultat obezitatea la alte specii de mamifere: în cazul încrucișărilor genetice între șobolani Zucker fa/fa și șobolani Brown Norway +/+, mutația fa (cromozomul 5 la șobolan) fiind flancată în aceeași poziție ca și mutația DB, flancată în aceeași poziție ca și mutația db, flancată la șoarece (Truett et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7806-7809 (1991)). Din cauza unei multitudini de factori care par a influența greutatea corporală, n-a fost posibil să se precizeze care factori și, în special, care mecanisme homeostatice sunt determinative în ceea ce privește greutatea corporală. Astfel, problema prezentei invenției este de a descoperi modelatori ai greutății corporale, care să permită controlarea adipozității și conținutului de grăsimi la mamifere.

În cererea EP O 566 410 A2 [1] sunt descriși modelatori ai greutății corpului, aplicarea lor pentru profilaxia și tratarea obezitității, precum și remedii farmaceutice pe baza lor. Sunt descriși derivații factorului lipogenezei de inhibare (AGIF), echivalente cu AGIF care se dezvoltă în lipsa aminoacizilor 2-9 N-terminali, codificarea acizilor nucleici pentru acești derivați, vectori și celule – stăpân care conțin acizi nucleici, procedeu de obținere a derivaților indicați și aplicarea lor în calitate de agenți terapeutici contra citopeniei și obezitității. Este propusă o compoziție farmaceutică care conține o cantitate eficientă a substanței active în amestec cu dizolvantul farmaceutic acceptabil sau un purtător. Substanța activă este selectată din derivații factorului lipogenezei umane de inhibare în lipsa de la 2...9 aminoacizi N-terminali, derivații lui echivalenți funcționali și precedenții săi.

Asupra greutății corporale acționează factori multipli. Practic, este imposibil de prezis care mecanisme homeostatice determină în primul rând greutatea corporală. Astfel, în calitate de modelatori ai greutății corporale poate fi prezentat un spectru larg de substanțe. Constituie o problema depistarea acelor substanțe care acționează mai eficient sporind spectrul substanțelor aplicate.

Pe lângă aceasta, lărgirea spectrului modelatorilor greutății corpului dă posibilitate să luăm mai exact în considerație particularitățile individuale ale fiecărui organism și să fie stabilit un medicament mai potrivit.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este lărgirea spectrului modelatorilor greutății corporale.

Conform prezentei invenții, problema controlării obezitității și conținutului de grăsimi la animale, în special la mamifere, a fost rezolvată prin aceea că au fost prezentate molecule de acid nucleic și polipeptide pentru obezitate (OB), socotite pentru aceste polipeptide, așa cum s-a descris în această invenție. Invenția de față vizează în primul rând polipeptidele izolate, utilizate pentru modulare, bunăoară pentru controlarea și reglarea greutății corporale și obezitității, ca și secvențele de acizi nucleici conținute de aceste polipeptide, care, nu numai că permit producerea recombinată a polipeptidelor OB, ba chiar ele însele sunt utilizate pentru modelarea greutății corporale.

Conform invenției se propun polipeptidele pentru obezitate (OB), având de la circa 145 până la circa 167 de aminoacizi, fiind capabile a modula greutatea corporală la animale, în special la mamifere, incluzând secvența aminoacidă SEQ NOS: 2,4,5 sau 6.

Polipeptidele OB pot fi preparate prin metode recombinante sau prin metode chimice sintetice.

Polipeptidele OB selectate care au cel puțin o grupă chimică legată la acesta.

Sunt propuse la fel polipeptidele OB, având cel puțin 83% de omologie în secvența aminoacidă a polipeptidei OB, prezentată prin secvența SEQ NOS: 2,4,5 sau 6.

Fragmentele imunogenice ale polipeptidelor OB selectate, conform prezentei invenții, din gruparea care include: Val-Pro-LLe-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr (SEQ ID NO: 18); Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala (SEQ ID NO: 19); Ser-Lys-Ser-Gys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp (SEQ ID NO: 20); și Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys (SEQ ID NO: 21).

Analogii polipeptidei umane OB includ secvența aminoacidă SEQ ID NO: 4 sau SEQ ID NO: 6, în care cel puțin un aminoacid selectat dintr-o grupă care include aminoacizii 53, 56, 71, 85, 89, 92, 95, 98, 110, 118, 121, 122, 126, 127, 128, 129, 132, 139, 157, 159, 163, și 166 (conform numerotării din secvența SEQ ID NO: 4) este substituit cu un alt aminoacid, cum ar fi aminoacidul divergent al polipeptidei OB la șoarece cu secvențele SEQ ID NO: 2, sau SEQ ID NO: 5, sau cu alanină.

Analogii polipeptidei umane OB sus-menționați sunt selectați dintr-o grupă care include polipeptidele în care :

(a) reziduul serinei în poziția 53 este substituit cu glicină, alanină, cisteină, valină, metionină sau treonină;

(b) reziduul serinei în poziția 98 este substituit cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină;

(c) reziduul argininei în poziția 92 este substituit cu asparagină, lizină, histidină, glutamină, acid glutamic, acid asparagic, serină, treonină, metionină sau cisteină.

## MD 2311 G2 2003.11.30

5

Adițional, , conform prezentei invenții, analogii polipeptidei OB, care includ secvența aminoacidă SEQ ID NO: 2, 4, 5 sau 6 de aminoacid, sunt selectați dintr-o grupare care include polipeptidele în care :

- (a) cel puțin un reziduu de acid asparagic este substituit cu acid glutamic;
- (b) cel puțin un reziduu de izoleucină este substituit cu leucină;
- 5 (c) cel puțin un reziduu de glicină sau valină este substituit cu alanină;
- (d) cel puțin un reziduu de arginină este substituit cu histidină;
- (e) cel puțin un reziduu de tirozină sau fenilalanină este substituit cu triptofan;
- (f) cel puțin un reziduu în pozițiile 121 ... 128 (conform numerotării secvenței SEQ ID No: 4) este substituit cu glicină sau alanină;
- 10 (g) cel puțin un reziduu în pozițiile 54 ... 60 sau 118 ... 166 (conform numerotării secvenței SEQ ID NO: 4) este substituit cu lizină, acid glutamic, cisteină sau prolină.

Polipeptidele OB sau analogii lor umani, preferați în prezent, , conform prezentei invenții, sunt selectați din grupa care include polipeptidele:

- (a) având anularea reziduurilor în pozițiile de la 1 ... 21 și
- 15 (b) polipeptide având, conform revendicării (a), o meteonină în poziția 21, sau având o secvența de glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 38), în pozițiile 18 până a 21, sau având o secvență de metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 98), în pozițiile 1 ... 21;
- 20 (c) polipeptide conform revendicării (a) având secvența leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină secvența (SEQ ID NO: 26) în pozițiile 14...21, sau având o secvență de acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 27) în pozițiile 18...21 sau având o secvență de leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SEQ ID NO: 28) în pozițiile 18...21 sau având o secvență de metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SEQ ID NO: 99) în pozițiile de la 2... 21, sau având o secvență de glicină-serină-prolină, în pozițiile 18...21.

Polipeptidele OB având cel puțin 83% de omologie referitoare la secvența aminoacidă a polipeptidei OB, precum și analogii polipeptidei umane OB

- în care substituția este cu alanină,
- 30 - sunt selectați dintr-o grupă care include polipeptidele în care :
- (a) reziduuul serinei, în poziția 53, este substituit cu glicină, alanină, cisteină, valină, metionină sau treonină;
- (b) reziduuul serinei, în poziția 98, este substituit cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină;
- 35 (c) reziduuul argininei; în poziția 92, este substituit cu asparagină, lizină, histidină, glutamină, acid glutamic, acid asparagic, serină, treonină, metionină sau cisteină;

analogii polipeptidei OB sunt selectați dintr-o grupă care include polipeptidele:

- (a) având anularea reziduurilor în pozițiile 1 ... 21;
- (b) polipeptide conform revendicării (a), având meteonina în poziția 21, sau având secvența glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 38) în pozițiile 18...21, sau având o secvență metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (EQ ID NO: 98) în pozițiile 1...21 sau având o secvență de leucină-acid-glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 26) în pozițiile 14...21, sau având o secvență de acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 27) în pozițiile 18...21, sau având o secvență leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SEQ ID NO: 28) în pozițiile 18...21, sau având o secvență din metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SEQ ID NO: 99) în pozițiile 2...21 sau având secvența glicină-serină-prolină în pozițiile 18...21.
- 45 Analogii reduși ale polipeptidei umane OB, incluzând o secvență aminoacidă SEQ ID NO: 2,4,5, sau 6, preferate în prezent, conform prezentei invenții, selectat dintr-o grupare (conform numerotării din Secvența SEQ ID No: 4) incluzând polipeptidele în care:
- 50 (a) cel puțin un reziduu în pozițiile 121...128 este anulat;

- (b) reziduurile 1...116 sunt anulate;
- (c) reziduurile 1...21 și 54...167 sunt anulate;
- 55 (d) reziduurile 1...60 și 117...167 sunt anulate;

## MD 2311 G2 2003.11.30

6

- (e) reziduurile 1...60 sunt anulate;
- (f) reziduurile 1...53 sunt anulate;
- (g) analog al subgrupeii (a) în care reziduurile 1...21 sunt anulate;
- 5 (h) analog conform grupelor (a)...(g) având acidul N-final sau secvența de aminoacizi, selectată din grupa, care include:
- (1) metionină;
- (2) secvența glicină-serină-histidină-mentionină (SEQ ID NO: 38);
- (3) secvența metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidini-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 98);
- 10 (4) secvența leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 26);
- (5) secvența acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 27);
- (6) secvența leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SEQ ID NO: 28);
- 15 (7) secvența metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SEQ ID NO: 99);
- (8) secvența glicină-serină-prolină.
- Moleculă de acid nucleic izolată prevăzută de prezenta invenție, codifică polipeptida OB, așa cum s-a descris mai sus.
- 20 În special se prevăd moleculele de ADN pentru utilizare în exprimarea de siguranță a polipeptidei OB, având o activitate biologică de modulare a greutateii corporale la mamifere, ele se selectează dintr-o grupă alcătuită din:
- (a) moleculele ADN definite în secvențele SEQ ID NO: 1 și 3;
- (b) molecule ADN hibridizate până la moleculele ADN definite conform (a);
- 25 (c) moleculele ADN care îndreaptă exprimarea secvenței de aminoacizi codificate de oricare dintre moleculele de ADN menționate.
- Prezenta invenție se mai referă la moleculele de acid nucleic marcate detectabil fiind hibridizabile până la moleculele ADN, descrise mai sus.
- Vectorii prevăzuți de prezenta invenție cuprind o moleculă de ADN selectată dintr-o grupă, care include:
- 30 (a) o moleculă de acid nucleic izolată, care codifică polipeptida OB;
- (b) o moleculă de acid nucleic izolată, care codifică polipeptida OB, legată funcțional cu secvența care controlează expresia;
- (c) o moleculă de ADN utilizată în exprimarea de siguranță a polipeptidei OB;
- 35 (d) o moleculă de ADN utilizată în exprimarea de siguranță a polipeptidei OB, legată funcțional cu secvența care controlează expresia.
- Așadar, prezenta invenție prevede anticorpi specifici relativ cu polipeptida OB sau fragmentele anticorpilor indicați (marcași și nemarkași), care se asociază cu antigenul.
- Compoziția farmaceutică, conform prezentei invenții, cuprinde polipeptida OB descrisă mai sus și un purtător farmaceutic acceptabil și se aplică în metodele terapeutice pentru reducerea greutateii corporale a animalului. Deci ele pot fi utilizate în metodele terapeutice, cuprinzând sisteme de eliberare intravenoase, intraarteriale, intraperitoneale, intramusculare, subcutanate, nazale, orale sau pulmonare.
- 40 Datele prezente aici constată faptul că polipeptidele OB, conform prezentei invenții, în forma lor sunt secretate în primul rând de mamifere adipocite și că polipeptidele funcționează ca hormoni.
- 45 Exemplele aduse demonstrează că polipeptida OB, denumită alternativ aici "leptină", circulă în plasma șoarecilor, șobolanilor și în plasma umană. Leptina este absentă în plasma de șoarece OB/OB, dar este prezentă în concentrații de 10 ori mai mari în plasma de șoarece DB/DB și în concentrații de douăzeci de ori mai mari se găsesc la șobolani fa/fa. Mai mult decât atât, injecțiile zilnice de leptină recombinată, reduc dramatic masa corporală la șoarece ob/ob, afectează semnificativ greutatea corporală la șoarecele de tip sălbatec și nu are nici un efect asupra șoarecelui db/db.
- 50 În alt aspect, polipeptida dintr-o specie este biologic activă într-o altă specie. În special, polipeptida umană OB este activă la șoareci.
- Intr-un prim exemplu, modelatorii prezentei invenții cuprind molecule de acid nucleic, incluzând moleculele de AND recombinat (bunăoară, cADN sau un vector conținând cADN sau ADN genic izolat) sau genele clonate (bunăoară, ADN genic izolat) sau variantei de degenerare ale acestora, care cuprind polipeptidele înseși care servesc ca modelatori de control ai greutateii, așa cum s-a definit mai sus sau variantele conservate, ori fragmentele acestora, în special astfel de fragmente au absența peptida de

## MD 2311 G2 2003.11.30

7

semnalizare (alternativ se fac aici referiri la polipeptida OB matură), polipeptide care posedă secvențe de aminoacizi conform fig. 1A...E (SEQ ID NO:2), fig. 3 (SEQ ID NO:4), fig. 5 (SEQ ID NO:5) și fig. 6 (SEQ ID NO:6). Conform unor aspecte specifice, secvențele de aminoacizi pentru două variante murinice și umane ale polipeptidei OB, sunt de asemenea prevăzute. Ambele polipeptide sunt depistate într-o formă cu glutamina 49 anulată, ceea ce rezultă dintr-o legătură anormală a mARN. Polipeptidele OB din diferite specii pot fi superior omoloage; așa cum s-a arătat în fig. 4, peste 80% din polipeptidele murinice și umane OB sunt superior omoloage.

Moleculele de acid nucleic, moleculele de ADN recombinat sau genele clonate, pot avea secvențe de nucleotide sau pot fi complementare secvențelor codificate de ADN din fig. 1A ... E (SEQ ID NO:1) și fig. 2A și B (SEQ ID NO:3). În special, astfel de molecule ADN pot fi cADN sau ADN genic izolat din cromozom. Moleculele de acid nucleic, conform prezentei invenții, pot corespunde secvențelor flancate 5' și 3' ale ADN și secvențelor de ADN intronic. Deci, prezenta invenție se referă la identificarea acidului nucleic, având o accesiuone nucleotidă selectată dintre secvențele din fig. 1A ... E (SEQ NO:1) și fig. 2A și B (SEQ ID NO:3) și variantele de degenerare, variantele alelici și din alte molecule asemănătoare acestora.

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

Prezenta invenției mai prevede molecule de acid nucleic pentru utilizarea ca probe moleculare sau ca primeri pentru reacția în lanț a polimerazei, de amplificare (PCR), bunăoară oligonucleotidele sintetice sau naturale, având o secvență corespunzătoare la o porțiune a secvențelor, în fig. 1A ... E (SEQ ID NO:1), fig. 2A și B (SEQ ID NO:3) și fig. 20A ... C (SEQ ID NO:22...24) sau secvențele flancate 5' și 3' ale secvențelor codificate sau secvențele intronice ale ADN genic. În special, invenția examinează molecula de acid nucleic, având cel puțin 10 nucleotide în care o secvență a moleculei de acid nucleic corespunde unei secvență de nucleotidă cu același număr de nucleotide în secvențele de nucleotide din fig. 1A... E (SEQ ID NO:1), fig. 2A și B (SEQ ID NO:3) și fig. 20A ... C (SEQ ID NO:22) sau o secvență complementară a acestora. Mult mai preferabilă este secvența de acid nucleic a moleculei, care are cel puțin 15 nucleotide. Mult mai preferabilă este secvența de acid nucleic care are cel puțin 20 de nucleotide. Potrivit unui aspect al prezentei invenții, în care oligonucleotida este o probă, oligonucleotida este detectabil marcată, bunăoară: cu o radionucleotidă (cum ar fi <sup>32</sup>P) sau o enzimă.

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

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

Toate materialele menționate sunt considerate modelatori ai greutății corporale și ai compoziției grăsimilor, oferind astfel posibilitatea de a fi utilizate într-o varietate de contexte. În special, invenția prevede atât aplicațiile de diagnostic, cât și cele terapeutice, precum și anumite aplicații în agricultură. Modelatorii definiți aici includ atât moleculele de acid nucleic, cât și peptidele. Modelarea greutății corporale se realizează prin implicații terapeutice specifice în condițiile în care fie obezitatea, sau în mod opus cașexia, reprezintă condiții nedorite ale organismului, acestea putând fi remediate prin administrarea unuia sau a mai multor modelatori, conform prezentei invenții.

Una din metodele pentru modelarea greutății corporale la mamifere cuprinde exprimarea unei proteine conținută de acidul nucleic, având o succesiune nucleotidă de la secvența din fig. 1A ... E (SEQ ID NO:1), secvența din fig. 2A și B (SEQ ID NO:3) și variantei alelici și de degenerare ai acestora. Un astfel de control poate fi efectuat prin introducerea nucleotidelor obținute prin genoterapie în celulele grase sau la pacient, sau la gazdă, pentru a controla sau reduce obezitatea. Dimpotrivă, prepararea și administrarea neantagoniștii la nucleotide, cum ar fi moleculele contrasens, vor fi indicate și urmărite, bunăoară, atunci când condițiile conduc la o pierdere excesivă din greutate. Astfel de elemente vor fi introduse în nucleotide, direct în celulele grase, pentru a se efectua asemenea modificări. Corespunzător, proteinele definite prin fig. 1A la E, 3,5 și 6 (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 și SEQ ID NO:6), variantele conservate, fragmentele active ale acestora și moleculele mici asemănătoare, ar pute fi

## MD 2311 G2 2003.11.30

8

formulate pentru administrare directă în scopuri terapeutice, pentru efectuarea reducerii sau controlare  
grăsimi corporale excesive sau al unui câștig excesiv în greutate. Corespunzător, anticorpii și alții  
antagoniști ai acestora, din materialele proteice menționate, precum și fragmentele acestora, ar putea fi  
5 este dirijată în mod avantajos spre compoziția farmaceutică care cuprinde polipeptida OB, conform  
prezentei invenții, sau alternativ, un antagonist al acesteia, într-un amestec cu un purtător sau excipient  
acceptabil farmaceutic. Pe lângă aceasta, polipeptida OB conform prezentei invenții, poate fi  
administrată grație efectelor ei cosmetice, bunăoară, pentru a îmbunătăți aspectul corpului prin reducerea  
depozitelor de grăsime. Polipeptidă OB poate fi utilizată în dependență sau în conjuncție cu alte strategii  
10 cosmetice, bunăoară chirurgia. Utilizările de diagnostic ale nucleotidelor prezente și peptidele  
corespunzătoare se extind la folosirea acizilor nucleici pentru identificarea altor mutații ale varianțelor  
alelice ale acestuia, astfel ca să se dezvolte o gama largă de materiale de nucleotide active utilizate atât în  
scop de diagnostic, cât și pentru aplicații terapeutice. În special, atât mutațiile omozigote, cât și cele  
heterozigote ale nucleotidelor menționate, ar putea fi identificate ca fiind potrivite, într-o măsură mult  
15 mai exactă, condiției pacienților, pentru a determina potențialul de risc al individului în ce privește  
obezitatea. În special, mutațiile heterozigote sunt în prezent privite ca fiind asociate cu o obezitate  
moderată, în timp ce mutațiile omozigote vor fi asociate cu o condiție de obezitate severă și mult mai  
pronunțată. Testarea ADN ar putea fi apoi condusă aplicând materialele menționate mai sus, stabilitate în  
calitate de cote de nivel, astfel ca să devină capabile de a fi implicate în modificările prezentate, fie în  
20 formă de dietă, fie deprinderi personale sau direct prin intervenția terapeutică pentru a evita astfel de  
condiții. Utilitatea în diagnostic a prezentei invenții se extinde prin metodele aplicate la măsurarea  
prezentei modelatorilor în probele celulare sau extractele biologice (sau probe) prelevate de la subiecții  
testați, astfel acizii nucleici (ADN genic sau ARN) și (sau) nivelele de proteine în aceste probe de testare  
ar putea fi stabilite. Predispoziția sporită a subiectului pentru a inhiba obezitatea, de aceea medicul care  
25 observă aceste rezultate la subiectul obez, ar putea stabili că un alt factor decât disfuncția cu referire la  
prezența și activitatea nucleotidelor prezentei invenții, este cauza acestei condiții de obezitate. Spre  
deosebire de aceasta, nivelul scăzut ale nucleotidei și (sau) proteinei exprimate ar putea sugera că astfel  
de niveluri pot fi create pentru tratarea acestei condiții de obezitate și că un regim terapeutic  
corespunzător ar putea fi implementat.

30 În continuare, nucleotidelor descoperite și prezentate în fig. 1A ... E și 2A și B reprezintă cADN, așa  
cum s-a menționat mai sus, se aplică la măsurarea ARN corespunzător. De asemenea, proteina  
recombinată ca material corespunzător polipeptidelor din fig. 1A ... E și 3 poate fi depistată și marcată  
acceptabil pentru utilizare, bunăoară în radioimunoanalize, pentru a măsura grăsimea și (sau) nivelul de  
35 plasmă al proteinei OB, sau pentru a detecta prezența și nivelul receptorului pentru OB în țesuturi, cum ar  
fi hipotalamusul. Mai mult decât atât, prezenta invenție examinează nu numai identificarea nucleotidelor  
și proteinelor corespunzătoare, prezentate astfel în context, polipeptidele din fig. 1A ... E, 3,5 și (sau) 6 ar  
putea fi preparate și utilizate pentru screeningul de exprimare a unei colecții corespunzătoare, pentru  
izolarea receptorilor activi. Receptorul ar putea fi apoi clonat; numai receptorul sau în conjuncție cu  
40 liantul ar putea fi utilizat pentru screeningul moleculelor mici care posedă o activitate asemănătoare  
modelatorilor prezentei invenții.

Pe lângă aceasta, prezenta invenție se referă la compoziții farmaceutice care includ anumiți  
modelatori, de obicei polipeptide ale căror secvențe sunt prezentate în SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4,  
SEQ ID NO:5 și SEQ ID NO:6, anticorpii acestora corespunzători neantagoniștilor sau antagoniștilor cu  
45 molecule mici, sau fragmentele preparate în formule pentru o varietate de moduri de administrare, acolo  
unde o astfel de terapie este acceptabilă. Astfel de formule pot include purtători farmaceutic acceptabili  
sau alți adjuvanți în măsura necesității, care ar putea fi preparați în intervale de dozare eficiente  
determinate de clinician sau de medic în fiecare caz. Prin urmare, unul dintre obiectele principale ale  
prezentei invenții prevede modelatori ai greutateii corporale în formă purificată, care prezintă anumite  
50 caracteristici și activități asociate cu controlarea și varianta adipozității și conținutului de grăsime la  
mamifere.

Un alt obiectiv al prezentei invenții prevede metodele de detectare și măsurare a modelatorilor pentru  
controlarea greutateii, ca mijloc de diagnoză eficientă și monitorizare a condițiilor patologice în care  
variantea nivelului acestor modelatori este sau poate fi o trăsătură caracteristică. Un alt obiectiv al prezentei  
invenții prevede o metodă și un sistem de analiză asociat pentru screeningul substanțelor, cum ar fi  
55 medicamentele, agenții și altele, care sunt potențial eficienți pentru mimarea sau inhibarea activității  
modelatorilor prezentei invenții la mamifere.

Încă un obiectiv al prezentei invenții se referă la o metodă pentru tratamentul mamiferelor, pentru  
controlarea greutateii corp și a conținutului de grăsime la mamifere și (sau) pentru tratarea anumitor stări  
patologice de scădere sau creștere anormală a greutateii corporale, ca o trăsătură caracteristică.

60 Următorul obiectiv al prezentei invenții este de a prepara elemente genetice pentru utilizare în  
protocoalele terapeutice genetice și (sau) în compoziții farmaceutice pentru metode terapeutice

## MD 2311 G2 2003.11.30

9

comparabile, care cuprind sau au la bază unul sau mai mulți modelatori, parteneri de legătură sau agenți de legătură care pot controla producția acestora, pot mima sau antagoniza activitățile lor.

Invenția se explică prin desenele din fig. 1, care reprezintă:

5 - fig. 1 (A ... E), secvența de acid nucleic (SEQ ID NO:1) și secvența dedusă de aminoacid (SEQ ID NO:2) derivată pentru murine OB cADN. Perechea de bază 39, 5' este urmată de un sistem în citire deschisă, atestat pentru 167 de aminoacizi și o secvență necodificată de circa 3,7 kb 3'. (În aplicația înregistrată mai sus, seria NO:08/347, 563 la 30 noiembrie 1994 și seria NO:08/438, 431, înregistrată la 10 mai 1995, s-a determinat suplimentar o secvență necodificată adițională 5' cu 58 perechi de bază, ca produs artificial de clonare. Acest produs artificial care nu aparține unei zone de codificare este format din 39 perechi de bază, iar zona necodificată 5' este schițată în fig. 1, sau zona necodificată 3' a genei.)  
10 Sunt prezentate circa 2500 perechi de bază pentru secvența 3' necodificată. Analiza secvenței de proteină prin observarea și utilizarea programului pe computer Sig.Seq indică prezența unei secvențe semnal (subliniată). Microheterogeneitatea cADN a fost menționată ca fiind de circa 70% din cADN, având un codon de glutamină la codonul 49, iar celelalte 30% nu prezintă acest codon (vezi fig. 5 și 6, infra).  
15 Aminoacidul subliniat reprezintă codonul de arginină care este C57BL/6J ob/ob mutații la șoareci (șoareci IJ);

- fig. 2 (A și B), secvența de acid nucleic (SEQ ID NO:3) derivată pentru OB cADN uman. Nucleotidele sunt numerotate de la 1 la 701 cu porțiunea de start la nucleotida 46 și o terminație la nucleotida 550;

20 - fig. 3, secvența complet dedusă de aminoacizi (SEQ ID NO:4) derivată din gena umană OB, corespunzător secvenței de acid nucleic din fig. 2A și B. Aminoacizii sunt numerotați de la 1 la 167. O secvență semnal cu porțiunea de cleavaj este localizată după aminoacidul 21 (Ala), astfel ca proteina matură să se extindă de la aminoacidul 22 (Val) până la aminoacidul 167 (Cys);

25 - fig. 4, comparația între secvențele de aminoacizi deduse murinice (SEQ ID NO:2) și umane (SEQ ID NO:4). Secvența de OB umană, având secvența dedusă de aminoacizi, a fost superior omoloagă celei de la șoareci. Modificările conservative sunt menționate printr-o linie și modificările neconservative sunt menționate prin asterisc. Codonul de glutamină variabil este subliniat tot așa cum este în poziția mutației nonsens în C57BL/6Job/ob (IJ) la șoareci. În fond, există o identitatea de 83% la nivelul de aminoacizi, , așadar, numai opt substituții au fost depistate între valină la codonul 22 (imediat sub linia de desfășurare a secvenței semnal mature) și cisteina în poziția 117;

30 - fig. 5, o secvență de aminoacizi cu lungimea completă (SEQ ID NO:5) derivată pentru gena OB la murine, așa cum se reprezintă în fig. 3, dar glutamina este absentă în poziția 49. Aminoacizii sunt numerotați de la 1 la 166. O secvență semnal în porțiunea de cleavaj este localizată după aminoacidul 21 (Ala) sus de anularea glutaminei 49, astfel ca proteina matură să se extindă de la aminoacidul 22 (Val) la aminoacidul 166 (Cys);

35 - fig. 6, o secvență de aminoacizi complet dedusă (SEQ ID NO:6) derivată de la gena OB umană, așa cum se atestă în fig. 4, dar glutamina este absentă în poziția 49. Aminoacizii sunt numerotați de la 1 la 166. O secvență semnal în porțiunea de cleavaj este localizat[ după aminoacidul 21 (Ala) (sus de anularea glutaminei 49), astfel ca proteina matură să se extindă de la aminoacidul 22 (Val) la aminoacidul 166 (Cys);

40 - fig. 7, desenul fizic al locației ob în cromozomul de murine și schițele de clonare YAC și P1. "M și N" corespund la părțile de restricție Mul I și Not I. Numerele corespund la animalele individuale, care sunt recombinante în zona ob a 1606 meioses, așa cum s-a însemnat. Met, Pax 4, D6Rck39, D6Rck13 și Cpa se referă la localizarea în regiunea ob care se referă de probele de ADN. YACs au fost izolate aplicând ca probe D6Rck13 și Pax-4 și terminațiile au fost redobândite, aplicând vectorul PCR și (sau) terminația plasmidei de eliberare și utilizare în locul izolării noului YACs (B). A rezultat Contigul YAC. Unul dintre probele utilizate la genotipul recombinat la animale, este indicat în paranteze: (6) corespunde la YAC 107; (5) corespunde la M16 (+) (sau M16 (pLUS)); (4) corespunde la adu (+); (3) corespunde la aad (pICL); (2) corespunde la 53 (pICL) și (1) corespunde la 53 (+). (C) Contigul P1 al clonilor P1 bacteriofage sunt izolate cu probele terminațiilor selectate de YAC. Gena ob este izolată în clona P1 izolată aplicând terminația distală a YAC YB6S2F12 (terminația (4)) (denumită alternativ aici, adu (+));

45 - fig. 8 prezintă o fotografie a petei de bromură de etidium al aminoacidului 192 izolat în dependență prin patru experimente de captură a exonului, amplificate și caracterizate de PCR;

50 - fig. 9 prezintă o fotografie a petei de bromură de etidium a clonilor amplificate de PCR, suspectate de a purta ob. Fiecare din cele 7 clone care nu poartă un artificiu, a fost reamplificată aplicând PCR și electroforizată pe gel de agaroză 1% în TBE și colorată cu bromură de etidium. Dimensiunea marcherilor (rămăși în zona nenumerotată) este corespunzătoare din punct de vedere comercial "1 kB scară". Zona 1 - clona ID12, conținând "secvența HIV". Zona 2 - clona 1F1, o clonă nouă în afara zonei ob. Zona 3 - clona 1H3. Zona 4 - clona 2B2, care este identică cu 1F1. Zona 5 - clona 2G7, care conține exonul ob. Zona 6 - clona 2G11, care este identică cu 1F1. Zona 7 - clona 2H1, care nu conține un insert.

## MD 2311 G2 2003.11.30

10

Figura 10 prezintă secvența (SEQ ID NO:7) a clonei 2G7, care include un exon ce codifică parțial gene OB. Secvențele primer utilizate pentru amplificarea acestui exon sunt indicate în fig. (SEQ ID NO: 8 și 9).

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

15 Fig. 12(A). Pata de bromură de etidium din reacția RT-PCR asupra celulelor grase (țesut adipos alb) ARN din fiecare tulpină de șoarece este menționată în tabel. ARN total (100 ng) pentru fiecare probă, se transcrie revers, aplicând oligoproteinele dT și transcriptaza reversă, și sADN simplu răsucit care rezultă, astfel, este amplificat cu PCR, cu primerii 2G7 (benzile inferioare) sau actin primerii (benzile superioare). Atât primerii 2G7, cât și actin primerii sunt incluși în aceeași reacție PCR. Produsele se realizează pe gel de agaroză 1% TBE (B), analiza Western corespund la (A). 10 μg de ARN din celulele grase (țesutul adipos alb) din fiecare tulpină de șoarece, așa cum s-a indicat, se prelucrează și se experimentează cu proba 2G7 marcată, PCR, așa cum este redat în fig. 11 B. O creștere de circa 20 de ori a nivelului de mARN 2G7, apare în cazul ARN din țesutul gras, alb, de la specia (IJ) C57BL/6J ob/ob, referitor la perechea de animale slabe. În ambele experimente prin RT-PCR și Western, n-a existat nici un semnal detectabil în ARN 2G7, de la specia de șoareci SM/Ckc-<sup>Dac</sup>ob<sup>2J</sup>/ob<sup>2J</sup> (2J), chiar după 2 săptămâni de la expunere. Se prezintă autoradiografia după 24 de ore. Se aplică același filtru pentru hibridizare la proba de actină (partea inferioară a tabelului).

20 Figura 13 reprezintă analiza Worthern la animalele adiționale 2J și la animalelor martor, care confirmă absența mARN ob, la animalele 2J. Analiza Western este realizată la fel ca în fig. 11 și 12. În acest caz, ARN martor este ap2, în transcripția specifică celulelor grase. Nu există nici o semnificație privind varianta de densitate la benzile ap2.

25 În fig. 14 se compară secvența ADN a C57BL/6J (normal) și C57BL/6J ob/ob (IJ) la șoareci, în zona punctului de mutație, care duce la introducerea codonului de stopare prematură (mutație nonsens), în tulpina mutantului cADN. Secvența ob/ob la șoareci, are o mutație C→T care modifică un reziduu de arginină în poziția 105. Această modificare de bază este arătată ca o informație de la ordonatorul automat al ADN. RT-PCR se realizează aplicând RN din țesutul alb gras de la ambele tulpini (+/+ și ob/ob) și primerii din zonele 5' și 3' necodificate. Produsele de reacție PCR sunt purificate pe gel și secvenționate manual, direct, aplicând ordonatorul automat 373A, Applied Biosystems, Inc, cu primerii de-a lungul ambelor filamente ale secvenței codificate.

40 Fig. 15(A) reprezintă pata de aprobție a ADN genic, de la fiecare tulpină de șoarece din tabel. Circa 5 μg ADN (derivat al ADN genic preparat din ficat, rinichi sau splină) se digeră cu restricție enzimatică conform indicației. ADN se supune electroforezei pe gel de agaroză 1% TBE și se probează cu PCR marcat 2G7. Digestia enzimatică atestă, aplicând Bg/II, o creștere a dimensiunii tratamentului de circa 9 kB (cel mai mare) Bg/II, în SM/Ckc-<sup>Dac</sup>ob<sup>2J</sup>/ob<sup>2J</sup> (2J) ADN. RELPs nu este detectabil, cu nici o altă enzimă de restricție. Prin cartarea restricției preliminară a ADN genic se atestă că porțiunea limorfică Bg/II este de circa 7 kB în partea superioară a porțiunii de start a transcrierii. Nici una din celelalte enzime testate n-a avut o extindere precedentă în porțiunea de start a mARN. (B) Segregarea polimorfismului BG/II în tulpina SM/Ckc-<sup>Dac</sup>ob<sup>2J</sup>/ob<sup>2J</sup>. Un număr de 6 descendenți obezi și 5 descendenți slabi din aceeași generație a coloniei coisogenice SM/Ckc-<sup>Dac</sup>ob<sup>2J</sup>/ob<sup>2J</sup> (2J) au fost genodeterminați ca grupă sanguină, prin marcarea polimorfismului Bg/II, așa cum este arătat la (A). Toate fenotipurile de animale obeze sunt omozigote pentru alelele mai mari ale fragmentului polimorf BG/II. ADN în zona de "control" se prepară din țesut nerelevant de șoarece SM/Ckc-<sup>Dac</sup>+/+, pe soiuri separate, din colonia SM/Ckc-<sup>Dac</sup>ob<sup>2J</sup>/ob<sup>2J</sup>.

50 Fig. 16 reprezintă o pată de absorbție ADN genic digerat EcoRI, din speciile prezentate conform tabelului, aplicând OB cADN ca probă (bunăoară, pata zoo). Semnalele de hibridizare sunt detectabile în fiecare dintre probele de vertebrate, chiar după o hibridizare stringent moderată.

55 Acidul dezoxiribonucleic ADN, provenit în acest experiment de la pisică, a fost ușor degradat. ADN de restricție este experimentat pe gel de agaroză 1% TBE și transferat pe o membrană imobilon pentru experimentare. Filtrul este hibridizat la 65°C și spălat în SSC/ 0,2% SDS, de două ori, la temperatura de 60 65°C, apoi de două ori timp de 20 min, apoi se expune timp de 3 zile, aplicând filmul Kodak X-OMAT (Rochester, N.Y.).

## MD 2311 G2 2003.11.30

11

Fig. 17 reprezintă zonă de exprimare a clonării vectorului pET-15 b (Novagen) (SEQ ID NO:11 și 12).

5 Fig. 18 prezintă analiza eluatului de pe coloana de rezine (Ni) de legare la Histidină, pentru fuziunea ob a recombinatului murinic matur la His-tag (A) și fuziunea OB uman matur la His-tag (B). Bacteriile sunt transformate cu vectorii pETM9 și respectiv pETH14. După inducția cu 1 mM IPTG în condiții optime, bacteria transformată este capabilă de a produce 100-300 μg/ml proteină OB de fuziune, în primul rând în părțile de incluziune. Aceste părți de incluziune sunt solubilizate cu 6M guanidină clorhidrică sau cu uree și proteină de fuziune (prezentă în supernatantul de liză) este încărcată pe coloana de rezine (Ni) de legare la Histidină, în 10 mililitri de soluție tampon de legătură, cu uree. Cloana este apoi diluată treptat cu alicotii de 5 mililitri de 20, 60 și 300 μM imidazol și, în final, cu o soluție tampon. Alicoții sunt apoi analizați pentru prezența polipeptidei OB la fuziune pe gelul acrilamidă 15%. Fiecare zonă conține echivalentul a 100 μl de extract bacterian.

15 Fig. 19 (A) reprezintă translația *in vitro* a OB ARN. OB cADN uman subclonat în vectorul pGEM. Se linearizează plasmida și împreună cu fragmentele răsucite de ARN se sintetizează aplicând polimeraza Sp6. ARN sintetizat *in vitro* este codificat în prezența sau absența membranelor microzomale pancreatice de la canine. Un produs codificat primar de circa 18 kD a fost observat după codificarea *in vitro*.

20 Adiția membranelor microzomale la reacție determină apariția celui al doilea produs de codificare, mai subțire cu circa 2kD relativ cu produșii primar codificat. Dimensiunea produsului de translație a interleucinei-1 afla ARN, la care secvența de semnal codificată este absentă, este nemodificată prin adiția membranelor microzomale. Aceste date atestă că este prezentă secvența de semnal funcțională. (B) Codificarea *in vitro*, în prezența sau în absența proteinazei K. Tratamentul cu protează are ca rezultat proteoliza completă a produsului primar codificat 18kD, în timp ce forma prelucrată 16 kD este nemodificată. Permeabilizarea microzomului cu 0,1% TRITON-X100 redă forma prelucrată de protează sensibilă. Aceste rezultate indică faptul că produșii este codificat în tulpina microzomului.

25 Fig. 20 (A...E) prezintă secvența genei umane OB (SEQ ID NO:22 și 24); (F) - o diagramă schematică a genei murinice OB; (G) - diagramă schematică a genei umane OB. În ambele cazuri (F) și (G), startul și stopul codoanelor este subliniat. Nu există nici o evidență a primului intron omolog, la șoarece și a celui uman, în gena umană, dar existența acestuia nu poate fi exclusă.

30 Fig. 21 prezintă un desen schematic al unei strategii de clonare utilizată pentru a se obține exprimarea recombinată a OB la drojdia *Pichia*. (A) - vectorul de exprimare al OB cu o secvență semnal a factorului afla de conjugare; (B) - desenele schematică ale structurii proteinei de fuziune recombinată, incluzând secvența de aminoacid (SEQ ID NO:26), care atestă porțiunea XhoI și porțiunile de clevej putative KEX-2 și STE-13 și surplusul de aminoacizi N-terminali prezent după clivajul KEX-2 (SEQ ID NO:27); (C). Strategia alternativă pentru producerea OB mature, cuprinde prepararea unui element cu o secvență de aminoacid corespunzător la porțiunea de clevej XhoI și la porțiunea de clevej KEX-2 imediat superioară secvenței polipeptidei mature (SEQ ID NO:28).

35 Fig. 22 reprezintă strategia de exprimare alternativă la *Pichia*. (A) - vectorul de exprimare al OB de fuziune cu His-tag adoptat din sistemul de exprimare pET sub controlarea secvenței de semnal prin factorul de conjugare alfa (SEQ ID NO:33); (B) - desenele schematică ale structurii proteinei de fuziune recombinată OB conținând His-tag, care includ secvența semnal a factorului de conjugare alfa, porțiunile de clevej putative KEX-2 și STE-13, His-tag și porțiunea de clevej a trombinei, care ar putea produce polipeptida OB, cu trei reziduuri de aminoacizi N-terminal, surplus.

40 Fig. 23 (A) - analiza PAGE de exprimare a murinelor OB (atât formulele microheterogene, bunăoară cele care conțin Gln 49 și cele la care Gln 49 este absentă) la drojdia *Pichia* transformată. Banda de circa 16 kD este vizibilă în fluidul de cultură a drojdiei transformate (zonele doi și trei), dar nu și în cultura fluidă de la drojdia netransformată (prima zonă); (B) - analiza PAGE a polipeptidei OB recombinată parțial purificată pe carboximetil celuloză, cu un slab schimb de cationi, O bandă de circa 16 kD este clar vizibilă în fracțiunile 3 și 4 din coloană, eluarea acestei coloane fiind efectuată cu 250 mM de NaCl. Zona 1 - simpla încărcare; zona 2 - trecerea materialului pe coloană; zonele 3-5 - fracțiunile diluate cu 250 mM NaCl.

45 Fig. 24 atestă că proteina OB circulă în plasma de șoarece. (A) - imunoprecipitări ale sângelui de șoareci. Se aplică 0,5 ml de plasmă de șoarece care este prelucrată cu sefaroză neconjugată și incubată peste noapte cu anticorpi imunopurificați anti-OB, conjugați cu perle 4B de sefaroză. Imunoprecipitatul este apoi separat pe gel SDS-PAGE 15%, transferat și aspirat în sistemul Western cu anticorpii anti-OB. Proteina cu o greutate moleculară de circa 16 kD migrează în aceeași poziție ca și proteina matură de șoarece ob, exprimată în drojdie. Proteina este absentă în plasmă și șoarecele C57BL/6J și crește de 10 ori în plasmă la șoarecele C57BLB/Ks, raportat la șoarecele de tip sălbatic; db la șoarecele a indicat o supraproducție de proteină OB, secundară rezistenței la efectele acesteia; (B) - nivelurile crescute de OB la șobolanii grași. Șobolanul gras este obez ca rezultat al mutației recesive pe șobolan, cromozomul 5. 50 Datele genetice demonstrează un defect în aceeași genă de mutație la șoarecele db. Plasma de la șobolanii grași și perechile slabe ale acestora este imunoprecipitată și se analizează prin absorbția Western. O

## MD 2311 G2 2003.11.30

12

creștere de 20 de ori mai mare în nivelul de circulație al OB este observat la animalele mutante; (C) - cantitatea de proteină OB în plasma de șoarece. Cantitățile crescute de proteină recombinată la șoareci se adaugă la 100  $\lambda$  plasmă de șoareci ob și apoi aceasta este imunoprecipitată. Intensitatea semnalului măsurată prin absorbție Western, este comparată cu cea de la 100 $\lambda$  plasmă de la șoarecele de tip sălbatec.

5 O creștere liniară în intensitatea de semnal a fost înregistrată pentru cantități crescute de proteină recombinată, ceea ce demonstrează că imunoprecipitățile sunt realizate în condițiile excesului de anticorpi. Semnale similare au fost observate în proba de plasmă și în proba cu 2 ng proteină recombinată, indicând nivelul de circulație în plasma de șoarece care este de circa 20 ng /ml; (D) - proteina OB în

10 extracțele de țesut adipos. Extracțele citoplasmice din țesutul adipos de șoarece se prepară din db și tipul de șoarece sălbatec. Analiza de absorbție Western atestă niveluri crescute de proteină 16 kD în extracțele preparate de la șoarecele db.

Fig. 25 atestă că proteina OB circulă la niveluri variabile în plasma umană. Probele de plasmă sunt obținute de la șase voluntari labi. Imunoprecipitarea și analiza de absorbție Western atestă prezența

15 proteinei umane imunoreactive 16 kD, identică ca dimensiune cu proteina umană recombinată având 146 aminoacizi, exprimată prin drojdie. Niveluri variabile de proteine au fost observate în fiecare din cele șase probe; (B) - analiza ELISA (imunoanaliza legată de enzime) pentru ob umană. Plăcile microtitrate sunt acoperite cu anticorpi OB antiumani imunopurificați. Se adaugă apoi cantități cunoscute de proteină recombinată pe aceste plăci și se efectuează detectarea aplicând anticorpi anti-ob biotinilați, imunopurificați. Absorbanta la 414 nm este înregistrată relativ cu concentratele cunoscute de OB, pentru

20 a se obține curba standard. Curba standard atestă că analiza este capabilă de detectarea a 1 ng/ml sau mai mult din proteina OB umană; (C) - cantitatea de proteină OB în plasma umană. Imunoanaliza ELISA este efectuată aplicând 100  $\lambda$  de plasmă de la șase voluntari slabi și standardele utilizate sunt prezentate în tabelul B. Nivelurile proteinei OB de ordinul a 2 ng/ml în HP1 ... 15 ng/ml în HP6 au fost astfel observate. Aceste date sunt corelate cu analiza de absorbție Western, datele fiind prezentate în tabelul A.

Fig. 26 atestă că proteina OB formează legături disulfurice intermoleculare și intramoleculare. (A) -

25 analizele de absorbție Western în condiții de reducere și fără reducere. Analiza de absorbție Western a plasmei umane și de șoarece se repetă la proba tampon cu și fără adăugare de agenți de reducere. Când se omite beta-mercaptoetanolul din proba tampon, imunoprecipitatele din plasma db migrează odată cu apariția masei moleculare 16 kD și 32 kD. Adăugarea de beta-mercaptoetanol, la proba tampon, duce la dispariția jumătății 32 kD (vezi fig. 24). Acest rezultat este recapitulat când proteina de șoarece este exprimată în drojdie, *Pichia pastoris*. În acest caz, proteina OB de șoarece migrează spre poziția

30 dimerului.

În condiții de reducere, proteina de șoarece recombinată, purificată, migrează cu apariția greutateii

35 moleculare de 16 kD, indicând că forma moleculară 32 kD este rezultatul a una sau două legături bisulfurice intermoleculare. Proteina umană exprimată *in vivo* și în *Pichia pastoris*, migrează cu masa moleculară de 16 kD atât în condiții de reducere, cât și fără reducere (datele nu sunt prezentate); (B) - proteina umană exprimată în drojdie conține legătura bisulfurică intramoleculară. Proteinele secrete în fond cuprind conformația corectă, atunci când se exprimă în sistemul de exprimare *Pichia pastoris*. Proteina umană matură cu 146 de aminoacizi este exprimată în *Pichia pastoris* și purificată din mediul de

40 drojdie în două faze, procesul cuprinzând IMAC filtrarea gelului. Proteina recombinată purificată este supusă spectrometriei de masă sus și după clivajul bromurii de cianogen. Clivajul bromurii de cianogen are loc la gruparea carboxiterminală a rezidului de metionină. Masa moleculară a proteinei recombinat din drojdie este de 16,024 $\pm$ 3 Da (masa moleculară calculată = 16,024 Da). Clivajul bromurii de cianogen se produce după trei grupări metionină în secvența proteinei la aminoacizii 75, 89 și 157. Fragmentul de bromură de cianogen cu masa de 8435,6 Da corespunde aminoacizilor 90...157 și 158...167, care sunt legați prin legături cis-117 și cis-167 (calculat ca masă moleculară = 8434,5 Da) N.D. = nedetectat.

Fig. 27 reprezintă prepararea proteinei recombinat bioactive. Secvența de nucleotidă corespunzătoare

45 proteinei OB mature de șoarece, având 145 de aminoacizi, este clonată în vectorul de exprimare pET 15b. Acest vector pET determină inserția liniei polihistidinei la partea superioară (His-tag) a secvenței clonate, care permite o purificare eficientă aplicând analiza IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography. Proteina recombinată bacteriană este inițial distribuită în fracțiunea membranei insolubile, după liza bacteriană. Fracțiunea de membrană este solubilizată aplicând clor hidrat de cuanidium și apoi este încărcată pe coloana IMAC. Proteina este diluată de trei ori și tratată cu trombină pentru a se îndepărta

50 porțiunea His-tag, așa cum se va descrie în continuare. Randamentul final al proteinei solubile este de 45 ng/ml din cultura bacteriană.

Fig. 28 atestă efectele biologice ale proteinei OB, timpul de ingerare a hranei (tabelele A-C) și greutatea

55 corporală (tabelele D-F). Grupe de câte 10 animale au primit zilnic injecții intraperitoneale cu proteine OB la o doză de 5 mg/kg/zi (substanță în pătrate, injecții cu PBS (substanță solidă în cercuri) sau nici un tratament (substanță solidă triunghiulară). Grupele de tratament includ șoareci C57B1/6J ob/ob (tabelele A și D), C57B1/Ks db/db (tabelele B și E) și CBA/J ++ (tabelele C și F). Hrana consumată de șoareci este măsurată zilnic și greutatea corporală este înregistrată la intervale de trei ... patru zile (Scala greutateii

60

## MD 2311 G2 2003.11.30

13

corporale în grame este diferită pentru șoarecii de tip sălbatec vs. ob și db). Hrana integrată de șoarecii ob care primesc proteine este redusă după prima injecție și stabilizată după a patra zi la un nivel de circa 40% din cea înregistrată în grupa injectată fals ( $p < .001$ ). Greutatea corporală a acestor animale descrește în medie cu 1,3 g/zi și se stabilizează după trei săptămâni, la un nivel de circa 60% din greutatea inițială (5 ( $p < .001$ )). Nu s-a demonstrat nici un efect al proteinei db la șoareci. Efecte slabe, dar semnificative asupra greutateii corporale, sunt observate la șoarecii CBA/J, la două puncte timpurii ( $p < .02$ ). Eroarea standard a fiecărei măsurători este prezentată printr-o bară, iar semnificația statistică a acestor rezultate este prezentată în tabelul 1.

Fig. 29 atestă rezultatele la pereche de șoareci ob nutriți. (A) - grupa A de patru șoareci C57B1/6J ob/ob este hrănită cu o cantitate de hrană egală cu cea consumată de o grupă de șoareci ob care primesc proteina recombinată. Pierderea în greutate pentru ambele grupe este calculată după cinci zile, după opt zile și după douăsprezece zile. Grupa de șoareci ce au restricție de hrană, pierd mai puțin în greutate (linia hașurată) decât șoarecii ob care au primit proteină (linia solidă) ( $p < .02$ ). Acest rezultat atestă că efectul proteinei OB asupra reducerii greutateii este hrana ingerată și energia consumată; (B) - determinat de fotografia șoarecilor tratați ob. Sunt prezentați doi șoareci obezi C57B1/6J ob/ob. Șoarecele din stânga a primit PBS și cântărește 65 g, aceasta fiind greutatea lui inițială. Șoarecele din dreapta a primit zilnic injecții cu proteină OB recombinată. Greutatea inițială a acestui animal a fost de 65 g; greutatea după trei săptămâni de tratament cu proteină a fost de 38 g; (C) - ficatul șoarecelui tratat și al celui netratat C57B1/6J ob/ob. Ficatul șoarecelui care a primit PBS este voluminos; gras și cântărește 5,04 g. Ficatul șoarecelui care a primit proteină ob recombinată are un aspect normal și greutatea de 2,23 g.

Fig. 30 prezintă hibridizarea *in situ* a țesutului adipos ob. ARN ob de sens și contrasens este marcat *in vitro* aplicând polimeraza Sp6 și T7 și digoxigenina. ARN marcat este hibridizat în secțiunile de țesut adipos scufundate în parafină, din partea epididimală a labei grase de șoarece de opt săptămâni C57B1/Ks (tipul sălbatec marcat) și de la șoarecele C57B1/Ks db/db (marcat db). În aceasta figură, picăturile de lipide apar ca vacuole necolorate în celule. Citoplasma este o margine subțire la periferia celulelor și nu se poate deosebi de membrana celulară. Hibridizarea la toate formațiunile de adipocite în acest domeniu a fost detectată în secțiunile de tip sălbatec aplicând numai proba contrasens și nivelurile mult crescute, au fost observate în secțiunile tisulare de la animale db/db.

Fig. 31 prezintă ARN OB care este exprimat în adipocite *in vivo* și *in vitro*. ARN total (10 microgram) din diferite surse se supuse electroforeză pe proba ob hibridizată și absorbită. În primul rând, diferențele dintre flotabilitatea celulară după digestia colagenazei se aplică pentru purificarea adipocitelor. ARN OB este prezent numai fracțiunea dipocitelor. Zona S indică fracțiunea stromovasculară și A indică fracțiunea adipocitelor. Pe lângă aceasta, ARN OB nu este exprimat în zona celulară U preadipocitară 3T3-422, nediferențială. Adipocitele diferențiate din aceste linii celulare exprimă clar nivelurile detectabile de OB mRNA (zona D).

Fig. 32 atestă că OB ARN este exprimat în toate depozitele tisulare adipoase. Toate depozitele tisulare adipoase testate au fost exprimate ca ARN ob. Grăsimea inghinală a labei exprimă oarecum niveluri scăzute de ARN; , așadar, există o variabilitate de nivel al semnalelor în diferite experimente (fig. 31A). Zona epididimală (1), inghinală (2), abdominală (3), parametrială (4), din partea grasă a labei. Grăsimea cafenie este exprimată de asemenea la un nivel scăzut de OB ARN (fig. 31B). Nivelul OB, exprimat în grăsimea cafenie, este nemodificat la animalele care trăiesc la temperatura de 4°C timp de o săptămână, în timp ce abundența de grăsime cafenie specifică UCP ARN, care se știe că poate fi inductibilă la rece, poate crește de 5 ori.

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

Fig. 34 reprezintă analiza de absorbție Northern la ARN uman. Aceste pete conțin 10 mg din ARN total din țesutul adipos uman (FAT, tabelul A) și 2 mg de poli A + ARN din țesuturile umane (tabelul B) hibridizate la probele umane ob sau umane cu beta-actină. Un semnal intens la circa 4,5 kb este observat cu ARN total din țesutul adipos. Hibridizarea la poli A + ARN atestă semnale detectabile în inimă (HE) și placentă (PL), iar în creier (BR), plămâni (LU), ficat (LI), musculatura scheletică (SM), rinichi (KI) și pancreas (PA) ARN OB n-a fost detectat. În fiecare caz, durata expunerii autoradiografice este indicată. Geneza benzilor moleculare inferioare observate în placentă (bunăoară ARN cu îmbinare alternantă, de degradare ARN) nu este aplicată deja.

Fig. 35 reprezintă YAC contig, conținând gena OB umană și 8 marcheri microsatețiți. Se prezintă schița care conține STS cu YAC de bază, în zona cromozomului 7, care conține gena OB umană, așa cum s-a demonstrat prin SEGMAP/versiunea 3,29 (Green et al. PCR Methods Applic. 1: 77-90 (1991)). Cele 19

## MD 2311 G2 2003.11.30

14

STSs unice sunt ordonate în tabelul 3, în partea superioară a acestuia. Cele 8 STSs microsatelite specifice sunt indicate cu asterisc în tab. 4. Sunt indicate de asemenea STSs corespunzător genelor Pax4 și OB, ca și pozițiile prezentate ale centromerelor (CEN) și 7q telomerelor (TEL) referitoare la contig. Fiecare dintre clonele 43 YAC sunt menționate prin linia orizontală, cu denumirea dată la stânga și partea YAC, estimată (în kb, măsurată prin gel electroforeză cu impulsuri) care se indică în paranteze. Prezența unui STS în YAC este indicată printr-un cerc întunecat la o poziție acceptabilă. Când STS corespunde cu terminația inserției, YAC de la acesta este derivat. Pentru 5 YACs, la partea inferioară (sub linia orizontală) 1 sau mai mulți STS(s) așteptate a fi prezente (bazate pe ordinul STS stabilit), n-au fost detectate (așa cum se evaluează prin testarea YACs individuale cu STS specifice corespunzătoare analizei PCR, în număr de cel puțin două) și acestea sunt prezentate ca cercuri deschise la pozițiile corespunzătoare. Majoritatea YACs sunt izolate dintr-un hibrid hamster-uman cu colecția de celule (Green et al. Genomics, 25: 170 -183 (1995)), cu denumirile lor originale, așa cum este indicat. YACs care rămân sunt izolate din colecțiile genice umane totale și localizarea colecției originale este prevăzută în tabelul 3. Boxele sunt plasate în jurul denumirii a 3 YACs (yWSS691, yWSS999 și yWSS2935) care au fost depistate prin analiza FISH, în desen, la 7q31,3. Contigui este dislocat în forma sa "necalculată", în care dimensiunile YAC nu sunt utilizate pentru a estima suprapunerea clonilor sau spațierea STS, astfel toate STSs sunt spațiate echidistant, în forma "calculată", în care dimensiunea YAC se aplică pentru estimarea distanței relative, separând fiecare pereche adiacentă STSs ca și extinderea suprapunerii de clone, totalul YAC contig pare să cuprindă chiar peste 2Mb.

Prezența invenției se referă la elucidarea și găsirea unei proteine denumită ca polipeptidă ob sau leptină, acizii nucleici cuprinzând proteine, inclusiv variantele degenerate ale acestora, bunăoară a cele care încorporează codoanele optime pentru exprimarea, în special, a sistemului de exprimare, proteină care demonstrează abilitatea de a participa la controlarea greutateii corporale a mamiferelor.

Acizii nucleici ca obiect al invenției, reprezintă secvențele de codificare care corespund polipeptidei OB umane și murinice, care este destinată să joace un rol critic în reglarea greutateii corporale și adipozității. Datele prezentate aici indică faptul că, producția polipeptidei acidului nucleic, conform prezentei invenției, este secretat de către celulele care îl exprimă și că funcțiile polipeptidei sunt cele de hormon. Datele experimentale adiționale demonstrează că polipeptidă OB este foarte eficientă în tratarea obezității la șoarecii care poartă o mutație a genei ob. Pe lângă aceasta, utilizarea unui bolus cu doze ridicate sau doze moderate continue de polipeptidă OB are efectul de reducere a greutateii corporale la șoarecii normali sau de tip sălbatec.

Mai mult decât atât, exemplele prezentei invenției demonstrează că polipeptida OB, denumită alternativ leptină, circulă în plasma umană, în plasma de șobolani și de șoareci. Leptina este absentă în plasma șoarecilor ob/ob și este prezentă în concentrații mai ridicate de 10 ori în plasma de șoareci db/db, și în concentrații de douăzeci de ori mai mari în plasma de șobolani fa/fa. Pe lângă aceasta, injecțiile zilnice cu leptina recombinată, reduc dramatic masa corporală la șoarecii ob/ob, influențează semnificativ greutatea corporală la șoarecii de tip sălbatec și nu are nici un efect asupra șoarecilor db/db.

Conform unui alt aspect, polipeptida OB de la o specie este biologic activă la altă specie. În special, polipeptida OB umana este activă la șoareci. În aspectul primar, prezente invenție este orientată spre identificarea materialelor care funcționează ca modelatori ai greutateii corporale la mamifere. Invenția se referă în special, la izolarea, purificarea și segmentarea anumitor acizi nucleici care corespund genei OB sau zonei de codificare a acesteia, atât la oameni, cât și la șoareci, de asemenea la polipeptidele corespunzătoare exprimate prin acizi nucleici. Invenție cuprinde găsirea acizilor nucleici, având secvențe de nucleotide menționate în fig. 1A până la E (SEQ ID No. 1) și fig. 2A și B (SEQ ID No. 3) și a variantelor de degenerare, celulele și fragmentele acestora, toate posedând facultatea de a modulara greutatea corporală și adipozității. Corespondența acizilor nucleici cu gena OB, prevede influența lor semnificativă asupra unor asemenea stări cum ar fi obezitatea, ca și altor maladii și disfuncții, în care anomalitățile greutateii corporale sunt factorul contribuitor. Prezența invenției se extinde la proteinele exprimate prin acizii nucleici, conform prezentei invenției și în special la acele proteine prezentate în fig. 1A, până la E (SEQ ID No. 2), fig. 3 (SEQ ID No. 4), fig. 5 (SEQ ID No. 5) și fig. 6 (SEQ ID No. 6) ca și variantele conservate, fragmentele active și moleculele mici, cogniti. Așa cum s-a menționat mai sus, peptidele modulatori ale controlului greutateii corporale sau partenerii lor de legătură, sau alți lianți sau agenți care prezintă o activitate de mimetism sau antagonism cu acestea sau cu martorii după producerea acestora, se pot prepara în compoziții farmaceutice, cu un vehicul acceptabil și la un efect puternic în administrarea prin diferite mijloace la pacientul care are o experiență anormală în fluctuațiile greutateii corporale sau ale adipozității, fie ca o parte a condiției medicale adverse, cum ar fi cancerul sau SIDA, pentru tratamentul lor. O varietate de tehnici de administrare pot fi utilizate, printre care administrarea orală, nazală și alte forme de administrare transmucozală, tehnici parenterale, cum ar fi injecțiile subcutanate, intravenoase și intraperitoneale, cateterizări și altele. Cantitățile medii ale factorilor recognitivi sau subunităților acestora pot varia acestea, în special se vor baza pe recomandările și prescripția medicului calificat sau a specialistului veterinar.

## MD 2311 G2 2003.11.30

15

În conformitate cu cele expuse mai sus, un sistem de analiză pentru screeningul medicamentelor potențial eficiente, care mimează sau antagonizează această activitate de modulare a greutateii corporale, poate fi preparat. Modelatorul greutateii corporale poate fi introdus în sistemul de testare și medicamentul prospectiv, de asemenea poate fi introdus în cultura celulară rezultată, apoi această cultura este examinată pentru observarea vreunei modificări în activitatea celulară, datorate fie unei aditii de medicament exclusiv prospectiv, fie ca urmare a efectului cantităților de modelator al greutateii corporale, adăogate. Așa cum s-a menționat mai sus, clonarea moleculară a genei OB descrisă aici, a condus la identificarea unei clase de materiale care funcționează la nivel molecular, pentru modelarea greutateii corporale la mamifere. Găsirea modelatorilor prezentei invenții, are implicații importante pentru diagnoza și tratamentul tulburărilor nutriționale, incluzând, fără a se limite la acestea, obezitatea, pierderea în greutate asociată cu cancerul și tratamentul maladiilor asociate cu obezitatea, cum ar fi hipertensiunea, bolile de inimă și diabetul de Tipul II. Pe lângă aceasta, există utilizări potențiale în agricultură, pentru produsele genetice, în cazul în care se dorește modelarea greutateii corporale a animalelor domestice. În final, pentru faptul că unul sau mai mulți modelatori ai invenției sunt molecule secretate, aceștia pot fi utilizați biochimic, pentru izolarea receptorilor săi, aplicând tehnologia de clonare-exprimare. Discuția faptului că se continuă cu referințe specifice la gena OB, conduce la aplicabilitatea generală la clasa de modelatori care cuprinde o parte a prezentei invenții și, de aceea trebuie luată o astfel de atitudine și un astfel de aspect de interpretare.

După cum s-a menționat mai sus, activitatea funcțională a polipeptidei OB, poate fi evaluată transgenic. Modelul transgenic la șoarece, poate fi utilizat în acest aspect. Gena ob poate fi utilizată în studiile complementare, aplicând șoarecele transgenic. Vectorii transgenici, incluzând vectorii virali sau clonele cosmide (sau clonele fage) corespunzător poziției genei candidat la tipul sălbatec, poate fi construit aplicând gena ob. Cosmidele pot fi introduse la șoareci, aplicând procedeele publicate (Jaenisch, Science 240:1468-1474 (1988)). Elementele de construcție sunt introduse în ouă fertilizate, derivate de la descendenți rezultați din încrucișarea între descendentul F1 al C57BL/6J ob/ob și X DBA. Aceste încrucișări sunt necesare pentru utilizarea transplantului ovarian C57BL/6J ob/ob, pentru generarea animalelor F1. Șoarecele DBA / 2J se aplică ca tulpină counter, deoarece acesta are o blană colorată, nonagouti, fapt important când se aplică transplantul ovarian. Genotipul în poziția ob a cosmidului animalelor transgenice, poate fi determinat de soiurile de animale cu legături slabe de RFLPs sau microsateliți care flanchează mutația și, care sunt poliformi între tulpinile descendenților. Complimentarea este demonstrată atunci când elementul de construcție special atribuie o obezitate genetică F2 animalului slab (așa cum s-a demonstrat prin analiza RFLP) și nediabetic. În aceste circumstanțe, analiza incluziunii pentru complementare va care a animalul ob/ob sau db/db care poartă transgena, să fie conjugat la transplantul ovarian ob/ob sau db/db. În această încrucișare, toate animalele N2 care nu poartă transgene, vor fi slabe și au concentrații normale de glucoza și insulină în plasmă. Într-un sens genetic, transgena acționează ca un supresor de mutație.

Alternativ, genele GB pot fi testate prin examinarea efectelor lor fenotipice, cand sunt exprimate ca orientare contrasens la animalele de tip sălbatec. În aceasta privință, exprimarea animalelor de tip sălbatec este suprimată și, astfel se ajunge la un fenotip mutant. Forma duplex a ARN-ARN (sens-contrasens) previne manipularea normală a mARN, care are ca rezultat eliminarea parțială sau completă a efectului genei de tip sălbatec. Această tehnică a fost utilizată pentru a inhiba sinteza TK în cultura de țesuturi și de a produce fenotipurile de mutație Kruppel în Drosophila și mutație Shiverer la șoarecele de experiențe (Izant și colab. Cell, 36: 1007-1015 (1984); Green et al. Annu. Rev. Biochem. 55: 569-597 (1986); Katsuki et al. Science, 241: 593-595 (1988)). Un important avantaj al acestei tehnici constă în faptul că numai o porțiune redusă de genă este necesară a fi exprimată pentru inhibarea eficientă a exprimării întregului mARN cognitiv. Transgena contrasens va fi plasată sub controlul propriului promotor sau a altui promotor exprimat în tipul de celule corect, această plasare este la porțiunea superioară a SV40 poli A. Transgenă această va fi utilizată pentru transformarea transgenică la șoarece. Șoarecele transgenic va fi conjugat, așadar, cu transplantul ovarian pentru testarea modului în care heterozigoții ob sunt mai sensitivi la efectele elementelor de construcție contrasens. Pe termen lung, elucidarea funcției biochimice a produsului genei OB (polipeptida QB sau proteina) este aplicată pentru identificarea neantagoniștilor cu molecule mici și a antagoniștilor cu molecule mici care le influențează activitatea.

În continuare, diferiți termeni sunt utilizați în întreaga specificație, având semnificațiile menționate.

Termenul de "modelator al greutateii corporale", "modelator", "modelatori" și orice variante care nu sunt specificați în tabel, pot fi utilizați aici fără a fi schimbați, așa cum se aplică în întreaga specificație și în revendicări, se face referire la ambele nucleotide și la materialul proteic, acesta din urmă incluzand atat proteinele simple, cat și cele multiple. Mai mult decât atât, termenii menționați mai sus, se extind la nucleotide și la acidul dezoxiribonucleic ADN, având secvențele descrise aici și prezentate în fig. 1A ... E (SEQ ID No. 1) și fig. 2A, și B (SEQ ID No. 3), de asemenea, proteinele având secvența de aminoacid conform datelor descrise și prezentate în fig. 1A ... K (SEQ ID No. 2) și fig. 3 (SEQ ID No. 4) sunt studiate în mod asemănător, ca și profilul activității menționate cu referire la toate materialele din

## MD 2311 G2 2003.11.30

16

descriere și din revendicări. În acest sens, nucleotidele care prezintă o activitate substanțial echivalentă sau modificată, sunt în mod asemănător studiate, incluzând analogi omologi, substanțial, și variantele alelice. De asemenea, proteinele prezintă o activitate echivalentă sau modificată substanțial, incluzând proteinele modificate deliberat, bunăoară, prin mutageneza direcționată pe porțiuni sau accidental prin mutații în organismul gazdă pe care le produc modelatorii, sunt de asemenea studiate.

O compoziție cuprinzând "A" (în care "A" este o proteină simplă, o moleculă ADN, un vector, o celulă gazdă recombinată, etc.), este substanțial liberă de "B" (în care "B" cuprinde una sau mai multe proteine de contaminare, molecule ADN, vectori, etc., dar se exclud formele racemice pentru A), cand de circa 75 % din greutatea de proteine, ADN vectori (în dependență de categoria speciei la care aparțin A și B) în compoziția "A". De obicei, "A" cuprinde cel puțin circa 90% de greutate din speciile A + B din compoziție, mult mai preferabil, cel puțin circa 99% din greutate. E preferabilă de asemenea compoziția care este liberă de contaminare, conținând numai o singură specie, de greutate moleculară, având activitatea sau caracteristica speciei ce ne interesează.

Polipeptidele OB.

Termenii de "proteină", care se referă la polipeptide produse natural și cele de "polipeptidă" utilizați aici fără schimbare referitor la producții genetice ob și la variantele lor, termenul de "proteină matură" sau "polipeptidă matură" se referă în speciei la produsul genetic OB cu secvența semnal recuperată (sau un partener proteic de fuziune).

Așa cum s-a menționat mai sus, în întrușipările specifice ale polipeptidelor, conform prezentei invenții, sunt incluse cele care au secvențele de aminoacizi menționate aici, bunăoară SEQ ID No. 2, 4, 5 și 6 etc., incluzând polipeptida ob modificată cu substituțiile de aminoacid conservative, ca și fragmentele biologice active, analogii și derivații acestora. Termenul de "biologic activ" este utilizat aici cu referire la efectul specific al polipeptidei, incluzând, fără a se limita la aceasta, legătura specifică, bunăoară la un receptor, anticorp sau alte molecule recognitive; activarea modului transductor de semnal la nivel molecular și (sau) inducție (sau inhibarea de către antagoniști) a efectelor fiziologice mediate de polipeptida ob nativă, *in vivo*. Polipeptidele OB, incluzând fragmentele, analogii și derivații acestora, pot fi preparate sintetic, aplicând, bunăoară, tehnici bine cunoscute ale fazei solide sau ale fazei de soluție în care se efectuează sinteza peptidică. De obicei, faza sintetică solidă este utilizată în aceste tehnici. Alternativ, polipeptidele OB ale prezentei invenții, pot fi preparate aplicând tehnici de inginerie genetică bine cunoscute, descrise infra. Într-o alta realizare, polipeptida CB poate fi purificată bunăoară prin purificare de imunoafinitate, din fluidul biologic bunăoară, dar nelimitat, plasma, serul, sau urina, de obicei plasma umana, serul sau urina și mult mai preferabil de la un subiect cu o supraexprimare a polipeptidei, bunăoară o persoană obeză suferind de o mutație a receptorului OB sau de obezitate legată de o mutație corespunzătoare persoanelor "grase".

Fragmente de polipeptidă OB.

Prezenta invenție examinează în special fragmentele produse natural ale polipeptidei OB, care pot fi importante. Secvența de peptidă include un număr de porțiuni care sunt frecvent țintă pentru clivajul proteolitic, bunăoară reziduurile de arginină. Este posibil ca polipeptida cu lungime completă să poată fi elevată la una sau mai multe porțiuni, pentru a se forma fragmente active biologice. Astfel de fragmente biologice active, pe fi agonizante sau antagonizante ale activității funcționale a polipeptidei OB pentru reducerea greutatei corporale.

Analogii polipeptidei OB.

Prezenta invenție examinează în special prepararea analogilor peptidici OB, care se caracterizează fiind capabili de o activitate biologică a polipeptidei OB, bunăoară de legarea la un partener de legătură specifică a peptidului, cum ar fi receptorul OB. Într-un aspect anumit, analogul neantagonizează activitatea OB, bunăoară funcțiile similare ale acestuia cu cele ale peptidului ob. De obicei, neantagonistul OB este mult mai eficient decât proteina nativă. Bunăoară, analogul neantagonist OB se poate lega la receptorul OB cu afinitate superioară sau să demonstreze un timp de înjumătățire mai mare *in vivo*, sau ambele. Cu toate acestea, analogii neantagoniști peptidici OB care sunt mai puțin eficienți decât proteina nativă, sunt de asemenea studiați. Într-o altă realizare, analogul antagonizează activitatea OB. Bunăoară, un analog OB care se referă de receptorul OB, dar care nu induce transducția semnalului, poate inhiba competitiv legătura OB nativ la receptor, astfel descrescand activitatea OB *in vivo*. Astfel de analogi antagoniști OB pot să posedă, de asemenea, proprietăți diferite de peptida ob, bunăoară un timp de înjumătățire mai lung (sau mai scurt) *in vivo*, o afinitate de legare mai mare (sau mai mică) pentru receptorul OB sau ambele.

Într-un aspect anumit a prezentei invenții, un analog al peptidului OB este peptida OB modificată prin substituirea aminoacizilor în poziția de pe polipeptidă care nu este esențială ca structură sau ca funcție. Bunăoară, deoarece este cunoscut că peptida OB umană este biologic activă la șoareci, substituirea reziduurilor divergere de aminoacizi în secvența umană, așa cum se compară cu secvența de aminoacid murinic, va produce asemănător, analogi utilizatori ai peptidului OB. Bunăoară, reziduul de serină, în poziția 53 sau în poziția 98, sau în ambele (în secvența peptidului neprelucrate prezentată în fig. 4) de la oameni, poate fi substituie bunăoară, cu glicină, alanină, valină, cistenină, metionină sau treonină. În mod

similar, reziduul de arginină, în poziția 92 (fig. 4), poate fi substituit, bunăoară, cu asparagină, lizina, histidină, glutamină, acid glutamic, acid aspartic, serină, treonină, metionină sau cisteină. Alți aminoacizi din fig. 4 și peptida OB umană care par a fi capabili de substituție, sunt histidina în poziția 118, triptofanul în poziția 121, alanina în poziția 122, acidul glutamic în poziția 126, treonina în poziția 127, leucina în poziția 128, glicina în poziția 132, glicina în poziția 139, triptofanul în poziția 159 și glicina în poziția 166. Într-o altă realizare, este posibil să se substituie unul sau mai multe reziduuri 121 sau 128 (așa cum s-a prezentat în fig. 4), bunăoară cu glicine sau alanine sau substituind unele reziduuri cu excepția serinei în poziția 123, sau leucinei în poziția 125. Într-o altă realizare, un analog al polipeptidei OB, de obicei polipeptida umană OB este o forma redusă a polipeptidei. Bunăoară, s-a demonstrat deja că glutamina din reziduul 49 nu este esențială și poate fi anulată de la peptidă. În mod similar, este posibil de a anula câțiva, sau toți aminoacizii reziduuri, la pozițiile 121 -128. Pe lângă aceasta, invenția examinează obținerea unui analog OB având secvența minimă de aminoacizi necesară pentru activitatea biologică. Aceasta poate fi determinată, bunăoară, prin testarea activității fragmentelor de OB pentru abilitatea de a se lega la anticorpii specifici OB, cu inhibarea activității polipeptidei OB native, sau agonizarea activității peptidei OB native. Într-un aspect anumit, prezenta invenție se referă la polipeptida OB redusă, constând dintr-o structură în lanț formată din legăturile disulfurice care se formează între reziduurile de cisteină 117 și 167 (așa cum este prezentat în fig. 4). În alt aspect, analogul redus corespunde la aminoacizii din reziduul 22 (care urmează porțiunii de cleavaj a peptidei semnal putative) la 53 (reziduul de aminoacid care precede imediat regiunea flexibilă în formă de lanț, detectată cu proteoliza limitată, urmată de analiza spectrometrică de masă a polipeptidei OB; vezi Gohen et al., Proteii Science 4: 1088. (1995). Într-un alt mod, analogul redus corespunde la aminoacizii din reziduul 61 (reziduul care urmează imediat zonei flexibile în formă de lanț, așa cum s-a detectat prin analiza spectroscopică de masă și prin proteoliza limitată a polipeptidei OB) la reziduul de aminoacizi 116 (reziduul care precede imediat, primul reziduu de cisteină). Într-o altă realizare, analogul redus corespunzător aminoacizilor din reziduul 61 la reziduul 167 de aminoacizi.

Mai mult decât atât, unul sau mai multe reziduuri ale zonei în lanț flexibile, putative, numărul 54...60, sunt substituite. Bunăoară, unul sau mai multe reziduuri pot fi substituite cu lizină, acid glutamic sau cisteină (de obicei lizină) pentru legătură încrucișată, bunăoară la un polimer, deoarece structurile flexibile în lanț sunt preferate pentru derivatizarea proteinei. Alternativ, reziduurile la pozițiile flexibile în formă de lanț, pot fi substituite cu reziduuri de aminoacizi care sunt mult mai rezistenți la proteoliză, dar care rețin structura flexibilă, bunăoară una sau mai multe proline. Într-o altă realizare, substituirile cu reziduuri de aminoacizi care pot fi în continuare derivatizate pentru a le face mai rezistente la degradare, bunăoară proteoliza, sunt de asemenea studiate în prezenta invenție. Se apreciază în acest domeniu de specialitate că, fragmentele precedente au dimensiuni de circa cinci aminoacizi, pot fi incluși sau anulați din fiecare capăt, sau din ambele, sau din interiorul polipeptidei sau din anumite fragmente ale acesteia, analogii reduși ai acesteia, cu excepția faptului ca în analogii cu legături în lanț bisulfurice urmează a fi menținute reziduurile de cisteină.

S-a demonstrat că, peptida murinică OB conține 50% de conținut alfa-helical și că polipeptida OB umană conține circa 60% alfa-helical, așa cum s-a detectat prin dicroismul circular al peptidei recombinată în condiții aproape fiziologice, în acest sens, într-o altă realizare, reziduurile de aminoacizi pot fi substituite cu reziduuri, pentru a se forma analogi de polipeptide OB, care manifestă înclinație pentru această formare, sau se formează structuri mult mai stabile, alfa-helix. Bunăoară, o structură alfa-helix poate fi preferată dacă Glu, Ala, Leu, His, Trp sunt introduși ca substituenți pentru reziduurile de aminoacizi depistate în polipeptida nativă OB. De obicei, substituirile conservative de aminoacizi sunt utilizate, bunăoară substituția acidului aspartic la reziduul 29, 30, 44, 61, 76, 100 și /sau I06 (așa cum s-a prezentat în fig. 4), cu acid glutamic (acizi glutamici) Glu; substituția izoleucinei cu leucina; substituția glicinei sau velinei, sau orice aminoacid divergent, cu alanina (bunăoară serina, în poziția 53 a polipeptidei umane OB, cu alanina), substituția argininei sau lizinei cu histidina și substituția tirozinei și (sau) fenilalaninei cu triptofan. Gradul crescut sau mai important, stabilitatea structurii alfa-helix poate produce un analog OB cu activitate mai mare, o afinitate de legare crescută sau timp de înjumătățire mai mare. Într-un aspect anumit, potențialul de formare a structurii flexibile pentru porțiunea peptidei OB, corespunzător reziduurilor de aminoacizi 22...53, este crescut. Într-un alt fel, potențialul de formare a structurii flexibile sau stabilității reziduurilor 61...116, este de asemenea crescut. Conform altui aspect, potențialul de formare a structurii helix, structură în lanț de disulfură, corespunzător aminoacizilor 117...167, este crescută. Așadar, analogii OB studiați, conțin potențialului de formare a structurii alfa-helicale cu un grad de stabilitate mai mare decât în unul din domeniile precedente. Într-o altă realizare, analogii de polipeptide OB reduse, sunt generați ca încorporând o structură de formare, bunăoară, reziduurile de aminoacizi pentru formarea structurii helix, în vederea compensării unei predispoziții mai mari a fragmentelor polipeptidei, de a pierde structura stabilă.

Compuși analogi, cum ar fi aceste fragmente, pot fi produși, bunăoară, prin digestia pepsinei materialului peptidic modelator de greutate. Alți analogi, cum ar fi, muteinele, pot fi produși prin

## MD 2311 G2 2003.11.30

18

mutageneza direcționată pe porțiunile standard ale secvențelor de codificare a peptidei modulare de greutate. Analogii care reprezintă "activitate de modulare a greutateii", cum ar fi moleculele mici, dacă acestea funcționează ca promotori sau inhibitori, pot fi identificați prin analizele cunoscute, *in vivo* și (sau) *in vitro*. Analogii cu molecule mici, peptidomimetici și polipeptidele OB. Structura polipeptidei, de obicei polipeptida OB umană, poate fi analizată prin diferite metode cunoscute în domeniu. Secvența de proteină, poate fi caracterizată printr-o analiză de hidrofilicitate (de exemplu: Hopp et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 3824 (1981)). Profilul de hidrofilicitate poate fi utilizat pentru identificarea regiunilor hidrofobe și hidrofile ale polipeptidei OB, care pot indica regiunile cufundate în interiorul polipeptidei indoite și regiunile accesibile de la exteriorul polipeptidei. Pe lângă aceasta, analiza structurală secundară (bunăoară Chou et al. Biochem. 13: 222 (1974)), poate fi de asemenea efectuată, pentru identificarea regiunilor polipeptidei OB, care așază structuri secundare specifice. Manipularea structurii prezentate sau determinate, incluzând structura secundară prevăzută, poate fi însoțită aplicând programe computerizate software, acceptabile în domeniu.

Prin depistarea unei surse abundente de polipeptide recombinante OB, prezenta invenție permite determinarea structurală cantitativă a polipeptidei. În special, se prevede un material suficient pentru analizele de rezonanță magnetică nucleară (RMN), spectroscopie în infraroșu (IR), Ramanultraviolet (UV), în special dicroismul circular (CD), analiza spectroscopică. RMN, în special, prevede o analiză structurală foarte puternică a moleculelor în soluție, care aproximează mai aproape zona nativă a acestora. (Marion et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 113: 967-974 (1989) ; Bar et al. J. Magn. Reson. 65: 355-360 (1985); Kimura et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1681-1685 (1980)). Alte metode de analiză structurală pot fi de asemenea utilizate. Acestea includ, nefiind limitate, analizele de cristalografie în raze X (Engstrom, Biochem. Exp. Biol. 11: 7-13 (1974)).

Potrivit unui alt aspect, un analog al polipeptidei OB, poate fi testat, pentru a determina dacă acesta reacționează încrucișat cu anticorpul specific, pentru polipeptida nativă OB sau fragmentele specifice ale acesteia. Gradul de reactivitate încrucișată duce la obținerea informației despre omologia structurală sau similaritatea proteinei sau accesibilitatea regiunii corespunzătoare porțiunilor de polipeptide care sunt utilizate pentru generarea fragmentelor specifice de anticorpi.

Screeningul analogilor OB.

Diferite tehnici de screening sunt cunoscute în domeniu, pentru screeningul analogilor polipeptidelor. Sunt acceptabile diferite colecții de produse chimice. În acest sens prezenta invenție examinează screeningul acestor colecții, bunăoară colecțiile de compuși sintetici generați de-a lungul anilor pentru cercetare, colecții de compuși naturali și colecții combinatorii, așa cum s-a descris în detalii mai mari, *infra*, pentru analogii polipeptidei OB. Într-un anumit aspect, invenție examinează screeningul acestor colecții pentru compușii care se referă la anticorpii polipeptidei anti-OB, de obicei anticorpii de polipeptide ob anti-umane. Într-un alt aspect, odată ce receptorul este identificat OB (vezi *infra*), orice tehnică de screening aplicată deja în domeniu, poate fi identificată prin utilizarea screeningului receptorului OB neantagonist sau antagonist. Prezenta invenție mai examinează screeningul lianților cu molecule mici sau a analogilor lianți și imitatori, ca și screeningul pentru lianții naturali care se referă și neantagonizează sau antagonizează receptorul OB activat, *in vivo*.

Cunoașterea secvenței primare a receptorului și similaritatea acelei secvențe cu proteinele cu funcție aplicată deja, poate fi acceptată ca un reper pentru neantagoniștii sau antagoniștii proteinei. Identificarea și screeningul neantagoniștii este facilitat în continuare prin determinarea caracteristicilor structurale ale proteinei, bunăoară prin utilizarea cristalografiei cu raze X, difracția neutronilor, spectrometria de rezonanță magnetică nucleară și alte tehnici aplicate la determinarea structurii. Aceste tehnici prevăd designul rațional sau identificarea neantagoniștii și neantagoniștii.

O altă cale aplică bacteriofagul recombinat pentru a produce colecții mari. Aplicând "metoda phage" (Scott et al. Science, 249: 386-390 (1990); Cwirla et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-6382 (1990). Devlin et al. Science 249: 404-406 (1990)), pot fi construite colecții foarte mari ( $10^6$ - $10^8$  entități chimice). Cea de a doua cale aplică metode chimice primare, dintre care metoda Geysen (Geysen et al. Molecular Immunology 23: 709-715 (1986); Geysen et al. J. Immunologic Method, 102: 259-274 (1987) și metoda recentă dată de Fodor et al. Science, 251: 767-773 (1991) bunăoară. Furka et al. 14th International Congress of Biochemistry, Volume 5, Abstract FR: 013 (1988); Furka, Int. J. Peptide Protein Res. 37: 487-493 (1991)); Houghton (U.S. Patent No. 4,631,211, editat decembrie, 1986); Rutter et al (U.S. Patent No. 5,010,175, editat aprilie, 23, 1991) descriu metode de producere a amestecului de peptide care pot fi testate ca neantagoniști sau antagoniști.

Într-un alt aspect, colecțiile sintetice (Needels et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 10700-10704 (1993); Lam et al. International Patent Publication No. WO 92/00252, fiecare dintre acestea fiind incorporate aici în totalitatea lor prin referințe) în mod asemănător se pot utiliza la screeningul pentru lianții receptori OB, conform prezentei invenții. Cu astfel de colecții, antagoniștii receptori pot fi detectați aplicând celulele care exprimă receptorul fără clonarea actuală a receptorului OB.

## MD 2311 G2 2003.11.30

19

Alternativ, analizele pentru legarea liantului solubil la celulele care exprimă forme recombinante ale receptorilor lianți OB în domeniul de legare, pot fi efectuate. Lianții solubili pot fi prevăzuți în mod real, ca polipeptide recombinante OB sau sintetice. Screeningul poate fi realizat cu celule recombinante care exprimă receptorul OB sau alternativ, aplicând proteina receptor purificat bunăoară, se produce recombinația așa cum s-a descris mai sus. Bunăoară, abilitatea receptorului OB solubilizat sau solubil, marcat, care include porțiunea de legătură cu liantul pentru acea moleculă de legare a liantului, poate fi utilizată pentru screeningul colecțiilor, așa cum s-a descris în referințele precedente, derivați de polipeptide.

În fond, prezenta proteină (denumită aici ca "proteină" este utilizată pentru includerea "polipeptidei", dacă nu este altfel indicat) poate fi derivată prin legarea uneia sau a mai multor jumătăți chimice la jumătatea de proteină. Derivații modificați chimic, pot fi în continuare aplicați pentru administrarea intraarterială, interperitoniană, intramusculară, subcutanată, intravenoasă, orală, nazală, rectală, bucală, sublinguală, pulmonară, topică, transdermală sau alte căi de administrare. A fost demonstrată că modificarea chimică a proteinelor biologice active prevede avantaje adiționale în anumite circumstanțe, cum ar fi creșterea stabilității și a timpului de circulație a proteinei terapeutice și de scădere a imunogenității. Vezi U.S. Patent No. 4,179,337, Davis et al. apărut Decembrie 18, 1979. Pentru documentare, a se vedea Abuchowski et al. "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" in *Enzymes as Drugs*, pag. 367-383. Holcenberg and Roberts, eds. Wiley-Interscience, New York, NY, (1981). Un articol de revistă descrie modificarea proteinei și proteinele de fuziune ca Francis, *Focus on Growth Factors*, 3: 4-10 (1992). Jumătățile chimice pentru derivatizare.

Jumătățile chimice acceptabile pentru derivatizare, pot fi selectate din polimerii solubili în apă. Polimerul selectat va fi solubil în apă astfel ca proteina de care acesta este legat, nu va precipita în mediul apos, cum ar fi mediul fiziologic. De obicei, pentru uz terapeutic la prepararea produsului finit, polimerul va fi acceptabil farmaceutic. Un specialist în domeniu, va fi capabil să selecteze polimerul dorit pe baza unor astfel de considerații, atunci când polimerul/proteina conjugat va fi utilizat terapeutic și astfel, doza dorit, timpul de circulație, rezistența la proteoliză și din alte considerații, au un rol important. Proteinele și peptidele prezente pot fi identificate aplicând analizele prezentate aici.

Molecule polimeri. Polimerii solubili în apă, pot fi selectați dintr-o grupă alcătuită din polietilen glicol, bunăoară, copolimeri ai etilen glicolului/propilen glicol, carboximetilceluloză, dextran, alcool polivinilic, polivinilpirolidona, poli-1,3-dioxolan, poli-1,3,6-trioxan, copolimerul anhidridei maleice cu etilenul, poliaminoacizi (fie homopolimeri sau random copolimeri) și dextran sau glicol poli (n-vinil pirolidona) polietilenică, homopolimeri de propilen glicol, copolimeri de polipropilen oxid și oxid de etilen, polioli polioxietilați și alcool polivinilic. Polietilen glicol propionaldehidă care duce la avantaje la preparare, din cauza stabilității acesteia în apă.

Polimerul poate fi de orice greutate moleculară și poate fi ramificat sau neramificat. Pentru propilen glicol, greutatea moleculară este cuprinsă între circa 2kDa și circa 100 kDa (termenul de "circa" atestă că în preparatele de polietilen glicol unele molecule vor cântări mai mult, iar altele mai puțin, decât greutatea moleculară stabilită), pentru a facilita manipularea și prepararea. Se pot utiliza alte dimensiuni, în dependență de profilul terapeutic dorit (bunăoară durata de eliberare susținută ca urmare a efectelor asupra activității biologice, facilitarea manipulării, gradul de antigenicitate sau absența antigenicității și alte efecte cunoscute ale polietilen glicolului pentru o proteină terapeutică sau un analog).

Raportul polimer/proteină.

Numărul de molecule de polimer atașate astfel, poate varia și specialistul în domeniu va fi capabil de a stabili efectul asupra funcției. Se pot utiliza monoderivați sau se prevăd di-, tri-, tetra- sau alte combinații din acești derivați, cu aceleași jumătăți chimice sau cu jumătăți chimice diferite (bunăoară polimeri, cu greutăți diferite de polietilen glicol). Proporția de molecule de polimeri relativ cu proteinele (sau peptide) variază în dependență de concentrațiile acestora în amestecul de reacție. În fond, raportul optim (în termeni de eficiență a reacției, nu exista exces de proteină sau de polimer nereacționat) va fi determinat prin asemenea factori cum ar fi gradul dorit de derivatizare (bunăoară mono, di-, tri-, etc.), greutatea moleculară a polimerului selectat, dacă polimerul este ramificat sau neramificat și condițiile de reacție.

Legarea jumătății chimice la proteină.

Moleculele de polietilen glicoli (sau alte jumătăți chimice) vor fi atașate la proteină luând în considerație efectele asupra domeniilor funcționale și antigenice ale proteinei. Există un număr de metode de legare, acceptabile pentru specialiști în domeniu, bunăoară EP 0 401 384 încorporate aici prin referințe (cuplarea PEG la G-GSF). Vezi Malik et al. *Exp. Hematol.* 20: 1028-1035 (1992) (expunerea pegilării GM-CSF aplică clorura de tresil). Bunăoară, polietilenul glicolul poate fi legat covalent la reziduurile de aminoacizi prin grupa reactivă, cum ar fi grupările amino libere și cele de carboxil. Grupările reactive sunt cele la care molecula de polietilen glicol activat poate fi legată. Reziduurile de aminoacizi având o grupare amino liberă, pot include reziduuri de lizină și reziduuri de aminoacid N-terminal, acestea având o grupare carboxil liberă, care poate include reziduuri de acid aspartic, reziduurile

de acid glutamic și reziduurile de aminoacid terminal. Grupările sulfhidrilice pot fi, așadar, utilizate ca grupări reactive pentru legarea moleculei (moleculilor) de polietilen glicol.

De obicei în scopuri terapeutice, este legarea la grupa amino, cum ar fi legarea la N-terminal sau la gruparea de lizină. Legarea reziduurilor importante pentru receptorul de legătură, se va evita, când se dorește receptorul de legătură. Proteine Modificate Chimic N-terminal.

Proteina modificată chimic N-terminal este specifică. Aplicând polietilenul glicol ca o ilustrare a compozițiilor prezente, se pot selecta ca o varietate de molecule de polietilenglicol (prin greutatea moleculară, ramificare, etc.), proporția de molecule de polietilen glicol la proteină (sau peptide), în amestecul de reacție, tipul reacției de pegilare care trebuie realizat și metoda de obținere a proteinei pegilate N-terminal selectate. Metoda de obținere a preparatului pegilat N-terminal (bunăoară separarea acestei jumătăți din jumătățile monopegilate dacă este necesar), poate fi de purificare a materialului pegilat N-terminal din populația moleculelor de proteine pegilate. Modificarea chimică

N-terminală selectivă poate fi însoțită de alchilarea reductivă cu cercetarea reactivității diferențiale a diferitelor tipuri de grupări amino primare (lizină relativ cu N-terminal) acceptabile pentru derivatizarea într-o proteină specială. În condiții de reacție potrivite, se obține derivatizarea proteinei la N-terminal cu gruparea carbonil care conține polimerul. Bunăoară, o grupare poate fi selectivă ca proteină pegilat N-terminal, prin efectuarea reacției la un PH care permite să se obțină un avantaj al pK, diferențele fiind între grupările ε-amino ale reziduurilor de lizină și grupare-amino a reziduuului terminal N al proteinei. Prin astfel de derivatizări selective, se controlează legare la polimerul solubil în apă, a proteinei; conjugarea se produce cu polimerul care este plasat predominant la N-terminal al proteinei, neavând loc nici o modificare semnificativă în cadrul altor grupe reactive, cum ar fi grupările amino din catena secundară a lizinei. Aplicand alchilarea reductivă, polimerul solubil în apă poate fi de tipul descris mai sus și va avea o singură aldehydă reactivă, pentru cuplarea proteinei. poate fi de asemenea utilizată polietilenglicol propionaldehida.

Acizii nucleici asociați cu polipeptida OB.

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

O "replicație" este orice element genetic (de exemplu plasmidul, cromozomul, virusul) care funcționează ca o unitate autonomă a replicației. ADN *in vivo*, care este bunăoară capabilă de replicație sub propriul ei control.

Un "vector" este un replicon, cum ar fi un plasmid fag sau cosmic, la care un alt segment de ADN, se poate lega, astfel ca să poarte replicația segmentului legat.

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

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

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

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

O "moleculă de acid nucleic" se referă la forma polimerică de ester fosfat a ribonucleozidelor (adenozină, guanozină, uridină sau citidină; "moleculă ARN") sau dezoxiribonucleozide (dezoxiadenozina, dezoxiguanozina sau dezoxicitidina; "Moleculă ADN") fie forme simplu răsucite sau helix dublu răsucit. Sunt posibile helice dublu răsucite ADN-ADN, ADN-ARN și ARN-ARN. Termenul de moleculă de acid nucleic și în special moleculă de ADN sau ARN, se referă numai la structura primară și secundară a moleculei și aceasta nu se limitează la nici o formă specială, terțiară sau cuaternară. Astfel, acest termen include ADN dublu răsucit demonstrat, inter alia, în moleculele de ADN lineare sau circulare (bunăoară fragmente de restricție (plasmide și cromozomi. În discutarea structurii de molecule

## MD 2311 G2 2003.11.30

21

ADN dublu răsucite, în special, secvențele pot fi descrise aici conform convenției normale a secvenței date numai în 5' ... 3' pe direcție de-a lungul filamentului netranscris (bunăoară filamentul având o secvență omoloagă celei de mRNA). O "moleculă de ADN recombinat" este o moleculă DNA care înregistrează o transformare prin manipularea biologică moleculară. O moleculă de acid nucleic este "hibridizabilă" la o altă moleculă de acid nucleic, cum ar fi cADN, ADN genic sau ARN, când forma simplă răsucită a moleculei de acid nucleic poate susține molecula de acid nucleic în condiții acceptabile de temperatură și forță ionică în soluție (vezi Sambrook et al. 1989, supra). Condițiile de temperatură și determinarea forței ionice duc la o "stringență" a hibridizării. Pentru un screening preliminar al acizilor nucleici omologi, se pot utiliza condiții de hibridizare de o stringență scăzută, corespunzător la  $T_m$  de 55°C, de exemplu, 5 x SSC, 0,1% SDS, 0,25 % lapte și fără formamidă, sau 30% formamidă, 5 x SSC, 0,5% SDS). Condițiile de hibridizare moderat stringente corespund la o valoare superioară a  $t_m$ , de exemplu, 40% formamidă cu 5 x 6 x SCC. Condițiile de hibridizare puternic stringente corespund la o valoare maximă a  $T_m$ , bunăoară, 50%, formamidă, 5 x sau 6 x SCC. Hibridizarea cere ca doi acizi nucleici să conțină secvențe suplimentare, în dependență de stringența hibridizării și sunt posibile nepotriviri între baze. O stringență acceptabilă pentru hibridizarea acizilor nucleici, depinde de lungimea acizilor nucleici și de gradul de complementare, variabile cunoscute bine în domeniu. Cu cât este mai ridicat gradul de similaritate sau omologie între secvențele (2) de nucleotide, cu atât este mai mare valoarea  $T_m$  pentru hibridii acidului nucleic, având acele secvențe. Stabilitatea relativă (corespunzător la o valoare superioară de  $T_m$ ) a hibridizărilor acidului nucleic, scade în felul următor: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Pentru hibridii ce dispun de mai mult de 100 nucleotide în lungime, ecuațiile pentru calcularea  $T_m$  au fost derivate (vezi Sambrook et al., 1989, supra, 9,50-0,51). Pentru hibridizarea cu acizi nucleici mai scurți, bunăoară oligonucleotide, poziția nepotrivirilor devine mai importantă și lungimea oligonucleotidei se determină în specificitatea acesteia (vezi Sambrook et al. 1989, supra, 11,7-11,8). De obicei, o lungime minimă pentru acidul nucleic hibridizabil, este de cel puțin circa 10 nucleotide; mult mai preferabil de cel puțin circa 15 nucleotide și cel mai preferabil, o lungime de cel puțin circa 20 de nucleotide.

"Recombinarea omoloagă" se referă la inserția unei secvențe străine ADN a vectorului în cromozom. De obicei, vectorul ținește o porțiune cromozomală specifică pentru recombinarea omoloagă. Pentru recombinarea omoloagă specifică, vectorul va conține regiuni suficient de lungi pentru omologia secvențelor de cromozomi, pentru a permite legarea complementară și incorporarea vectorului în cromozom. Regiunile mai lungi de omologie și gradele mai mari de similaritate secvențială, pot duce la creșterea eficienței recombinației omoloage. O "secvență de codificare ADN" este o secvență ADN dublu răsucită, care este transcrisă și transfestă în polipeptidă într-o celulă *in vitro* sau *in vivo*, când se plasează sub controlul secvențelor de reglare corespunzătoare. Limitele secvenței de codificare sunt determinate prin codonul inițial la gruparea terminală 5'(amino) și prin codonul de oprire a translației la gruparea terminală 3' (carboxil). O secvență de codificare poate include, fără a se limita la aceasta, secvențe procariotice, secvențe de cADN din mRNA eucariotice, secvențe de ADN genic din ADN eucariotic (bunăoară în cazul mamiferelor) și chiar secvențe de ADN sintetic. Dacă secvența de codificare intenționează exprimarea în celule eucariotice, secvența terminației de transcripție și de semnal a poliadenilării, va fi, de obicei, localizată la secvența 3' de codificare.

Izolarea secvențelor OB de codificare și flankare.

Acizii nucleici studiați în prezenta invenție se extind așa cum este menționat, la alți acizi nucleici care codifică exprimarea peptidelor, cum ar fi cele prezentate în fig. 1A ... D (SEQ ID No. 2), fig. 3 (SEQ ID No. 4), fig. 5 (SEQ ID No. 5) și fig. 6 (SEQ ID No. 6). În acest sens, în timp ce DNA specific a fost izolat și secvenționat în relația cu gena ob, orice celule potențiale animale, pot să servească ca sursă de acid nucleic pentru clonarea moleculară a genei cuprinsă în peptida prezentei invenții. ADN poate fi obținut prin procedee standard cunoscute în domeniu, din ADN clonat (bunăoară "colecția" ADN) prin sinteză chimică, prin clonarea cADN sau prin clonarea ADN genic sau a fragmentelor acestora, purificate din celulele dorite (vezi, bunăoară, Sambrook et al. 1989, supra, Glover, 1985, supra). Glonele derivate din ADN genic, pot conține regiuni ADN de reglare și intronice, în adăugare la regiunile de codificare; clonele derivate din cADN nu vor conține secvențe de intron. Oricare ar fi sursa, gena va fi clonată molecular într-un vector acceptabil, pentru propagarea genei.

În ceea ce privește clonarea moleculară a genei de la ADN genic, acest ADN genic poate fi amplificat aplicând primerii selectați din secvențele cADN. Alternativ, fragmentele de ADN sunt generate, din care, câteva, vor conține gena ca urmare. ADN poate fi elevat pe porțiunile specifice, aplicând diferite enzime de restricție. Se poate utiliza de asemenea DNaze, în prezență de mangan, pentru fragmentarea ADN sau ADN poate fi fragmentat fizic, bunăoară printr-o metoda acustică. Fragmentele de ADN linear, pot fi apoi separate conform unor tehnici standard de dimensionare, incluzând, fără a se limita la aceasta, agaroză gel și poliacrilamida gel în electroforeza și cu ajutorul unei cromatografii pe coloană.

Odată ce aceste fragmente de ADN este generat identificarea fragmentului de ADN specific conținând gena ob sau gena asemănătoare ob poate fi însoțită de diferite metode. Bunăoară, dacă o

## MD 2311 G2 2003.11.30

22

5 cantitate dintr-o porțiune de ob, gena asemănătoare ob sau ARN specifică acesteia, sau fragmentul acesteia, este valoroasă și poate fi purificată și marcată, fragmentele de ADN generate, putând fi supuse unui screening prin hibridizarea acidului nucleic la proba de marcă. (Benton et al. Science, 196: 180 (1977); Grunstein et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961(1275)). Prezenta invenție prevede astfel de probe de acid nucleic, care pot fi convențional preparate în secvențe specifice descrise aici, bunăoară o probă de hibridizare având o secvență de nucleotidă corespunzătoare la cel puțin 10, preferabil 15 fragmente de nucleotide ale secvenței prezentate în fig. 1A ... E (SEQ ID No. 1) sau fig. 2A și B (SEQ ID No. 3). De obicei, un fragment este selectat ca fiind unic superior pentru peptidele modulatorie ale invenției. Aceste fragmente de ADN vor fi hibridizate cu) omologie substanțială la această probă. Așa cum s-a menționat mai sus, cu cât gradul de omologie este mai mare, cu atât condițiile de hibridizare sunt mai stringente pentru utilizarea acestora. Într-un aspect anumit al prezentei invenții, condițiile de hibridizare cu stringență inferioară sunt utilizate pentru identificarea peptidei modulatorie, omoloage. Mai mult decât atât, într-un aspect preferențial și așa cum a fost demonstrat experimental, acidul nucleic cuprinzând peptida modulatorie, conform prezentei invenții, va hibridiza în acidul nucleic având o secvență de nucleotidă prezentată în fig. 1A ... E (SEQ ID No. 1), sau fig. 2A și B (SEQ ID No. 3), sau un fragment de hibridizare a acestora, în condiții moderat stringente, e de dorite fiind condițiile de hibridizare, de stringență puternică.

20 Alternativ, prezența genei poate fi detectată prin analize bazate pe proprietățile fizice, chimice sau imunologice ale produsului de exprimare a acesteia. Bunăoară, clonele cADN sau clonele ADN care hibridizează selectiv propriile mRNA-uri pot fi selectate în ce privește producerea de proteine care bunăoară o activitate similară sau identică de migrare electroforetică, comportament identificat izoelectric, aplicații în digestia proteolitică, activitate de tirozinfosfatază sau proprietăți antigenice așa cum este cunoscut pentru peptidele modulatorie prezente. Bunăoară, anticorpii prezentei invenții pot fi utilizați convențional, pentru screeningul peptidelor modelator reomoloage din alte surse.

25 O genă care cuprinde peptida modulatorie, conform prezentei invenții, poate fi, așadar, identificată prin selecția mRNA, bunăoară prin hibridizarea acidului nucleic urmată de translația *in vitro*. În acest procedeu, fragmentele sunt utilizate pentru izolarea complementară de mRNA-uri, prin hibridizare. Astfel de fragmente de ADN, pot reprezenta ADN modelator purificat, acceptabil. Analiza de imunoprecipitare sau analize funcționale (bunăoară tirozin fosfatază activă) ale produselor de translație *in vitro* din produsele mRNA-urilor identifică mRNA-urile și astfel fragmentele lor de ADN, complementare, care conțin secvențele dorite. Pe lângă aceasta, mRNA-urile specifice pot fi selectate prin absorbția polizomilor izolați din celule pentru anticorpi imobilizați, specific direcționați spre peptida modulatorie. O peptidă cADN modulatorie radiomarcată, poate fi sintetizată aplicând mRNA-ul selectat (din polizomii absorbiți), ca model. mRNA-urile sau cADN -urile radiomarcate, pot fi apoi utilizate ca probe pentru identificarea fragmentelor de peptide ADN modulatorie omoloage, dintre alte fragmente de ADN genice.

30 Așa cum s-a menționat mai sus, secvența de ADN cuprinzând peptidele modulatorie de greutate poate prepara mai degrabă sintetic, decât prin clonare. Secvența de ADN poate fi desemnată cu codoane corespunzătoare pentru secvențele de aminoacizi ai peptidelor modulatorie de greutate. În fond, vor fi selectate codoanele preferate pentru gazda prevăzută, dacă secvența se va utiliza pentru exprimare. O secvență completă este asamblată prin suprapunerea oligonucleotidelor preparate prin metode standard și asamblate într-o secvență de codificare, completă. Vezi, de exemplu, Edge, Nature, 292 : 756 (1981); Nambair et al. Science, 223:1299 (1984); Jay et al. J. Biol. Chem. 259 : 6311(1984).

45 Secvențele de ADN sintetic permit o construcție acceptabilă a genelor: care vor exprima analogii modelatori ai greutății, așa cum s-a descris mai sus. Alternativ, analogii de codificare ADN pot fi obținuți prin mutageneza directă pe porțiuni ale genelor OB native sau cADN-urilor și analogii pot fi obținuți direct, aplicând sinteza polipeptidei convenționale.

O metodă generală pentru încorporarea specifică pe porțiuni a aminoacizilor nenaturali în proteine, așa cum s-a descris de Noren et al. Science, 244: 182-188 (1989). Această metodă poate fi utilizată pentru a se crea analogi ai polipeptidei ob, cu aminoacizi nenaturali nucleici necodificați. Prezenta invenție se extinde la prepararea nucleotidelor contrasens și ribozimelor, care pot fi utilizați pentru a interfera cu exprimarea proteinelor modulatorie de greutate, la un nivel de translație. Această cale, aplică acidul nucleic contrasens și ribozimal pentru blocarea translației mRNA-urilor specifice, mai degrabă printr-un efect de mască al mRNA cu acid nucleic contrasens sau prin clivajul acestuia cu un ribozimel.

55 Acizii nucleici contrasens, bunăoară molecule de ADN sau ARN, sunt complementari la cel puțin o porțiune din molecula de mRNA specific (vezi Weintraub.Sci. Am. 262: 40-46 (1990); Marcus-Sekura, Anal. Biochem. 172: 289-295 (1988)). În celule are loc hibridizarea la mRNA, formând o moleculă dublu răsucită. Celulele nu participă la translația unui mRNA complexat în această formă dublu răsucită. De aceea, acizii nucleici contrasens interferează cu exprimarea mRNA în proteină. Oligomerii de circa cincisprezece nucleotide și moleculele care hibridizează la codonul de inițiere AUG, vor fi în special eficiente, deoarece acestea sunt mai ușor de sintetizat și generează mai puține probleme decât pentru moleculele mai mari, când are loc introducerea acestora în celulele producătoare de peptide modulatorie a

## MD 2311 G2 2003.11.30

23

greutății. Metodele contrasens au fost utilizate pentru inhibarea exprimării multor gene *in vitro* (Marcus -Sekura, 1988, supra; Hambor et al. J. Exp. Med. 168: 1237-1245 (1988)).

5 Ribozimele sunt molecule de ARN care posedă capacitatea de cleavaj specific al moleculelor de ARN cu simplă rășcire într-un mod aproximativ analog celui de restricție a ADN la endonucleaze. Ribozimele sunt descoperite din observarea faptului că anumiți mARN au capacitatea de a exercita proprii introni. Prin modificarea secvenței de nucleotide la acești ARN, cercetătorii au fost capabili de inginerie moleculară care duce la recunoașterea secvențelor de nucleotide specifice în molecula de ARN și pe care o clevează. (Cech, J. Am. Med. Assoc. 260: 3030-3034 (1988). Deoarece acestea sunt secvențe specifice, numai mARN cu secvențe speciale, sunt inactivate.

10 Investigatorii au identificat două tipuri de ribozime, tipul "Tetrahymena" și tipul "Hammerhead". Ribozimele de tip Tetrahymena determină recunoașterea a patru secvențe de bază, în timp ce tipul "hammerhead", duce la recunoașterea a unsprezece...optsprezece secvențe de bază. Cu cât este mai lungă secvența de recunoaștere, cu atât este mai ușoară producerea exclusivă a speciilor ținta de mARN.

15 De aceea, ribozimele de tipul hammerhead sunt preferabile ribozimelor de tip Tetrahymena, pentru inactivarea speciilor de mARN specific și optsprezece secvențe de recunoaștere de bază, sunt preferate secvențelor de recunoaștere, mai scurte.

Secvențele de ADN descrise aici, pot fi astfel utilizate, pentru prepararea moleculelor contrasens și a ribozimelor care determină clivajul mARN-urilor pentru obținerea proteinelor modulatorie de greutate și a lianților lor, inhibându-se astfel exprimarea genei ob și conducând la un câștig de greutate și la creșterea adipozității. Conform altui aspect, oligonucleotidele complementare, scurte pentru codificare și filamentele complementare ale acidului nucleic OB, sau pentru regiunile necodificate ale genei 5', 3' OB sau pentru cele interne (intronice) din regiunile de codificare, sunt de asemenea prezentate în prezenta invenție. Astfel de acizi nucleici sunt utilizați ca probe, fie ca probe de oligonucleotide cu marcarea directă, sau ca primeri pentru reacția în lanț să polimerizeze în vederea evaluării prezenței mutațiilor în ob sau a nivelului de exprimare a mPARN OB. De obicei, acizii nucleici necodificați, conform prezentei invenții, sunt din gena umană OB. Într-un aspect anumit, acizii nucleici necodificați duc la o recombinare omoloagă pentru integrarea genei amplificabile și (sau) altor secvențe de reglare în proximitatea genei OB, bunăoară pentru a se prevedea niveluri mai ridicate de exprimare a polipeptidei OB sau pentru a câștiga o mutație în secvențele de reglare a genei ob, care duc la obținerea unor niveluri potrivite de exprimare a polipeptidei OB (vezi International Patent Publication WO 91/06666, publicat 16 mai 1991, de Skoultchi; International Patent Publication No. WO 91/09955, publicat 11 iulie 1991, de Chappel; vezi internațional patent publication No. WO 90/14092, publicat în noiembrie 29, 1990 de Kucherlapati și Campbell).

30 Producția de polipeptide OB. Exprimare și sinteză

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

O secvență de codificare este "sub control" pentru secvențele de control transcripțional și translațional în celula în care ARN polimeriza transcrie secvența de codificare în mARN și care este apoi trans-ARN aplicată și transferată în proteine care este conținută de secvența de codificare. O "secvență semnal" este inclusă la începutul secvenței de codificare a proteinei care trebuie să fie exprimată la suprafața celulară. Această secvență cuprinde o peptidă semnal, N-terminal pentru polipeptida matură, care dirijează celulele gazdă pentru translocarea polipeptidei. Termenul "secvență semnal de translocare" este, , așadar, utilizată aici și se referă la această secvență semnal. Secvențele semnal de translocare, pot fi depistate asociate cu o varietate de proteine native pentru eucariote și procariote și sunt adesea funcționale în ambele tipuri de organisme. O secvență ADN este "operativ legată" la o secvență de control a exprimării, când secvența de control a exprimării, controlează și reglează transcripția și translația acelei secvențe ADN. Termenul de "operativ legată" include un semnal de start, potrivit (bunăoară ATG), în fața secvenței ADN care trebuie să fie exprimată și prin menținerea cadrului de citire corect, pentru a permite exprimarea secvenței de ADN sub controlarea secvenței de control a exprimării și pentru producerea produsului dorit care cuprinde secvența ADN. Dacă o genă care se dorește a fi inserată în molecule recombinată ARN, nu conține un semnal de start corespunzător, acest semnal de start, poate fi inserat la partea superioară a (5') și în cadrul de citire, cu gena.

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

60

## MD 2311 G2 2003.11.30

24

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

5 Astfel de legături operative ale secvenței de ADN, conform prezentei invenții, cu secvența de control a exprimării, desigur, include, dacă nu aparține deja secvenței de ADN, documentarea codonului de inițiere, ATG, în cadrul de citire corectă, superior secvenței ADN. O varietate mare de combinații de celule gazda și vectori de exprimare, poate fi utilizată în secvențele de exprimare ale ADN, , conform prezentei invenții. Vectorii de exprimare utilizatori, bunăoară, pot consta din segmente ale secvențelor 10 ADN cromozomale, necromozomale și sintetice. Vectorii acceptabili includ derivați de SV 40 și plasmidele bacteriene cunoscute, bunăoară Escherichia coli, col E1, pCR1, pBR322, pMB9, pUC sau pUC ca derivați de plasmide, bunăoară vectorii pGEX, vectorii pET, pmal-c, pFLAG, etc. și derivații acestora, plasmidele RP4, fag ADN, etc., numeroși derivați de fag λ, bunăoară NM989 și fag DAN, bunăoară M13 și fag ADN cu filamente simplu răsucite; plasmide din drojdie cum ar fi 2 □ sau derivații 15 acestora; vectorii utilizatori în celule eucariotice, cum ar fi vectorii utilizatori în celulele de insecte și în celulele de mamifere; vectori derivați din combinații de plasmide și fagi ADN, cum ar fi plasmidele care au fost modificate, pentru a întrebuița fagul ADN sau alte secvențe de control a exprimării. Într-un aspect anumit, exprimarea ob este obținută în drojdie metilotrofică, bunăoară drojdie Pichia pastoris (vezi bunăoară, International Patent Publication No. WO 90/03431, publicat 5 aprilie 1990, de Brierley et al.; 20 International Patent Publication No. WO 90/10697, publicat la 20 septembrie 1990, de Siegel et al.). Într-un anumit aspect, infra, vectorul de exprimare este prelucrat pentru exprimarea ob sub controlarea secvenței de semnalizare ca factor de conjugare alfa.

Oricare din marea varietate de secvențe de control a exprimării-secvențiale care controlează exprimarea secvenței DNA, se referă operativ la aceasta - pot fi utilizate în acești vectori pentru a exprima 25 secvențele de ADN , conform prezentei invenții. Astfel de secvențe aplicată pentru controlarea exprimării, includ bunăoară promotorii timpurii sau întârziați ai SV40, CMV, vaccinia, polyoma sau adenovirusul, sistemul lac, sistemul trp, sistemul TAC, sistemul TRC, sistemul LTR, regiunile fage λ, promotoare și operatoare majore, regiunile de control pentru proteina cu înveliș fd, promotorul pentru 3-fosfoglicerat kinază sau alte enzime glicolitice, promotorii de acid fosfataza (bunăoară Pho5), promotorul 1 AOX sau drojdia metilotrofică, promotorii factorilor de conjugare alfa din drojdie și alte secvențe cunoscute pentru controlarea exprimării genelor de celule procariotice sau eucariotice, sau virușii acestora și diversele lor combinații. O varietate de celule gazdă, unicelulare sunt astfel aplicată în exprimarea 30 secvențelor de ADN, conform prezentei invenții. Aceste celule gazdă pot include celule gazdă eucariotice și procariotice cunoscute, cum ar fi tulpini de Escherichia coli, Pseudomonas Bacillus, Strptomyces, fungi cum ar fi drojdiile (Saccharomyces și drojdia metilotrofică cum ar fi Pichia, Candida, Hansenula și Torulopsis) și celule animale, cum ar fi CHO, R1,1, B-W și celule LM, celule din rinichi de maimuță, African Green Monkey (bunăoară COS 1, COS 7, BSC1, BSC 40 și BMT 10), celule de insecte (bunăoară Sf9), celule umane și celule de plante, în culturi de țesuturi.

Se înțelege că, nu toți vectorii, secvențele de control a exprimării și celulele gazdă vor funcționa în același fel pentru a exprima secvențele ADN , conform prezentei invenții. Nici una din toate aceste celule gazdă nu va funcționa la fel de bine cu același sistem de exprimare. Cu toate acestea, în domeniul de specialitate, se vor selecționa proprii vectori, secvențele de control a exprimării și celulele gazdă, fără 40 experimentare potrivită pentru a însoți exprimarea, ca urmare fără a se îndepărta de scopul acestei invenții. Bunăoară, la selectarea vectorului, se va considera celula gazdă în care va trebui să funcționeze vectorul. Numărul copiilor de vectori, abilitatea de control al numărului de copii și exprimarea oricăror alte proteine care conțin vectorul, cum ar fi markerii antibiotici, vor fi luați în considerație. La selectarea 45 secvenței de control a exprimării, se va lua în considerație o varietate de factori, Aceștia includ, bunăoară, puterea relativă a sistemului, controlabilitatea acestuia, și compatibilitatea cu secvența specială ADN, sau gena care trebuie exprimată, în special cu privire la structurile secundare potențiale. Celulele gazdă unicelulare acceptabile, vor fi selectate prin considerarea bunăoară a compatibilității lor cu vectorul ales, 50 caracteristicile de secreție, abilitatea lor de multiplicare corectă a proteinelor și necesarul de fermentație al acestora, ca și toxicitatea celulelor gazdă, din cauza produsului cuprinzând secvențele ADN, care se vor exprima astfel și ușurința de purificare a produselor de exprimare. Luând în considerație acești și alți factori, specialistul în domeniu va fi capabil de a construi o varietate de vectori, de secvențe de control a exprimării/combinații de celule gazdă care vor exprima secvențele ADN, conform prezentei invenții prin fermentare sau o cultură animală pe scară largă.

60 Într-un aspect anumit, proteina de fuziune OB poate fi exprimată. Proteina de fuziune OB cuprinde cel puțin o porțiune funcțională activă din proteina OB (non-OB) care se referă printr-o legătură peptidică la cel puțin o porțiune funcțională activă din polipeptida OB. Secvențele non-OB pot fi aminoterminal sau carboxiterminale relativ cu secvențele OB. Mult mai preferabil, pentru exprimarea stabilității proteinei de fuziune OB proteolitic inactive, porțiunea de proteină non-ob, este legată printr-o legătură peptidică la

## MD 2311 G2 2003.11.30

25

proteina OB cu aminoterminal. Molecula ADN recombinată cuprinzând o astfel de proteină de fuziune, conține secvența de codificare având cel puțin o porțiune funcțional activă din proteina non-OB, legată în cadrul la secvența de codificare OB și, de obicei, cuprinde o porțiune de cleavaj pentru proteza specifică, bunăoară trombina sau Factorul Xa, de obicei la joncțiunea OB – non-OB. Intr-un anumit aspect, proteina de fuziune este exprimată în *Escherichia coli* sau *Pichia pastoris*.

Intr-un anumit aspect, infra-vectorii sunt preparați pentru exprimarea genelor ob umane și muricene, cu sau fără codonul gln-49, în sistemul de exprimare bacteriană și în sistemul de exprimare a drojdiei (*Pichia*), ca proteine de fuziune. Gena ob este depistată cu o porțiune de cleavaj endonucleazică, bunăoară aplicând PCR și primeri noi. Se dorește confirmarea secvențelor generate de PCR, deoarece probabilitatea de includere a unui punct de mutație este mai mare cu această tehnică. Se aplică un plasmid conținând histidina marcată (His-tag) și o porțiune de cleavaj proteolitic. Prezența histidinei face posibilă izolarea selectivă a proteinelor recombinante, pe coloana Ni-chelație, sau prin purificare prin afinitate. Porțiunea de cleavaj proteolitic, într-un anumit aspect, înfră, porțiunea de cleavaj a trombinei, este prelucrată astfel că, tratamentul cu proteza, bunăoară trombina, va elibera o lungime complet matură (bunăoară absența secvenței semnal) a polipeptidei OB.

Intr-un alt aspect, vectorul pGEX (Smith et al. *Gene* 67: 31-40 (1988)) se poate de asemenea utiliza. Acest vector fuzionează schistosoma japonicum glutationina S-transferaza cADN, la secvența de interes. Proteinele bacteriene sunt cultivate și proteinele recombinante, pot fi rapid purificate pe o coloană cu afinitate redusă pentru glutationină. Suportul GST poate fi substanțial elevat din proteinele de fuziune, prin digestia cu proteaze parțial specifice. După cleavaj, suportul și proteina de fuziune necleavată, pot fi îndepărtate prin absorbție pe glutation agaroză. Dificultățile provocate de sistemul ocazional sporesc atunci când proteina codificată este insolubilă în soluțiile apoase. Exprimarea proteinelor recombinante în sistemul bacterian, poate rezulta în multiplicarea incorectă a proteinei de exprimare, fiind necesară remultiplicarea. Proteina recombinată poate fi remultiplicată sus sau după cleavaj, pentru a forma polipeptida OB funcțional activă. Polipeptida OB poate fi remultiplicată prin fazele (i) incubarea proteinei în tamponul de denaturare care conține un agent de reducere și apoi (ii) incubarea proteinei în tamponul care conține un agent de oxidare și de obicei conține un agent de stabilizare a proteinei sau agentului chaotropic sau ambii. Perechi de agenți acceptabili redox (reducere/oxidare) pot include, fără a se limita la aceștia, glutation redus/glutacion bisulfură, cistină/cisteină, cistamină/cisteamină și 2-mercaptoetanol/2-hidroziethylbisulfură. Într-un aspect special, fuziunea proteinei poate fi realizată într-un denaturat cum este ureea, sus de schimbarea în soluție tampon reducătoare. Într-un anumit aspect prefatează, - proteina este purificată, bunăoară prin cromatografie pe schimbători de ioni sau Ni-chelare, sus de schimbare în soluția tampon reducătoare. Agenții de denaturare includ, dar fără a se limita la aceștia, ureea și guanidina clorhidrică. Proteina recombinată este apoi diluată de cel puțin circa 10 ori, e de dorit de circa 10 de ori, într-o soluție tampon de oxidare, care conține agentul de oxidare, cum ar fi, dar fără a fi limitați, 0,1 M tris-HCl, la pH 8,1 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 0,3 M glutacion oxidat. Proteina de fuziune este apoi incubată timp de circa 1 la circa 24 ore, de obicei circa 2 la circa 16 ore, la temperatura camerei, într-o soluție tampon de oxidare. Soluția tampon de oxidare poate conține un agent de stabilizare pentru proteină, bunăoară zahăr, alcool sau sulfat de amoniu. Agentul tampon de oxidare poate să mai conțină un agent chaotropic la o concentrație joasă, pentru a destabiliza interacțiunile intermoleculare incorecte și astfel se promovează multiplicarea proprie. Agenții chaotropici acceptabili includ, fără a se limita la ei, detergenți, polioli, B-arginină, guanidină clorhidrică și polietilen glicol (PEG). Important este să se utilizeze o concentrație scăzută suficient de agent chaotropic, pentru a evita denaturarea proteinei. Proteina remultiplicată poate fi concentrată prin cel puțin de 10 ori, e de dorit printr-o cantitate de diluare în soluția tampon de oxidare. Procesele de fermentație bacteriană pot fi astfel rezultatele preparării proteinei recombinante care conține niveluri neacceptabile de endotoxine. De aceea, invenția examinează separarea acestor endotoxine, cum ar fi prin utilizarea anticorpilor specifici endotoxinei sau altor molecule de legare a endotoxinelor. Prezența endotoxinelor poate fi determinată prin tehnici standard, cum ar fi prin utilizarea reactivelor E-TOXARE (Sigma, St. Louis, Missouri) sau prin bioanalize.

Pe lângă aceasta, relativ cu exemplele specifice, prezenta invenție examinează utilizarea sistemelor de exprimare a baculovirusului de mamifere și drojdie, pentru exprimarea proteinei ob. Bunăoară, sistemele de exprimare a baculovirusului, vectorii de transfer non-fuziune, cum sunt, fără a se limita la aceștia, pVL941 (BamHI) porțiunea clonată; Šimmers), pVL 1393 (BamHI, SmaI, XbaI, EcoRI, NotI, XmaII și porțiunea de clonare PstI, Invitrogen), pVL1392 (BgIII, PstI, XmaIII, EcoRI, XbaI, SmaI și porțiune de clonare BamHI; Šimmers și Invitrogen) și pBlue BacIII (BamHI, BgIII, PstI, NcoI și porțiune de clonare HindIII, cu screeningul posibil recombinat albasru/alb; Invitrogen) și vectorii de transfer, fuziune, cum ar fi, fără a se limita la aceștia, pAc700 (BamHI și porțiunea de clonare KpnI, în care porțiunea de recunoaștere BamHI începe cu codonul de inițiere; Šimmers), pAc701 și pAc702 (aceleași ca pAc700, cu diferența în cadrul de citire), pAc360 (BamHI) porțiunea de clonare, cu perechea de bază 36, în partea inferioară a codonului de inițiere a polihedrinei; Invitrogen (195) și pBlueBac His A, B, C (trei cadre

## MD 2311 G2 2003.11.30

26

diferite de citire, cu BamHI, BglII, PstI, NcoI și porțiunea de clonare HindIII, o peptidă N-terminal pentru ProBond purificare și screeningul recombinat pe plăci, albsatru/alb; Invitrogen (220)).

5 Vectorii de exprimare la mamifere, studiați pentru utilizare, conform prezentei invenții, includ promotorii, cum ar fi dihidrofolat reductaza promotor (DHFR), bunăoară orice vector de exprimare cu un vector de exprimare DHFR și un vector DHFR/metotrexat, de amplificare cum ar fi pED (PstI, SalI, SmaI și porțiunea de clonare EcoRI, cu un vector care exprimă atât gena clonată, cât și DHFR; vezi Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16, 12 (1991). Alternativ, un vector co-amplificator de glutamin sintetază/metionină/silfoximină, cum este pEE14 (HindIII, XbaI, SmaI, SbaI, EcoRI și BclI ca parte de clonare, în care vectorul exprimă glutamin sinteza și gena clonată; Celltech.). Într-o altă realizare, un vector care direcționează exprimarea epizomală sub control EBV-Epstein Barr Virus poate fi utilizat ca de exemplu o porțiune de clonare pREP4 (BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII și KpnI, promotorul constitutiv RSV-LTR, markerul selectabil higromicină; Invitrogen), pCEP 4 (BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII și KpnI), ca porțiuni de clonare, gena imediat apropiată, consecutivă hCMV, markerul selectabil de hidromicină; Invitrogen, pMEP4 (KpnI, PvuI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI, BamHI, ca porțiune de clonare, opromotorul genei Ila metalotioneină inductibilă, markerul selectabil de hidromicină; Invitrogen), pREP8 (porțiunea de clonare BamHI, XhoI, NotI, HindIII, NheI și KpnI, promotorul RSV-LTR, markerul selectabil histidinol; Invitrogen), pREP9 (porțiunea de clonare KpnI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI și BamHI, promotoul RSV-LTR, G418 ca marker selectabil; Invitrogen) și pEBVHis (promotorul RSV-LTR markerul selectabil de hidromicină peptida N-terminală ourificabilă perizina ProBond și cleavată prin enterochinază; invitrogen). Exprimarea vectorilor mamiferelor, sel tabili, pentru utilizare în prezenta invenție, include pRc/ CMV (porțiunea de clonare Hind III, BstXI, NotI, SbaI și ApaI, selecția G418; Invitrogen), pRc / RSV (porțiunea de clonare HindIII SpeI, BstXI, NotI, XbaI, selecția G418; Invitrogen) și altele Vectorii de exprimare pentru mamifere, vaccinia virus (vezi Kaufman 1991, supra), pentru utilizare conform invenției, include, fără a se limita la aceasta, pSCII (partea de clonare SmaI, TK și selecția  $\beta$ -gal), pMJ60I (porțiunea de clonare SalI, SmaI, AflI, Nari, BspMII, BamHI, ApaI, NheI, SacII, KpnI și HindIII selecția TK - și  $\beta$ -gal) și clonarea în porțiunea pTKgptFIS (EcoRI PstI, SalI, AccI, HindII, SbaI, BamHI și Hpa, selecția TK sau XPRT). Sistemele de exprimare în drojdie pot fi , așadar, utilizate, conform prezentei invenții, pentru exprimarea polipeptidei OB. Bunăoară vectorul de nefuziune pYES 2 (porțiunea de clonare XbaI, SphI, ShoI, NotI, GstXI, EcoRI, BstXI, BamHI, SacI, KpnI și HindIII Invitrogen) sau fuziunea pYESHisă, B, C (porțiunea de clonare XbaI, SphL, ShoI, NotI, BstXI, EcoRI, BamHI, SacI, KpnI și HindIII; peptida cu N-terminal este purificată cu rezina proBond și elevată cu enterochinază; Invitrogen) pentru a se menține numai două, acestea putând fi întrebuițate , conform prezentei invenții.

25 În continuare apare intenția ca analogii peptidei modulatora a greutateii corporale, să fie preparați din secvențe de nucleotide derivate în scopul prezentei invenții. Pe lângă aceasta, pentru exprimarea recombinată a polipeptidei OB, prezenta invenție avizează și permite prepararea polipeptidei OB sau a fragmentelor acesteia, aplicând tehnici superior dezvoltate și bine cunoscute pentru sinteza peptidei în fază solidă. Invenția examinează atât Boc popular, cât și Pmoc popular care se aplică de rând cu alte strategii a grupărilor de protecție, pentru prepararea polipeptidei sau fragmentelor acesteia. Tehnici diferite pentru remultiplificarea și oxidarea catenelor secundare de cisteină, pentru a se forma o legătură bisulfurică, sunt bine cunoscute în domeniu.

### Anticorpi la polipeptida OB

35 Conform prezentei invenții, Polipeptida OB produsă recombinat sau prin sinteză chimică, fragmentele sau derivații, analogii acesteia, incluzând proteinele de fuziune, se pot utiliza ca produse imunogene pentru a genera anticorpii de recunoaștere a polipeptidei OB. Astfel de anticorpi includ, fără a se limita doar la acestea, fragmentele Fab cu o singură catenă, chimerice, monoclonale, policlonale și colecția de exprimare Fab. O moleculă este "antigenică" atunci când e capabilă de o interacțiune specifică cu o moleculă antigenică de recunoaștere a sistemului imunitar, cum ar fi o imunoglobulină (anticorp) sau receptor antigenic celular T.O polipeptidă antigenică conține cel puțin circa 5 și de preferința cel puțin circa 10 aminoacizi. Porțiunea antigenică a moleculei poate fi acea porțiune care este imunodominantă pentru anticorp sau receptorul celular de recunoaștere T, sau acesta poate fi o porțiune utilizată pentru generarea anticorpului la moleculă, prin conjugarea porțiunii antigenice la molecula suport pentru imunizare. O moleculă care este antigenică, nu este necesar ca sa fie ea însăși imunogenică, adică să fie capabilă de elucidarea răspunsului imun, fără un suport. Un "anticorp" este o imunoglobulină, incluzând anticorpii și fragmentele lor, care se referă la epitopul specific. Termenul cuprinde anticorpi chimERICI, monoclonali și policlonali, dintre care, anticorpii chimERICI sunt descriși cu mai multe detalii în US Patent No. 4,816,397 și 4,816, 567, ca și porțiunile de legături antigenice ale anticorpilor, incluzând Fab, F(ab')<sub>2</sub> și F(v) (incluzând anticorpii cu cetene simple). În acest sens, fraza de "moleculă anticorp", în forme gramaticale diferite așa cum se aplică aici, se referă atât la molecula de imunoglobulină intactă, cât și la o porțiune activă imunologic din molecula de imunoglobulină conținând porțiunea de combinare a anticorpului. O "porțiune de combinare a anticorpului" este o porțiune structurală din molecula

## MD 2311 G2 2003.11.30

27

anticorpului care cuprinde o catenă grea și o catenă ușoară variabilă și regiuni hipervariabile care leagă specific antigenul.

Moleculile anticorp exemplare sunt molecule de imunoglobulină intacte, molecule de imunoglobulină substanțial intacte și acele porțiuni de moleculă de imunoglobulină care conțin paratopul, incluzând porțiunile cunoscute în domeniu, ca Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub> și F(v), porțiuni care sunt preferate pentru 5 utilizare în metodele terapeutice descrise aici. Porțiunile Fab și F(ab)<sub>2</sub> ale moleculelor de anticorp sunt preparate prin reacția proteolitică a pepsinei și pepsine respectiv, asupra moleculelor de anticorp intact substanțial, prin metode bine cunoscute. Vezi, bunăoară, US Patent No. 434 566, Theofilopolous et al. Porțiunile moleculei de anticorp Fab' sunt, așadar, bine cunoscute și sunt produse de porțiunile F(ab)<sub>2</sub> 10 urmând apoi reducerea legăturilor bisulfurice care leagă cele două porțiuni din catena grea, cu mercaptoetanolul, după care urmează alchilarea mercaptan proteinei rezultate, cu un reactiv, cum ar fi iodoacetamida. E preferabilă un anticorp care conține moleculele de anticorp intacte. Fraza "anticorp monoclonal" în diversele ei forme gramaticale, se referă la un anticorp având numai o specie de anticorp a cărei porțiune de combinare este capabilă de reacție imunologică cu un antigen special. Un anticorp 15 monoclonal prezintă de obicei o singură legătură de afinitate pentru oricare antigen, cu care acesta imunoreacționează. Un anticorp monoclonal poate să conțină deci o moleculă de anticorp având o pluralitate de porțiuni de combinare a anticorpului, fiecare fiind imunospecifică pentru diverși "antigeni, bunăoară un anticorp monoclonal bispecific (chimeric). Termenul de "adjuvant" se referă la un compus sau la un amestec care cuprinde un răspuns imun la un antigen. Un adjuvant poate să servească ca depozit 20 tisular care eliberează lent antigenul, devenind astfel un sistem activator limfoid care cuprinde răspunsul imun, nespecific (Hod et al. in Immunology, p.384, second ed., Benjamin/Gummings, Menlo Park, California (1984). Adesea, o primă încercare numai cu un antigen, în absența unui adjuvant, va conduce la elucidarea răspunsului imun celular sau humoral. Adjuvanții includ, dar fără a se limita la aceștia, adjuvantul complet Freund, adjuvantul incomplet Freund, saponina, gelurile minerele, cum ar fi 25 hidroxidul de aluminiu, agenții tensioactivi cum ar fi lizolecitina, polioli pluronici, polianionii, peptidele, emulsiile uleioase sau hidrocarbonate, hemocianinele limpet canelurate, dinitrofenolul și adjuvanții umani, potențial utilizatori ce BCG (*bacille Calmette-Guerin*) și *Corynebacterium parvum*. De obicei, adjuvanții sunt acceptabili farmaceutic. Diversele procedee cunoscute în domeniu, pot fi utilizate pentru producerea anticorpilor policlonali la polipeptida OB sau fragmente, derivați sau analogi ai acestora. 30 Pentru producerea unui anticorp, diversele animale gazdă pot fi imunizate prin injectarea cu polipeptida OB sau a derivatului acesteia (bunăoară proteina de fuziune sau un fragment al acesteia), incluzând, dar fără a se limita, iepuri, șoareci, șobolani, oi, capre, etc. Într-un aspect anumit, polipeptida OB sau fragmentele acesteia pot fi conjugate la suportul imunofenec, bunăoară serum albumina de bivine (SAB) sau hemocianina limpet canelurată (KLH). Diverși adjuvanți pot fi utilizați pentru creșterea răspunsului 35 imunologic, în dependență de speciile de celule gazdă, incluzând fără a se limita la, adjuvanții Freund (complet sau/și incomplet), geluri minerale, cum ar fi hidroxidul de aluminiu, substanțe tensioactive, ca lizolecitina, polioli pluronici, polianionii, peptidele, emulsiile uleioase, hemocianinele limpet canelurate, dinitrofenolul și adjuvanții umani potențial utilizatori, cum ar fi BCG (*bacille Calmette-Guerin*) și *Corynebacterium parvum*. Pentru prepararea anticorpilor monoclonali dirijați spre polipeptida OB, 40 fragmentele, analogii sau derivații acesteia, se poate utiliza orice tehnică care prevede producerea moleculelor de anticorpi, prin linii celulare continue, în cultură. Acestea includ, dar fără a se limita la tehnica hibridoma, dezvoltată original de Kohler et al. Nature, 256: 495-497 (1975), ca și tehnica trioma, tehnica hibridoma cu celule B umane (Kozbor et al. Immunology Today, 4: 72 (1983) și tehnica hibridoma EBV, pentru a se produce anticorpii monoclonali umani (Cole et al. in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan, R. Liss. Inc (1985)). Liniile celulare de producere e anticorpilor, 45 durabile, pot fi create prin tehnici diferite de tehnicile fuziunii, cum ar fi tehnica de transformare directă a limfocitelor B, cu ADN oncogen sau transferarea cu virusul Epstein-Barr.

A se vedea bunăoară M. Schreier et al. "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al. "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas" (1981); Kennett et al. "Monoclonal Antibodies" (1980); 50 vezi, așadar, US Patent No. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,451,570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632 și 4,493,890.

Intr-un aspect anumit adițional al prezentei invenții, anticorpii monoclonali pot fi produși la animalele fără germeni, aplicând o tehnologie recentă (PGT/US 90/02545), conform prezentei invenții, anticorpii 55 umani pot fi utilizați și pot fi obținuți prin utilizarea de hibridomas umane (Cote et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80: 2026-2023 (1983) sau prin transformarea celulelor B umane cu virusul EBV *in vitro* (Cole et al. 1985, supra). De fapt, conform prezentei invenții, tehnicile dezvoltate pentru producerea de "anticorpi chimerei" (Morrison et al. J. Bacteriol. 159-870 (1984); Neuberger et al. Nature 312: 604-608 (1984); Takeda et al. Nature, 314: 452-454 (1985)) prin legarea genelor de la molecula specifică de anticorp de șoarece, pentru polipeptida ob, la un loc cu genele de la molecula de anticorp 60 uman cu o activitate biologică acceptabilă, se pot utiliza; astfel de anticorpi sunt cei menționați în prezenta invenție. Astfel de anticorpi chimerei umani sau umanizați sunt preferați pentru utilizare în

## MD 2311 G2 2003.11.30

28

terapia maladiilor sau tulburărilor umane (descrise infra), deoarece anticorpii umani sau umanizați sunt mult mai puțin asemănători relativ cu anticorpii xenogenici, pentru a induce un răspuns imun, în special un răspuns alergic, prin ele însele. Potrivit prezentei invenții, tehnicile descrise pentru producerea anticorpilor cu catenă simplă (US Patent 4,946,778) pot fi adaptate pentru producerea anticorpilor cu o singură catenă specifică polipeptidei OB. O realizare adițională a prezentei invenții, aplică tehnicile descrise pentru construcția colecțiilor de exprimare Fab (Huse et al. Science, 246: 1275-1281 (1989)), pentru a permite o identificare rapidă și ușoară a fragmentelor Fab monoclonale, cu specificitatea ca urmare pentru polipeptida ob sau a derivațiilor sau analogilor acestora. Fragmentele de anticorpi care conțin idiotipul moleculei de anticorp, poate fi generate prin tehnici cunoscute. Bunăoară, astfel de fragmente, care includ, fără a se limita doar la acestea, fragmentul F(ab)<sub>2</sub> care poate fi produs de pepsina de digestie a moleculei de anticorp; fragmentele de Fab' care pot fi generate prin reducerea punților bisulfurice ale fragmentelor F(ab)<sub>2</sub> și fragmentelor Fab care pot fi generate prin tratarea moleculei de anticorp cu papiană și cu agentul de reducere.

În producerea anticorpilor, screeningul pentru anticorpii doriti, poate fi însoțit de tehnici cunoscute în domeniu, bunăoară prin radioimunoanaliza ELISA (analiza imunosorbantă cu legare enzimatică), imunoanalizele de tip "sandwich", analizele imunoradiometrice, reacțiile de precipitare, difuziune în gel, analizele de imunodifuziune, imunoanalizele *in situ* (aplicând bunăoară, marcarea radioizotopă sau enzimată, marcate cu aur coloidal, etc.), analize de absorbție Western, reacții de precipitare, analize de aglutinare (bunăoară, analize de aglutinare a gelului, analize de hemaglutinare), analize de fixare a complementului, analize de imunofluorescență, analize cu proteina A și analize de imunolectroforeză, etc. Într-un aspect anumit a prezentei invenții, anticorpii de legătură este detectat prin detectarea marcajului pe anticorpii primari. Într-o altă realizare, anticorpii primari este detectat prin legătura de detectare a anticorpului secundar sau al reactivului la anticorpii primari. Într-o altă realizare, anticorpii secundari este marcat. Se cunosc multe mijloace în domeniu pentru detectarea legăturii într-o imunoanaliză și care este în scopul prezentei invenții. Bunăoară, pentru selectarea anticorpilor care determină recunoașterea unui epitop specific al polipeptidei OB, se poate utiliza analiza care generează hybridomas, pentru producerea care se referă la polipeptida OB, fragmentul care conține acest epitop. Pentru selectarea unui anticorp specific unei polipeptide OB dintr-o specie anumită de animale, acesta poate fi selectat pe baza unei legături pozitive cu polipeptida OB exprimată sau izolată din celulele acestei specii de animal. Anticorpii menționați, pot fi utilizați în metodele cunoscute în domeniu, cu referire la localizarea și activitatea polipeptidei OB, bunăoară prin analiza de absorbție Western, formarea de imagine a polipeptidei OB *in situ* măsurarea nivelurilor acestora în probe fiziologice acceptabile, etc.

Într-un aspect anumit, anticorpii care neantagonizează sau antagonizează activitatea polipeptidei OB, pot fi generați. Astfel de anticorpi, pot fi testați, aplicând analizele descrise infra, pentru liganții de identificare.

Într-un anumit aspect, anticorpii sunt dezvoltați prin imunizarea iepurilor cu peptide sintetice, prezentate de secvența de proteină sau cu proteine recombinante, realizate prin utilizarea vectorilor de exprimare bacteriană. Selectarea peptidelor sintetice este realizată după analizarea cu atenție a structurii proteinei prezentate, așa cum s-a descris mai sus. În special, secvențele de peptide între porțiunile putative de clevaj, sunt de asemenea alese. Peptidele sintetice sunt conjugate la un suport cum ar fi KLH hemocianină sau SAB, aplicând carbodimida și aplicând adjuvantul. Freund pentru imunizarea iepurilor. În vederea preparării proteinei recombinante, vectorul pGEX, poate fi utilizat pentru exprimarea polipeptidei (Smith et al. 1988, supra). Alternativ, acesta se poate utiliza numai în domeniul hidrofile, pentru a genera fuziunea proteinei. Proteina exprimată, va fi depistată cantitativ și utilizată pentru imunizarea iepurilor în adjuvantul Freund. Într-o altă realizare specifică, polipeptida recombinată OB este utilizată pentru imunizarea puilor de găină și a anticorpilor anti-OB de pui de găină, care sunt separați din gălbenușul de ou, bunăoară, prin purificare prin afinitate, pe o coloană, a OB. De obicei, pui: de găină utilizați la imunizare, sunt menținuți în condiții specifice, fără patogeni (SPF). Într-o altă realizare, anticorpii pentru leptină sunt generați la șoarece ob/ob, la care este absentă proteina OB de circulație și astfel, aceștia sunt așteptați a fi capabili pentru generarea răspunsului polipeptidă anti OB, deoarece aceștia nu vor fi toleranți de polipeptidă și șoarecii de tip sălbatec. Celulele splenice din ambele grupe de șoareci, pot fi fuzionate cu celulele myeloma, pentru prepararea de hybridomas pentru anticorpii monoclonali. Într-o altă realizare, polipeptidele OB recombinante, se aplică pentru imunizarea iepurilor și anticorpilor policlonali, sunt imunizați și purificați sus de o altă utilizare. Anticorpii purificați, sunt utilizați în special pentru analizele semicantitative, în special pentru detectarea prezentei polipeptidei OB de circulație în ser sau plasmă.

Anticorpii monoclonali din tabele, produși relativ cu peptidele modulatorie, pot fi selectați după diverse proprietăți, bunăoară, izotip, epitop, afinitate, etc. Anticorpii monoclonali sunt de un interes special, pentru neutralizarea activității peptidelor modulatorie. Astfel de anticorpi monoclonali, pot fi identificați cu adevărat în analizele pentru activitatea acestora, ca modelatori de greutate. Anticorpii cu afinitate superioară, sunt, așadar, utili atunci când este posibilă purificarea prin imunoafinitate a

## MD 2311 G2 2003.11.30

29

modelatorului recombinat sau nativ. De obicei, anticorpii antimodulatori utilizați în metodele de diagnostic și terapeutice, conform prezentei invenții, este un anticorp policlonal purificat prin afinitate. Pe lângă aceasta, este preferabil ca, moleculele utilizate pentru anticorpii antimodulatori, să fie sub formă de porțiuni Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> sau F(v) ale întregilor molecule de anticorpi.

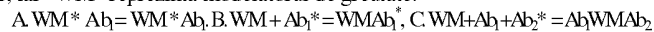
5 Implicațiile de diagnostic

Prezenta invenție se mai referă la o varietate de aplicații de diagnostic, incluzând metodele pentru detectarea prezentei condițiilor și (sau) stimulenților care influențează anormalitățile greutateii corporale sau adipozității, prin referințe în cea ce privește capacitatea acestora de a elucida activitățile care sunt mediate prin prezența modelatorilor. Așa cum s-a menționat mai sus, peptidele modulatori de greutate, pot fi utilizate pentru producerea anticorpilor în ele însele, printr-o varietate de tehnici cunoscute și astfel de anticorpi ar putea fi apoi izolați și utilizați ca în testele pentru prezența unei activități speciale de transcriere în celulele țintă, suspectate. Alternativ, acizii nucleici, conform prezentei invenții, pot fi utilizați în diagnostic.

Diagnoza pe bază de anticorp .

15 Așa cum s-a demonstrat mai sus, o metodă aplicată de diagnostic din prezenta invenție, cuprinde examinarea unei probe sau al unui mediu celular, cu ajutorul unei analize, incluzând o cantitate eficientă de antagonist relativ cu proteina modelator, cum ar fi un anticorp antimodulator, de obicei un anticorp policlonal purificat prin afinitate și mult mai preferabil un mAb. Pe lângă aceasta, este preferabil ca, pentru moleculele de anticorpi antimodulatori utilizate aici, acestea fiind, bunăoară, sub formă de porțiuni de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, sau F(v), sau de molecule de anticorpi, întregi. Așa cum s-a menționat mai sus, pacienții capabili de a beneficia de această metodă, incluzând pe cei suferind de cancer, SIDA, obezitate sau alte condiții de anormalitate a greutateii corporale, reprezintă un element sau un factor caracteristic. Metodele pentru izolarea modelatorului și inducerea anticorpilor antimodulatori pentru determinarea și optimizarea abilității anticorpilor antimodulatori, pentru a ajuta la examinarea celulelor țintă, sunt bine cunoscute în domeniu. , așadar, anticorpii care includ atât anticorpii policlonali, cât și anticorpii monoclonali și medicamentele care modulează producerea sau activitatea modelatorilor de control a greutateii și a altor factori de recunoaștere și /sau a subunităților acestora, pot poseda anumite aplicații de diagnostic și pot fi utilizați în scopul de detectare și /sau măsurare a condițiilor de anormalitate a greutateii corporale, putând fi dezvoltate în mod asemănător. Bunăoară, peptidele modulatori sau fragmentele active ale acestora, pot fi utilizate pentru a se produce atât anticorpi policlonali, cât și anticorpi monoclonali pentru ele însele, într-o varietate de medii celulare, de tehnici cunoscute, cum ar fi utilizarea tehnicii hybridoma, în limfocitele fuzionate din splina de șoarece și celule myeloma. Aceste tehnici sunt descrise în detalii, în continuare. În mod asemănător, moleculele mici care mimează sau antagonizează activitatea sau activitățile factorilor de recunoaștere a receptorilor, conform prezentei invenții, pot fi descoperite și sintetizate și pot fi utilizați în protocoalele de diagnostic și /sau terapeutice.

Prezența modelatorilor de greutate în celule, poate fi stabilită prin procedee imunologice uzuale, aplicabile la aceste determinări. Se cunosc mai multe de astfel de procedee aplicate. Trei din aceste procedee, care sunt în special aplicate, aplică fie un factor de recunoaștere a receptorului marcat cu un marcaj detectabil, un anticorp Ab<sub>1</sub>, marcat cu un marcaj detectabil sau anticorpii Ab<sub>2</sub>, marcat cu un marcaj detectabil. Procedeele pot fi prezentate prin următoarele ecuații în care asteriscul indică marcarea acestei particule, iar "WM" reprezintă modelatorul de greutate:



45 Procedeele și aplicațiile acestora sunt cunoscute în domeniu și în acest sens pot fi utilizate în scopul prezentei invenții. Procedeele "competitiv". Procedeele A, este descris în U.S. Patent No. 3,654,090 și 3,850,752. Procedeele B este reprezentativ pentru tehnici de analiză competitivă, cunoscute. Procedeele C, procedeele "sandwich", este descris în U.S. Patent No. RE 31,066 și 4,016,043. De asemenea, alte procedee sunt cunoscute, cum ar fi procedeele "anticorp dublu" sau "DASP".

50 În fiecare caz, modelatorii de greutate din complexii cu unul sau mai mulți anticorpi sau parteneri de legătură și un membru al complexului, este marcat cu un marcaj detectabil. Faptul că s-a format un complex, după dorință, se poate determina cantitatea acestuia, prin metode cunoscute aplicabile pentru detectarea acestui marcaj. Din cele de mai sus se poate vedea că, proprietatea caracteristică a Ab<sub>2</sub> este că aceasta va reacționa cu Ab<sub>1</sub>. Aceasta este din cauza faptului că Ab<sub>1</sub> care se dezvoltă într-o specie de mamifere, a fost utilizat într-o alta specie ca antigen, pentru dezvoltarea anticorpului Ab<sub>2</sub>. Bunăoară, Ab<sub>2</sub> se poate dezvoltă la capre, aplicând ca antigeni, anticorpi de iepure. Ab<sub>2</sub> va fi, așadar, un anticorp antiiepure dezvoltat la capre. În scopurile acestei descrieri și pentru revendicări, Ab<sub>1</sub> se va referi la anticorpii primari sau la anticorpii antimodulatori de greutate și Ab<sub>2</sub> va fi preferat la un al doilea anticorp anti-Ab<sub>1</sub>.

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

## MD 2311 G2 2003.11.30

30

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

Enzimele pentru marcare sunt de asemenea aplicată și pot fi detectate prin oricare tehnică utilizată în  
prezent, colorimetrică, spectrofotometrică, fluorospectrofotometrică, amperometrică sau gazometrică.  
10 Enzima este conjugată la particula selectată, prin reacția cu moleculele la care aceasta se referă, cum ar fi,  
carboimidele, diizocianții, gluteraldehida și altele. Multe enzime care pot fi utilizate în aceste procedee  
sunt cunoscute și pot fi utilizate. Preferate sunt peroxidaza,  $\beta$ -glucuronidaza,  $\beta$ -D-glucozidaza,  $\beta$ -D-  
galactozidaza, ureaza, glucozoxidaza plus peroxidaza și fosfatasa alcalină. U.S. Patent No. 3,654,090;  
3,850,752 și 4,016,043 se referă la aceste enzime, la metodele și materialul adițional de marcare. Potrivit  
15 altui aspect a prezentei invenții, chiturile de testare pentru utilizarea lor de către un specialist medical, pot  
fi preparate pentru determinarea prezenței sau absenței activității de transcriere predeterminată sau a  
activității, capabilității de transcriere predeterminată, în celulele țintă, suspectate. Potrivit cu tehnicile de  
testare menționate mai sus, o clasa de astfel de chituri, va conține cel puțin modelatorul de greutate marcat  
sau partenerul de legătură al acestuia, bunăoară un anticorp specific și direcțiile, desigur în dependență de  
20 metoda selectată, bunăoară, "competitiv", "sandwich", "DASP" și altele. Aceste chituri pot conține, așadar,  
reactivi periferici cum ar fi stabilizatorii, soluțiile tampon, etc.

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

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

(b) alți reactivi;

(c) direcțiile pentru utilizarea acestor chituri.

Mai mult decât atât, chitul de testare diagnostică, poate cuprinde:

(a) o cantitate aplicată deja de modelator de greutate, așa cum s-a descris mai sus (sau partener de  
30 legătură), care este în fond legat la faza solidă, pentru a forma un imunosorbent sau alternativ, la un capăt  
acceptabil sau la produse cu mai multe astfel de capete, etc. (sau partenerii lor de legătură) unui din  
fiecare;

(b) dacă este necesar, alți reactivi;

(c) direcțiile de utilizare ale acestor chituri de testare.

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

(a) o componentă de marcare care a fost obținută prin cuplarea modelatorului de greutate, la marcajul  
40 detectabil;

(b) unul sau mai mulți reactivi imunochimici adiționali, din care cel puțin un reactiv este liant sau un liant  
imobilizat, liant care este selectat dintr-o grupă alcătuită din:

(i) un liant capabil de legare cu un component marcat (a);

(ii) un liant capabil de legare cu partenerul de legătură și componentei marcate (a);

45 (iii) un liant capabil de legare cu cel puțin un component care trebuie determinat;

(iv) un liant capabil de legare cu cel puțin un partener de legătură a cel puțin unui component (componente)  
care trebuie determinat;

(c) direcțiile pentru realizarea procesului pentru detectarea și (sau) determinarea unui component sau a  
50 mai multor componente a reacției imunochimice, între modelatorul de greutate și partenerul de legare  
specifică a acestuia.

Diagnoza pe baza de acid nucleic. Așa cum s-a demonstrat în exemple, infra, acizii nucleici ai  
prezentei invenții, pot fi utilizați pentru detectarea defectelor asociate cu defectele polipeptidice OB, care  
rezultă în fenotipurile obeze. Bunăoară, probele de acid nucleic (bunăoară analiza Northern sau RT-PCR  
55 analize), se pot utiliza pentru determinarea fenotipului obez care este asociat cu absența exprimării OB  
mARN sau a exprimării OB mARN nefuncționale, bunăoară ca în cazul db/db la șoareci (în care  
deficiența rezultă din absența receptorului OB) sau acolo unde o mutație, produce un mARN netranscris.  
Mai mult decât atât, tehnicile de diagnostic pe baza de acid nucleic, conform prezentei invenții, pot fi  
utilizate în conjuncție cu tehnicile bazate pe anticorpi, pentru a dezvolta în continuare, înțelegerea  
moleculară a fenotipurilor obeze și anorexie. Clonele cADN umane care au fost recent izolate, au fost  
60 secvenționate, așa cum s-a menționat aici, aceasta facilitează determinarea secvenței complete a genei  
umane (vezi figura 20 A...C; SEQ ID No. 22). Secvențele de ADN din intronii genei umane OB, au fost

## MD 2311 G2 2003.11.30

31

obținute (Figura 20) și au fost utilizate pentru prepararea primerilor PCR, pentru a amplifica PCR în secvența de codificare a genei OB din ADN-ul genic uman, identificându-se astfel mutațiile sau variantele alelice ai genei OB, toate în conformitate cu procesul descris în detaliu, mai sus. Primerii PCR specifici pentru amplificarea OB genic uman, sunt descriși în exemplul specific, infra. Ipoteza curentă este că, mutațiile de heterozigoți în gena ob, vor fi asociate cu diversele teste de diagnostic pe baze secvenței ADN, pentru obezitate. Dacă aceasta este adevărată, se va permite deci stabilirea riscului de dezvoltare a obezității la individ și se face posibilă aplicarea tratamentului medicamentos și (sau) schimbările în stilul de viață, sus ca greutatea corporală crescută, să fie complet dezvoltată.

Alternativ, prezența microsateleților care segreghează cu formele de mutații ale OB umane, poate fi utilizată pentru diagnoza. Diverși primeri PCR, incluzând pe cei bazați pe secvența de nucleotidă, sunt prevăzuți în figura 20 A...C, putând fi utilizați în acest scop. Gena OB poate fi, așadar, aplicată în diagnoza măsurătorilor ARN-ului și proteinei conținute, în cea ce privește tulburările nutriționale. Aceasta va fi important să se cunoască, într-o tulburare nutrițională specială, atunci când OB ARN și (sau) proteina conținută este neregulată sau având o reglare inferioară. Astfel, dacă o persoană obeză are nivelurile de OB crescute, se pare că problema este în dependență de partea inferioară a OB, în timp ce, dacă OB este redusă, se pare că, nivelurile scăzute necorespunzător, pentru OB, pot constitui cauza obezității (dacă defectul este sau nu legat de gena OB). În sens invers, dacă pacientul suferind de cancer sau SIDA cu pierdere în greutate are niveluri ridicate de OB, se ajunge la concluzia ca, exprimarea superioară necorespunzătoare a OB, este responsabilă de pierderea în greutate. cADN-ul uman clonat va fi utilizat pentru măsurarea nivelurilor de OB ARN uman. Pe lângă aceasta, proteina umană recombinată, va fi depistată și utilizată pentru dezvoltarea imunoanalizelor care permit măsurarea nivelurilor de grăsime și posibil, de plasmă ale proteinelor OB.

### Implicații terapeutice

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

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

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

Reducerea activității polipeptidei OB (prin dezvoltarea neantagoniștii, inhibitorilor, utilizarea anticorpilor de neutralizare sau moleculelor contrasens) va rezulta în câștigul de greutate care poate fi dorit pentru tratamentul pierderilor în greutate asociate cu cancerul SIDA sau anorexia nervoasă. Modelarea activității OB poate fi aplicată pentru reducerea greutății corporale (prin creșterea activității acesteia) sau pentru creșterea greutății corporale (prin scăderea activității acesteia).

Tratamentul terapeutic pe bază de polipeptide. Prin cea mai simplă analiză, gena OB determină greutatea corporală la mamifere, în special la șoareci și la om. Producții genetice OB și corespunzător moleculele analoge, apar ca făcând parte din modul de semnalizare prin care țesutul adipos, comunică cu creierul și cu alte organe. Se crede că, polipeptida OB este ea însăși o moleculă de semnalizare, bunăoară un hormon. Polipeptida OB sau un fragment funcțional al acesteia sau antagonistul acesteia, poate fi administrat oral, sau parenteral, de obicei parenteral. Deoarece homeostaza metabolică este un proces continuu, e preferabilă administrarea cu eliberare controlată a polipeptidei OB. Bunăoară, polipeptida poate fi administrată aplicând infuzia intravenoasă, o pompă osmotică implantabilă, un emplastru transdermal, lipozomi sau alte moduri de administrare. Într-un aspect anumit, o pompă poate fi utilizată

## MD 2311 G2 2003.11.30

32

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

Intr-un alt aspect, celulele recombinante care au fost transformate cu gena OB și care exprimă niveluri ridicate de polipeptidă, pot fi transplantate la subiectul care necesită polipeptida ob. De obicei, celule analoage transformate cu OB sunt transplantate pentru a se evita rejecția; alternativ, o tehnologie este acceptabilă pentru a proteja celulele non-autologe care produc factori solubili în matricea polimerului, care previn rejecția și recunoașterea imună. Polipeptida OB poate fi administrată pe căi intravenoase, intraarteriale, intraperitoneale, intramusculare sau subcutanate. Alternativ, polipeptida OB, cu formulare proprie, poate fi administrată pe cale nazală sau orală. O furnizare constantă de polipeptidă OB se poate asigura prin prevederea unei doze eficiente terapeutice (bunăoară o doză eficientă pentru a induce schimbările metabolice, la subiect), la intervalele necesare, bunăoară zilnic, la fiecare 12 ore, etc. Acești parametri vor depinde de severitatea condiției de boală care trebuie tratată, alte acțiuni, cum ar fi modificarea dietei, care se implementează în cea ce privește greutatea, vârsta și sexul subiectului și alte criterii, care vor fi în mod real determinate conform standardelor de bună practică medicală a specialiștilor în domeniu.

### Compoziții farmaceutice

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

Administrarea pe cale orală. Pentru utilizarea în prezenta invenție, sunt studiate formele de dozare orală, solide, care sunt descrise în fond, în Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990 Mack Publishing Co. Easton PA 18042) la capitolul 89, ce este încorporat aici prin referințe. Formele de dozare solide include tablete, capsule, pilule sau tablete rombice, cașete sau palete, așadar, încapsularea lipozomică sau proteinoasă, poate fi utilizată pentru formularea compozițiilor prezente (bunăoară, microsfețele poteninoide, prezentate de US Patent No. 4,925,673). Încapsularea lipozomică poate fi utilizată și lipozomii pot fi derivați, aplicând diferiți polimeri (bunăoară US Patent No. 5,013,556). O descriere a formelor de dozare posibile pentru terapie, sunt date de Marshall, în Modern Pharmaceutics, Chapter 10, Banker and Rhodes ed. (1979), încorporate aici prin referințe. În fond, formularea include proteina (sau proteina modificată chimic) și ingredientele inerte care o protejează în trecerea prin zona stomacală și astfel se permite eliberarea materialului biologic activ în intensiv. Se examinează în special formele de dozare orale ale derivaților de proteine de mai sus. Proteina poate fi modificată chimic, astfel ca eliberarea orală a derivatului să fie eficace. În fond, modificarea chimică studiată este legarea a cel puțin o jumătate la proteină (sau peptidă în însăși molecula acesteia, unde acea jumătate permite (a) inhibarea proteolizei); și (b) absorbția în circulația sanghină, din stomac sau intestin. Se dorește, așadar, creșterea stabilității genele a proteinei și creșterea timpului de circulație în organism. Exemple de astfel de jumătăți, includ: polietilen glicolul, sopolimerii de etilen glicol și propilen glicolul,

## MD 2311 G2 2003.11.30

33

carboximetil, celuloza, dextranul, polivinil alcolul, polivinil pirolidona și poliprolina. Abuchowski et. al. 1981, supra; Newmark et. al, J. Appl. Biochem, 4:185-189 (1982). Alți polimeri care pot fi utilizați, sunt poli-1,3-dioxolanul și poli-1,3,6-tioxocanul. Pentru utilizare farmaceutică, e preferabilă, așa cum s-a indicat mai sus, jumătățile de polietilen glicol. Pentru proteina (sau derivatul acesteia), localizarea eliberării poate fi stomacul, intestinul subțire (diodenul, jejunul sau ileum) sau intestinul gros. Specialiștii au formule acceptabile care nu se vor dizolva în stomac, acestea eliberând materialul în duoden sau de asemenea în intestin. De obicei, eliberarea va evita efectele dăunătoare asupra regiunii stomacale, fie prin protecția proteinei (sau a derivatului acesteia) sau prin eliberarea unui material biologic activ peste zona stomacală, cum ar fi în intestin. Pentru a asigura rezistența completă în zona stomacală, un înveliș impermeabil la un pH de cel puțin 5,0, este esențial. Exemple de ingrediente inerte mult mai comune care sunt utilizate ca învelișuri enterice, sunt acetatul de celuloză trimelitat (CAT), hidroxipropilmetilceluloza ftalat (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, polivinil acetat ftalat (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, celuloză acetat ftalat (CAP), Eudragit L, Eudragit S și Shellac. Aceste învelișuri pot fi utilizate ca filme mixte. Un înveliș sau un amestec de învelișuri se poate utiliza pentru tablete, care nu sunt prezentate pentru protecție relativ cu stomac. Acest înveliș poate include zahăr sau unele învelișuri fac ca tablete să fie mai ușor înghițite. Capsulele pot fi formate dintr-un înveliș tare (cum ar fi învelișul de gelatină) și conțin substanța terapeutică uscată, cum ar fi pulberile pentru a forma lichide, se poate utiliza un înveliș moale de gelatină. Materialul pentru învelișul cașetelor, poate fi un amidon consistent sau alte substanțe comestibile. Pentru pilule, tablete rombice, tablete tunate sau tablete triturate, se pot utiliza tehnici de masare umedă. Substanțele terapeutice pot incluse în formulă, ca multiparticule final sub formă de granule, paletă sau particule cu dimensiuni de circa 1 mm. Formula materialului pentru administrarea capsulei, poate fi, așadar, sub formă de pulbere, matrițe pentru comprimare ușoară sau chiar tablete. Medicamentul poate fi preparat prin comprimare. Se pot include de asemenea coloranți și agenți de aromatizare. Bunăoară, proteina (sau derivații acesteia) poate fi formulată (cum ar fi prin încapsulare de microsferă sau lipozomi) și apoi produșii conține o substanță comestibilă, cum ar fi agenții de aromatizare și băuturi răcoritoare conținând coloranți. Se poate dilua sau spori volumul substanței terapeutice, cu un material inert. Acești diluanți pot include carbohidrații, în special manitolul, alfa-lactoza, lactoza anhidră, celuloza, sucraza, dextranii modificați și amidonul. Anumite săruri anorganice, pot fi de asemenea utilizate ca materiale de umplură, incluzând trifosfatul de calciu, carbonatul de magneziu și clorura de sodiu. Unii diluanți comerciali acceptabili sunt Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress și Avicell. Substanțele de dezintegrare pot fi incluse în formula de medicament. într-o formă de dozare, solidă. Materialele utilizate ca dezintegrați, sunt fără a se limita la acestea, amidonul incluzând dezintegrații comerciali pe bază de amidon, Explotab. Se pot utiliza glicolatul de amidon sodiu, amberlita, carboximetilceluloza sodică, ultramilopectina, alginatul de sodiu, gelatina, coajă de portocale, acid carboximetil celuloză, sponge naturală și bentonită. Alte forme de dezintegrați sunt rezinele insolubile, schimbătoare de cationi. Gumele sub formă de pulberi, pot fi utilizate ca dezintegrați și ce agenți de legătură și aceștia pot include gume sub formă de pulberi cum este agar, Karaya sau tragecenta. Dezintegrați utilizatori sunt acidul alginic și sarea de sodiu. Agenții de legătură pot fi utilizați, pentru a menține la un loc agentul terapeutic, pentru a forma o tabletă tare și include materiale din produse naturale cum este acacia, tragacenta, amidonul și gelatine. Alte materiale includ metil celuloza (MC), etil celuloza (EC) și carboximetil celuloza (CMC), polivinilpirolidona (PVP) și hidroxipropilmetil celuloze (HPMC) care pot fi utilizate în soluții alcoolice prin granulara substanței terapeutice. Un agent antifricțional se poate include în formula medicamentului, pentru prevenirea aglomerării în timpul procesului de preparare. Lubrifianții pot fi utilizați ca un strat între substanța activă și peretele matriței și aceștia pot include, dar fără a se limita la: acidul stearic conținând săruri de magneziu și calciu, politetrafluoretilen (PTFE), parafină lichidă, uleiuri vegetale și ceruri. Lubrifianții solubili pot fi de asemenea utilizați, cum ar fi sulfatul laurii de sodiu, sulfatul laurii magneziu, polietilenglicolul de diferite greutate moleculare și Carbowaxul 4000 și 6000. Glisanții care pot îmbunătăți proprietățile de curgere ale medicamentului în timpul formulării și pot ajuta rearanjarea în timpul comprimării, pot fi de asemenea adăogați. Glisanții pot include amidonul, talcul, silicea pirogenică și silicoaluminatul hidratat. Pentru a ajuta dezvoltarea substanței terapeutice în mediul apos, se poate adăoga un agent tensioactiv sau un agent de umectare. Agenții tensioactivi pot include detergenți anionici, cum ar fi sulfatul lauril sodic, dioctil sodiu sulfosucinatul și dioctil sodiu sulfonatul.

Detergenții cationici pot fi utilizați și pot include clorura de benzalconiu sau clorura de benzetoniu.

Lista detergenților neionici potențiali care ar putea fi incluși în formulă ca agenți tensioactivi: este formată din lauromacrogol 400, polioxil 40 stearat, polioxietilen hidrogenat, ulei de ricin 10, 50 și 60, glicerol monostearat, polisorbitat 40, 60, 65 și 80, esterul sucrozei cu acid gras, metil celuloza și carboximetil celuloza. Acești agenți tensioactivi ar putea fi prezenți în formulă împreună cu proteina sau derivatul acesteia, fie singur sau în amestec de diferite proporții. Aditivii care determină o creștere potențială a absorbției proteinei (sau derivatului acesteia), sunt bunăoară acizi grași, ca acid oleic, acid linolenic și acid linoleic. Se pot utiliza după dorință, formula pentru eliberarea controlată a medicamentului.

## MD 2311 G2 2003.11.30

34

5 Medicamentul poate fi incorporat într-o matriță inertă care permite eliberarea lui bunăoară, prin  
mecanisme de difuziune sau mecanisme de extracție prin solubilizare, gume, etc. Astfel de matrițe pentru  
degenerare lentă, pot fi de asemenea, încorporate în formulă. O altă formă de eliberare controlată a  
medicamentului este metoda bazată pe sistemul terapeutic Oros (Alza Corp.), bunăoară medicamentul  
10 este conținut în membrana semipermeabilă care permite apei să intre și să preseze medicamentul în  
exterior, printr-un singur orificiu mic, din cauza afectelor osmotice. Unele învelișuri enterice au de  
asemenea efecte de întârziere a eliberării medicamentului. Alte învelișuri pot fi utilizate de asemenea  
pentru aceste formule. Aceste învelișuri includ o varietate de zaharuri care ar putea fi aplicate în utilajul  
de acoperire. Agentul terapeutic ar putea fi de asemenea dat ca tablete acoperite de filma, materialele  
15 utilizate în acest caz, fiind împărțite în două grupe. Prima grupă conține materiale neenterice și include  
metilceluloza, etilceluloza, hidroxietilceluloza, metilhidroxietilceluloza, hidroxipropilceluloza,  
hidroxipropilmetilceluloza, carboximetilceluloza sodică, providone și glicolicii poletilenici. A doua grupă  
constă din materiale eterice, care sunt esteri obișnuiți și acidului falic. Se poate utiliza de asemenea un  
amestec de materiale, pentru a se prevedea un film de acoperire optim. Filmul de acoperire poate fi  
preparat în utilajul de acoperire sau în pat fluidizat sau prin acoperire prin comprimare.

15 Eliberarea pulmonară. Așa cum este menționat aici, eliberarea pulmonară a prezentei proteine (sau  
derivaților proteinei). are loc la nivelul plămânilor unui mamifer plămânilor unui mamifer în timpul  
inhalării și traversării medicamentului prin epitelul pulmonar, în circulație sanghină. Alte referiri, includ  
pe Adjei et. al., *Pharmaceutical Research*, 7(6): 565-569 (1990); Adjei et. al. *International Journal of*  
20 *Pharmaceutics*, 63: 135-144 (1990) (acetat de leuproliide). Braquet et. al. *Journal of Cardiovascular*  
*Pharmacology*, 13 (suppl. 5): 143-146 (1989) (endotelin-1); Hubbard et. al. *Annals of Internal Medicine*,  
3(3): 206-212 (1989) (alfa 1-antitripsină); Smith et. al. *J. Clin. Invest.* 84: 1145-1146 (1989) (alfa 1-  
proteinaze); Oswein et. al. "Aerosolization of Proteins", *Proceeding of Symposium on Respiratory Drug*  
25 *Derivery* 11, Keystone, Colorado (March 1990) (recombinat human growth hormone); Debs et. al. *J.*  
*Immunol.* 140: 3482-3488 (1988) și Platz et. al, US Patent No. 5,284,656 (granulocyte colony stimulating  
factor). Pentru utilizare practică, conform prezentei invenții, sunt studiate o gamă largă de dispozitive  
mecanice desemnate eliberării pulmonare a produselor terapeutice, fără a se limite la acestea, incluzând  
nebulizatori, dispozitive de inhalare cu doze măsurate și dispozitive de inhalare a pulverilor, din care toate  
sunt cunoscute în domeniu.

30 Câteva exemple specifice de dispozitive comerciale acceptabile prepararea practica acestei invenții  
sunt nebulizatorul Ultravent, fabricat de Mallinckrodt, Inc. St. Louis, Missouri; nebulizatorul Acorn II,  
fabricat de Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; inhalatorul Ventolin pentru doze măsurate  
fabricat de Glaxo Inc. Research, Triangle Park, North Carolina și inhalatorul de pulberi Spinhaler fabricat  
de Fisons Corp. Bedford, Massachusetts.

35 Toate aceste dispozitive sunt necesare pentru utilizarea acestor formule acceptabile, pentru  
distribuirea proteinei (sau derivatului acesteia). Tipic, fiecare formulă este specifică tipului de dispozitiv  
utilizat și poate cuprinde utilizarea unui material propellant acceptabil, în aditie cu diluanții uzuali,  
adjuvanții și (sau) vehiculele aplicată în terapie. Așadar, utilizarea lipozomilor microcapsulelor sau  
microsferelor, compleșilor de incluziune sau a altor tipuri de vehicule, este de asemenea studiată.  
40 Proteina modificată chimic, poate fi, așadar, depistată în diferite, în dependență de tipul de modificare  
chimică sau de tipul dispozitivului utilizat. Formulele acceptabile pentru utilizare cu nebulizatori, cu jet  
sau cu ultrasunet, vor cuprinde de obicei, proteina (sau derivatul acesteia, dizolvată în apă, la concentrația  
de circa 0,1 ... 25 mg de proteină activă biologic, per mililitru de soluție. Formula poate, așadar, să  
conțină o substanță tampon și un zahăr simplu (bunăoară pentru stabilizarea proteinei și reglarea presiunii  
45 osmotice). Formula pentru nebulizator, poate conține un agent tensioactiv, pentru a reduce sau preveni  
agregarea indusă la suprafață a proteinei, cauzată de atomizarea soluției, în formarea aerosolului.  
Formulele pentru utilizare cu dispozitivul de dozare măsurată, va cuprinde în fond pulberea divizată  
conținând proteina (sau derivatul acesteia) suspendată într-un carburant, cu ajutorul unui agent  
tensioactiv. Carburantul poate fi orice material convențional utilizat pentru acest scop, cum ar fi  
50 clorlorcarbon, hidroclorlorcarbon, hidroflorcarbon sau hidrocarbon, incluzand triclolorformetanol,  
diclorodiflormetanol, diclorotetrafloretanol și 1,1,1,2-tetrafloretanol sau combinațiile lor. Ca agenți  
tensioactivi acceptabili, se aplică sorbitanul trioleat și lecitina soia. Acidul oleic poate fi de asemenea  
utilizat ca agent tensioactiv. Formulele pentru dispensarea pulberii din dispozitivul de inhalare, vor  
cuprinde pulberea uscată, fin divizată care conține proteina (sau derivatul acesteia) și care poate conține  
55 un agent de voluminizare cum este lactoza, cum este lactoza, sorbitolul, sucroza sau menitolul, în cantități  
care să faciliteze dispersarea pulberii din acest dispozitiv, bunăoară de la 50% la 90% în greutatea  
formulei. Proteina (sau derivatul) va fi depistată cel mai avantajos, într-o formă de macroparticulă cu o  
dimensiune medie a particulei mai mică de 10 μm (sau microni), cel mai preferabil 0,5...5 μm, pentru cea  
60 mai eficientă eliberare în plămânilor distal.

## MD 2311 G2 2003.11.30

35

Eliberarea nazală. Se examinează de asemenea eliberarea nazală a proteinei (sau derivatului acesteia). Eliberarea nazală permite trecerea proteinei în circuitul sanghin direct, după administrarea produsului terapeutic, în nas, fără a fi necesară depunerea produsului la nivel pulmonar. Formulele pentru eliberare nazală, includ formulele cu dextran sau ciclodextran.

5 Metodele de tratament, metodele de preparare a medicamentului. Într-un alt aspect al prezentei invenții, metodele de tratament și de preparare a medicamentului, sunt prezentate. Condițiile îmbunătățite sau modulate prin administrarea prezenților derivați, sunt cele indicate mai sus.

10 Dozare. Pentru toate moleculele menționate mai sus, așa cum se examinează în următoarele studii, informația va apărea cu privire la niveluri de dozare acceptabile pentru tratamentul diferitelor condiții la diferiți pacienți și specialiști în domeniu, luând în considerație contextul terapeutic, vârsta și starea generală a individului, vor fi capabili să stabilească propriul dozaj. În fond, pentru injecție sau infuzare, dozajul va fi cuprins între 0,01 μg de proteină biologic activă/kilogram greutate corporală (calculând numai masa de proteină, fără o modificare chimică) și 10 mg/kg (pe aceeași bază). Schema de dozare poate varia în dependență de timpul de înjumătățire în circulația sanghină a proteinei sau derivatului

15 utilizat, când polipeptida este eliberată din doza bolus sau prin infuzare continuă, din formula utilizată. Administrarea cu alți compuși. Pentru terapia asociată cu obezitatea, se poate administra prezenta proteină (sau derivații acesteia) în conjuncție cu una sau mai multe compoziții farmaceutice, utilizate pentru tratamentul altor complicații clinice ale obezității, cum ar fi cele utilizate pentru tratamentul diabetului (bunăoară insulină) a presiunii sanghine ridicate, colesterolului ridicat și a altor condiții

20 adverse, incidente obezității, așadar, se pot co-administra supresanți de apetit, bunăoară amfetamine. Administrarea poate fi simultană (bunăoară administrarea unui amestec din proteina prezentă și insulină) sau poate fi – în seriatim. Tratamentul terapeutic pe bază de acid nucleic. Gena OB poate fi introdusă în celulele de grăsime umană, pentru dezvoltarea terapiei genetice, în

25 obezitate. O astfel de terapie, ar fi de așteptat, să scadă greutatea corporală. Invers, introducerea unor elemente de construcție contrasens în celulele de grăsime umane, ar reduce nivelurile de polipeptidă OB activă și ar fi prezentate pentru creșterea adipozității corporale. Într-un aspect anumit, gena care cuprinde polipeptida OB, este introdusă – *in vivo* – în vectorul viral. Astfel de vectori includ un virus atenuat sau deficient ADN, cum ar fi, dar fără a se limita la, virusul simplex (HSV), papiloma, virusul Epstein Barr (EBV), adenovirusul, virusul adenoasociat și altele. Virusii deficienți, la care lipsesc în totalitate sau

30 parțial genele virale, sunt preferate. Virusul deficient, nu este infectiv după introducerea în celulă. Utilizarea vectorilor virali deficienți, permite administrarea în celulă într-o zonă specific localizată, fără a însemna că vectorul poate infecta alte celule. Astfel, țesutul adipos poate fi țintit în special. Ca exemple de vectori speciali, sunt cei care includ,

35 fără a se limita la virusul herpes deficient I (HSV1) vector, (Kaplitt et. al. Molec. Cell. Neurosci. 2: 320-330 (1991)), un vector de adenovirus atenuat, cum ar fi vectorul descris de Stratford-Perricaudet et. al. J. Clin. Invest. 90: 626-630 (1992) și vectorul virusului deficient edeno-asociat (Samulski et. al. J. Virol. 61: 3096-3101 (1987)); Samulski et. al. J. Virol. 63: 3822-3828 (1989)). Într-o altă realizare, gena poate fi introdusă într-un vector retroviral, bunăoară așa cum s-a descris în Anderson et. al. US Patent No. 5,399,346; Mann et. al. Cell, 33: 153 (1983); Temin et. al. US Patent No 4,650,764; Temin et. al. US Patent No 4,980,289; Markowitz et. al. J. Virol. 62: 1120 (1988). Temin et. al. US Patent No 5,124,263; International Patent publication No WO 95/07358, publicat Martie 16, 1995, de Dougherty et. al. and Kuo et. al. Blood, 82: 845 (1993).

45 Alternativ, vectorul poate fi introdus – *in vivo* – prin lipofecție. Pentru decada trecută, a crescut utilizarea lipozomilor pentru încep șularea și transferarea acizilor nucleici – *in vivo*. Lipidele cationice sintetice desemnate pentru a limita dificultățile și pericolele întâlnite în transferarea mediată de lipozimi, se pot utiliza la prepararea lipozimelor, pentru transferarea – *in vivo* – a genei care cuprinde markerul (Felgner et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987)); vezi Mackey et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8027-8031 (1988). Utilizarea lipidelor cationice, pot promova în capsularea acizilor nucleici cu încărcare negativă și, așadar, pot promova fuziunea cu membranele celulare încărcate negativ

50 (Felgner et. al. Science, 337: 387-388 (1989)). Utilizarea lipofecției pentru introducerea genelor exogene în organele specifice – *in vivo* – are anumite practici avantajoase. Moleculele țintă ale lipozomilor, celulele specifice, reprezintă o arie a beneficiului. Este clar că, direcția de transferare la tipuri celulare speciale, vor fi în special avantajoase în țesutul cu heterogenitate celulară, cum ar fi: pancreasul, ficatul, rinichii și creierul. Lipidele pot fi cuplate chimic la alte molecule, pentru scopul propus (vezi Mackey et. al. 1988, supra). Peptidele țintă, bunăoară hormoni sau neurotransmițătorii și proteinele așa cum ar fi anticorpii sau moleculele non-peptidice, ar putea fi cuplate chimic, la lipozomi. Astfel, este posibil să se introducă – *in vivo* – plasmidul ADN liber, ca vector. Vectorii ADN liberi pentru terapia genetică, pot fi

55 introduși în celulele gazdă dorite, prin metode cunoscute în domeniu, bunăoară, prin transfecție, electroporare, microinjecție, transducție, fuziune celulară, dextran DEAE, precipitarea fosfatului de calciu, utilizarea transportorului de vector ADN (vezi bunăoară Wu et. al., J. Biol. Chem. 267: 963-967

## MD 2311 G2 2003.11.30

36

(1992)); Wu et. al. J. Biol. Chim. 263: 14621-14624 (1988); Hartmut et. al. Canadian Patent Application No. 2, 012, 311, filed March 15, 1990.

### Aplicații în agricultură

5 Gena OB poate fi, așadar, izolată din animalele domestice și se obțin de asemenea și polipeptidele OB corespunzătoare. Într-un exemplu specific, infra, proba derivată din gena OB murinică, hibridizează la secvențele codificate, omoloage, corespunzătoare, dintr-un mare număr de specii de animale. Așa cum s-a menționat pentru terapiile umane, proteinele recombinante pot fi, așadar, preparate și administrate la animale domestice. Administrarea polipeptidei poate fi implementată pentru a produce hrană mai slabă pentru animale, cum ar fi vitele, porcii, păsările, oile, etc. De obicei, o polipeptidă OB autolog este administrată, ce și o polipeptidă anti-autolog studiată de prezenta invenție. Deoarece polipeptide OB constă din circa 160 reziduuri de aminoacizi, aceasta nu poate fi superior imunogenică. Astfel, administrarea polipeptidei neautolog, nu poate rezulta din răspunsul imun. Alternativ, introducerea genelor clonate la animalele domestice transgenice, va favoriza scăderea potențială a greutateii corporale și adipozității, prin supra exprimarea transgenei OB. Cele mai simple mijloace de obținere ar fi de a ținti transgene OB la țesuturi gras, aplicând propriul promotor sau un alt promotor specific al țesutului gras.

15 Invers, creșterea țesutului gras în organism ar putea fi ca urmare în alte circumstanțe, cum ar fi dezvoltarea țesutului gras la ficatul de vite, Kobe. Aceasta ar fi putea fi însoțită de țintirea transgenei OB contrasens în țesutul gras sau prin utilizarea genei într-o tehnologie de knock-out. Alternativ, când se dorește o creștere a greutateii corporale la un anumit procentaj de grăsime, se poate administra un înlocuitor sau neantagonist al polipeptidei OB. Astfel de inhibitori includ, dar fără a se limita la aceștia, anticorpi reactivi cu polipeptida și fragmente de polipeptidă care se referă, dar nu activează receptorul OB, bunăoară antagoniștii polipeptidei OB.

### Implicații cosmetice

25 Polipeptida OB are o importantă valoare cosmetică și curativă. În special, deoarece polipeptidele OB, conform prezentei invenții, includ derivații și analogii neantagoniști ai acestora, este aplicată pentru modelarea gradului și cantității de depozit celular gras la un animal, aceste polipeptide sunt aplicată pentru reducerea țesuturilor grase neplăcute, bunăoară depozitele de grăsime de pe abdomen, șolduri, coapse, ceafă și bărbie, care nu reprezintă o cantitate de țesut gras necesar pentru condiția de obezitate, dar care contribuie la aspectul individual. Efectul de reducere a grăsimii este gândit a fi însoțit în parte, de reducerea aspectului, bunăoară reducerea hranei ingerate, prin creșterea metabolismului bazal sau ambele. Astfel, polipeptida OB prezentă sau derivații acesteia sau analogii neantagoniști, este aplicată pentru administrarea la un subiect, pentru a schimba aspectul cosmetic în depozitele de grăsime țesutură, fie prin modelarea depozitului de grăsime, reducerea apetitului sau ambele.

30 Pe lângă aceasta, condițiile prezente și metodele invenției, pot fi utilizate în conjuncție cu diverse procedee, cum ar fi chirurgia cosmetică desemnată modificării aspectului general al corpului (bunăoară chirurgia cu laser sau liposucțiunea desemnată pentru reducerea masei corporale, prin aspirarea sau ablațiunea țesutului gras), exercițiu (în special training corporal și mișcare), dietă cu grăsimi puține, hipnoză, biofeedback, care sunt exemple de metode care ar putea contribui la scăderea procentajului de țesut țesut și la îmbunătățirea aspectului organismului. În acest sens, prezenta invenție se referă la o metodă pentru efectuarea cosmetică a modului de țesut gras, cuprinzând administrarea unei cantități de polipeptidă OB a unei cantități de modulare a grăsimii sau administrarea unui derivat sau analog neantagonist al acestei polipeptide, în același scop, la individul care dorește modelarea cosmetică a țesutului gras, pentru îmbunătățirea aspectului general al organismului. Într-un aspect special, modelarea țesutului gras este o consecință a suprimării apetitului. De obicei, modelarea țesutului gras, este o reducerea a țesutului gras. Într-o altă realizare, prezenta invenție se referă la o metodă pentru efectuarea cosmetică a pierderii țesutului gras, cuprinzând combinarea unui procedeu pentru modificarea aspectului corpului, cu administrarea unei cantități de polipeptidă OB pentru modelarea țesutului gras, sau administrarea în același scop, a unui derivat sau analog neantagonist al acestei polipeptide, la individul care dorește modelarea cosmetică a țesutului gras pentru îmbunătățirea aspectului general al corpului.

### Receptorul OB

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

60 Așa cum se crede în prezent, receptorul OB este localizat asemănător în hipotalamus și poate în ficat, de obicei colecțiile ADN din aceste țesuturi vor fi construite cu vectorii standard de exprimare a clonării. Aceste clone ADN vor fi introduse apoi în celulele COS ca rezervă și elementele rezultate transformate, vor fi supuse unui screening, cu liantul activ, pentru identificarea celulelor COS de exprimare a

## MD 2311 G2 2003.11.30

37

receptorului OB. Clonele pozitive pot fi apoi izolate astfel ca să regenereze receptorul clonat. Receptorul clonat se va utiliza în conjuncție cu liantul OB (valorând ca hormon), pentru a dezvolte componentele necesare pentru screeningul modelatorilor OB cu molecule mici. În prezenta invenție, se poate utiliza, de asemenea un sistem special de analiză, cunoscut ca analiză de receptor.

5       Intr-o analiză de receptor, materialul care trebuie analizat, este marcat corespunzător și apoi anumite colonii de testare celulară, sunt inoculate cu o cantitate atât de material marcat, cât și de material nemarcat, după care studiarea legăturii este astfel dirijată, pentru a se determina alungirea la care se referă materialul marcat, la receptorii celulari. În acest mod, se pot stabili diferențele de afinitate între materiale. În acest sens, cantitatea purificată de modelator de greutate, poate fi radiomarcată și combinată bunăoară, cu anticorpi sau cu alți inhibitori, după care se vor efectua studiile privind aceste legături. Soluțiile vor fi preparate apoi astfel ca să conțină diferite cantități de modelator de greutate, marcate și nemarcate, și probele celulare vor fi apoi inoculate. Monostraturile celulare rezultate, sunt apoi spălate, solubilizate și numărate cu un calculator gamma, pe o perioadă de timp suficientă pentru a se produce o eroare standard < 5%. Aceste date sunt apoi supuse analizei Scatchard, după care, se pot trage concluziile și se pot face observațiile privind activitatea materialului. În exemplul de mai sus, se ilustrează maniera în care capacitatea de legare celulară a materialului analizat, poate să servească ca o caracteristică de deosebire. În schimb, analiza receptorului, va fi în special aplicată pentru identificarea receptorilor specifici modelatorilor prezenți, cum ar fi receptorul db.

15       O altă analiză aplicată și studiată în conformitate cu prezenta invenție, este aplicată deja ca analiza "cis/trans". Pe scurt, această analiză aplică două elemente genetice, din care una este tipic o plasmidă care exprimă continui receptorul special de intrare, când acesta este transferat într-o linie celulară acceptabilă, iar cea de a doua, care este o plasmidă ce exprimă un element de informare cum ar fi luciferaza, sub controlul unui receptor sau complex liant. Astfel, dacă se dorește evaluarea compusului ca liant pentru un receptor special, una din plasmide se va construi în așa fel ca să rezulte în exprimarea receptorului, în linia celulară aleasă, în timp ce plasmide secundară, va poseda un promotor legat la gena luciferazei în care este înserat răspunsul elementului, la acest receptor special. Dacă compusul de testare este neantagonist receptor, liantul se va complexa cu receptorul, rezultând astfel complexul care se referă la elementul de răspuns și care inițiază transcrierea genei luciferazei. Chemiluminiscenta astfel rezultată, este măsurată apoi fotometric și curbele răspunsului la doză sunt comparate cu cele ale lianților cunoscuți. Procesul de mai sus este descris în detaliu de US Patent No 4,981,784 și PCT International Publication No WO 88/03168, care se referă la scopul artizan. Odată ce recombinatul care exprimă secvența genei receptor OB este identificat, receptorul OB recombinat, poate fi analizat. Acesta este obținut prin analizele bazate pe proprietățile fizice și funcționale ale receptorului OB, incluzând marcarea radioactivă a receptorului, prin analiza de gel electroforeză, imunoanaliză, liant de legătură, etc. Mai mult decât atât, anticorpii la receptorul ob, ar putea fi generați, așa cum s-a descris mai sus. Structura receptorului OB poate analizată prin diferite metode cunoscute în domeniu. De obicei, structura diferitelor domenii, în special porțiunea de legătură a OB este analizată. Analiza structurală, poate fi realizată prin secvența de identificare, cu alte proteine cunoscute, în special cu receptorii de hormoni și proteine. Gradul de similaritate (sau omologie) poate să prevadă o bază pentru structura prevăzută și funcția receptorului, sau domeniul acestora. Într-un anumit aspect, compararea secvențelor poate fi realizată cu secvențele depistate în GanBank, aplicând bunăoară, programele FASTA și FASTP (Pearson et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-48 (1988)). Secvența proteinei poate fi apoi caracterizată prin analiza hidrofilității (bunăoară Hopp. et. al., 1981, supra). Profilul hidrofilității poate fi utilizat pentru identificarea regiunilor hidrofobe și hidrofile ale proteinei receptor OB, care, în schimb pot indica regiunile extracitopasmice, legătura membranei și regiunea intracitoplasmică.

20       Analiza structurală secundară (bunăoară, Chou et. al. 1974, supra), poate fi, așadar, efectuată, pentru identificarea regiunilor receptorului OB, care presupun structuri secundare specifice. Manipularea, translația și predicția structurii secundare, ca și cadrul de citire deschis și de fragmentare, se pot realiza prin utilizarea unor programe de computere software, în domeniu. Prin prevederea unei polipeptide OB recombinante a unei surse abundente și a oportunității de izolare a receptorului OB (bunăoară producții genetic db), prezenta invenție permite determinarea structurală cantitativă a conformației active a polipeptidei OB și receptorului OB sau domeniilor acestuia. În special, este atestat destul material pentru analizele de rezonanță magnetică nucleară (RMN), spectroscopie în infraroșu (IR) și ultraviolet (UV), în special dicroismul circular (CD). În special, prin RMN se prevede o analiză structurală amănunțită a moleculelor în soluție, care aproximează foarte mult zonele native ale acestora (Marion et. al. 1983, supra, Bar et. al., 1985, supra; Kimura et. al. 1980, supra). Alte metode de analiză structurală pot fi de asemenea utilizate. Acestea includ, fără a se limita la aceasta, cristalografia de raze X (Engstom, 1974, supra).

25       Se pot studia mult mai preferabil, co-cristalele polipeptidei OB și receptorul OB. Analiza co-cristalelor prevede o informație detaliată privind legarea, care la rândul ei permite un design rațional pentru neantagoniștii lianți și pentru antagoniștii lianți. Modelarea pe computer poate fi, așadar, utilizată,

## MD 2311 G2 2003.11.30

38

5 în special în legătură cu metodele RMN sau raze X (Fletterick et. al. eds, Computer Graphics and Molecular Modeling, in Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Gold Spring Harbor, New York (1986)). Identificarea și izolarea genei cuprinzând receptorul OB, conform prezentei invenții, se prevăd pentru exprimarea receptorului, în cantități mai mari decât atunci  
10 cand poate fi izolat din surse naturale sau celule indicatoare care sunt în special prelucrate pentru a indica activitatea receptorului exprimat după transferarea sau transformarea celulelor. În acest sens, în afară de designul rațional al neantagoniștilor și antagoniștilor pe baza structurii polipeptidei OB, prezenta invenție examinează o metodă alternativă pentru identificarea lianților specifici ai receptorului OB, aplicând diferite analize de screening, cunoscute în domeniu. Invenția de față poate fi mai bine înțeleasă cu referire la următoarele exemple, care intenționează a fi exemplare, dar nelimitându-se la prezenta invenție.

### Secția exemple

În continuare, este prezentată în fond, metoda utilizată pentru identificarea materialului genetic care exemplifică prezenta invenție. Această secție cuprinde patru faze secvențiale:

15 (A) Cartarea genetică, (B) Cartarea fizică, (C) Izolarea genei candidat, și (D) Defectarea mutației. În cele ce urmează, se confirmă că, gena murinică ca obiect, a fost izolată (faza D) gena umană omoloagă a fost cercetată, fiind caracterizate atât genele murinice și umane, cât și proteinele putative. Fazele sunt prezentate detaliat, în cele ce urmează.

### A. Cartarea genetică

20 Mutația ob este segregată în încrucișări genetice și analiza legăturii standard este utilizată pentru poziția mutației relative la RFLP (polimorfisme cu fragmente lungi, de restricție). Aceste date, plasează gena OB, în intervalul 5 cM al cromozomului proximal 6, de șoarece. (5 cM reprezintă o măsură a distanței genetice corespunzătoare la 5 puncte de intersecții genetice, manifestate la 100 animale). În cartarea genetică ulterioară (Friedman et. al. 1991, supra), sunt generate și utilizate, un total de 771  
25 maioze informative. Poziția genetică care a fost o cartare relativă la OB, a fost publicată mai înainte. Cele două RFLPs-uri apropiate, sunt descrise ca definite prin probe derivate din carboxipeptidază și genele metonogene.

Rezolvarea genetică a experimentelor descrise mai sus, este inadecvată la clona ob, în fond, deoarece nici unul din markerii genetici nu formează o legătură solidă. În vederea identificării RFLPs-urilor având legături solidă, probele adiționale sunt izolate și încrucișarea genetică este expandată. O metodă aplicată  
30 deja, microdisecția cromozomilor este utilizată pentru izolarea porțiunilor random de ADN din cromozomul proximal 6, de șoarece (Bahary et. al. Mammalian Genome, 4: 511-515 (1993)). Probele individuale clonate, se testează pentru legătura solidă la ob. Pe această bază de studii, o probă D6Rck13, denumită psd 3, a fost selectată pentru analiza următoare aparținând propriei proximități genetice, relativ cu OB.

35 Această probă a fost utilizată la genotipul 835 ob al descendentului din încrucișările interspecie și intersubspecie, care au indicat că, D6Rck 13 este nonrecombinată la toate animalele 835, așa cum s-a prezentat de către Bahary et. al. Pe parcursul cartării fizice, a fost identificat un nou marker polimorf, dintr-un cosmid subclonic derivat din YAC53A6. Acest nou marker, a fost poziționat între D6Rck13 și gena OB și a fost utilizat ca genotip adițional maioselor, 771, informative, adiționale din încrucișările și încrucișările inverse intraspecie. Un singur animal ≠167, a fost identificat că poartă un grad recombinat  
40 între ob și D6Rck39. Aceste studii atestă că D6Rck39/D6Rck13 este – 0,06 cM din ob. O probă adițională, Pax4, a fost identificată ca fiind 12 cm proximal la ob. Pax4 a fost recombinat la două animale; ≠111 și ≠420. Pax4 este un pseudogen care a fost cartat mai sus la cromozomul 6 proximal de șoarece, de Gruss și colaboratori (Gruss et. al. Genomics, 11: 424-434 (1991)). Pe această bază, s-a determinat că,  
45 gena OB rezidă în – 0,2 cM interval între Pax4 și D6Rck13. Aceasta conduce la eforturi de clonare a ADN de inserare, la efortul de izolare a OB.

### B. Cartarea fizică

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

Cromozomii artificiali de drojdie, sunt izolați aplicând D6Rck13 și Pax4. Aceasta se însoțește de prepararea probelor de ADN purificate și utilizarea lor pentru izolarea YACs-urilor corespunzătoare. Aceste YACs (≠8, ≠16, ≠107 și ≠24) se izolează și se caracterizează inițial și pe baza rezultatelor  
55 analizelor, se ajunge la concluzia că, YAC 16 este YAC care se extinde apoi distal, bunăoară cel mai apropiat relativ cu ob. terminația cheie a YAC ≠16 este apoi separată și se determină că această terminație este mai apropiată de ob decât Pax4. Această terminație este denumită 16M(+). Această concluzie a fost îmbogățită deoarece a arătat că această probă n-a fost recombinată la animalul ≠420 (ca și Pax4). Această terminație a fost secvenționată și utilizată pentru dezvoltarea analizei PCR. Această analiză PCR a fost utilizată pentru screeningul colecției YAC. Se izolează patru clone pozitive. Caracterizarea ulterioară a acestor YAC-uri eliberarea terminațiilor, cartarea de restricție, gel electroforeze în domeniul impulsului și  
60 absorbția Southern cu încrucișări genetice, a determinat ca două din aceste YACs-uri, adu și aad, sunt

## MD 2311 G2 2003.11.30

39

critice pentru studiile ulterioare. YAC aad este 550 kB, YAC non-chimeric, care are cea mai mare  
extindere distală. De aceea, terminația distală a acestui YAC, aad (pICL) s-a utilizat pentru completarea  
aplicației fizice. YAC și terminația se distală, adu(+) s-a determinat ca fiind nonrecombinată la toți  
descendenții ob la animalele ≠111 și ≠167 cu încrucișări genetice, sugerând că gena OB poate să rezide în  
5 acest YAC. Analiza PCR pentru aceste două terminații, aad (pICL) și adu(+), s-a dezvoltat și utilizat  
pentru izolarea mai multor YACs-uri și clone PI, pentru cartarea fizică continuă. Clonele importante PI,  
izolate prin acest efort, includ 498, 499, 500 (izolate aplicând proba derivată din aad (pICL)) și 322, 323  
și 324 (aplicând o probă din adu (+)). În același timp, YACs-urile izolate, au fost caracterizate prin  
10 D6Rck13 (53A6, 25A8, 25A9, 25A10). Aceste studii au determinat că, 53A6 s-a extins proximal cel mai  
mult relativ cu aad YAC. Dimensiunea intervalului între 53A6 și aad a fost determinată a fi 70 kB.  
Terminația cheie de 53A6, 53 (pICD) a fost apoi utilizată pentru screeningul a trei colecții acceptabile  
YAC și a colecției PI. Clona critică PI, 325 a fost izolată. Această clonă PI suprapusă cu clonele PI, izolate  
prin aad (pICL) și prin aad (pICL), au ca rezultat întreagă zonă adiacentă conținând YACs-urile și clonele  
PI, de - 2,5 milioane perechi de bază în lungime și acoperind Pax4 16 M (+), adu(+), aad(pICL), 53  
15 (pICL), D6RCK39 și S6Rck13 care sunt clonate. Prin cartarea atentă a porțiunilor de recombinate  
aparentă la animalele ≠111 și ≠167, s-a ajuns la concluzia că OB este situată la un interval de 400 kB.  
Pentru a se prevedea sursa de ADN care participă la izolarea genei OB, circa 500 kB care acoperă  
regiunea de nonrecombinare, s-au izolat într-un număr total de clone de 24 PI. Aceste clone PI, incluzând  
20 322 și 323, care sunt depistate a fi aplicată ca clone, au fost utilizate pentru captarea exonilor.  
Reprezentarea fizică a porțiunii de cromozom care poartă polipeptide OB, este arătată în fig. 7A. Figura  
7B reprezintă YAC adiacent. Figura 7C reprezintă PI adiacent.

### C. Izolarea genelor candidate

Metoda utilizată pentru izolarea genelor în acest interval a fost cea de captare a exonilor. Metoda  
aceasta este utilizată cu un vector comercial pentru identificarea exonului ADN (bunăoară, secvențele de  
25 codificare), prin selectarea legăturii funcționale din secvențele de acceptare și cele donoare, în ADN  
genic, introdus în elementul de construcție testat. ADN-ul din aceste clone PI, a fost subclonat și dezvoltat  
în vectorul de captare a exonului. Aceste clone sunt inserții scurte clonate în vectorul Bluescript. Fiecare  
clonă a fost amplificată PCR, cu primerii PCR corespunzători secvențelor de plasmide care flanchează  
30 elementul de inserție. Amplificarea PCR este realizată direct pe bacteria care poartă plasmidul. Reacțiile  
sunt stabilite, aplicând robotul Biomek. Produsele PCR sunt electroforizate pe gel de agaroză 1% în  
tampon TBE, care conține bromura de etidium. Tehnica de captare a exonilor a fost modificată, pentru  
eliminarea ADN din *Escherichia coli*, de contaminare, din clonele PI și pentru screeningul exonilor  
abundenți ai artefactului, care depășesc procentul de 80-90% de exoni putativi captați. Vectorul de captare  
35 a exonilor, include secvențele HIV; un scurt segment al secvențelor acestui vector, corespunde la acest  
produs artificial. Experimentarea captării exonilor, a fost realizată aplicând diferite clone PI. Produsele de  
captare a exonilor, sunt apoi aplicate prin PCR, selectate și secvenționate. Secvențele de "exoni" putativi  
sunt comparate cu cele din Banca Genetică, aplicând computerul Blast ca program. Circa 15 exoni se  
selectează pentru o altă examinare prin RT-PCR. Analiza Northern și absorbție zo pentru prezența ARN-  
40 ului corespunzător sau a secvențelor conservate. Un număr de 7 și 15 exoni putativi, 325-2, 323-9, 322-5,  
D1-F7, IH3 și 2G7 au fost găsiți conținând un ARN de transcriere, 325-2 este o genă specifică de testare;  
323-8 și 323-9 sunt asemănător celor doi exoni din aceeași genă exprimată în fond în creier și rinichi. IH3  
și 322-5 reprezintă două niveluri scăzute ale transcriptorilor din creier. D1-F7 este un exon din gena  
clonată mai sus, inozin monofosfat dehidrogenaza (IMPDH), care are perechi de exprimare omniprezente.  
Nici una dintre aceste gene, nu pare să cuprindă polipeptide OB. 2G7, care este exonul OB, așa cum se va  
45 discuta în continuare. După trei eforturi fără succes pentru captarea exonului genei OB, o altă încercare a  
fost făcută prin comasarea ADN-urilor de la toate Pls-urile din regiunea critică OB. Acestea includ Pls-  
urile: 258, 259, 322, 323, 324, 325, 498, 499, 500, 653, 654 și altele. Apoi, Pls-urile 258, 260, 322, 498 și  
499 au fost subclonate în vectorul de captare a exonului și ulterior diferite plăci au fost preparate cu  
50 clonele bacteriene, din care, fiecare a purtat un exon putativ. Circa 192 de clone reprezentând candidații  
OB putativi, au fost obținute. Așa cum s-a menționat mai sus, un produs artifact confirmat, asemănător  
multor astfel de produse izolate, conținând doi exoni captați derivați de la vector, au fost observate.  
Astfel, clonele au fost identificate atât în dimensiunea lor, cât și prin faptul că, hibridizarea probelor de  
ADN corespunde benzilor de absorbție în testul Southern, pe gel. În acest mod, clonele 185 până peste  
192, au fost excluse dintr-o viitoare evaluare.

55 Excluderea produselor artificiale numai pe baza dimensiunii, n-a fost posibilă, ca și cum s-ar ajunge  
la eliminarea exonului corespunzător OB. Astfel, din cei 192 exoni, un număr total de 7 exoni au fost  
selectați pentru a fi în continuare studiați. Modelele de secvenționare de șapte exoni, au fost preparate,  
realizând astfel, secvenționarea. Secvențele pentru Șapte exoni au fost analizate și s-a demonstrat că,  
șapte dintre aceștia au fost identificați și unul a fost aparent artificial. În special, clona 1D12 a conținut  
60 "secvențe HIV" bunăoară, o banda artificială. Rămân apoi trei exoni pentru analizele următoare: 1F1, 2G7  
și IH3. 1F1 este eliminat deoarece acesta este cartografiat în afara regiunii critice. Primerii PGR pentru

## MD 2311 G2 2003.11.30

40

ambele 1H3 și 2G7, au fost selectați și sintetizați. Secvența exonului pe 2G7 a fost determinată, fiind prezentată în fig. 10 (SEQ ID No 7). Primerii pentru 2G7 sunt apoi selectați și sintetizați. Porțiunile secvenței corespunzător primarilor PCR sunt subliniate. Primerii utilizați sunt următorii:

5' CCA GGG CAG GAA AAT GTG (Tm = 60. 0°C)

5 (SEQ ID No. 8)

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

(SEQ ID No. 9)

Acești primeri amplifică genomul ADN cu PCR, în condițiile următoare 25-30 cicluri la 55°C, cu susținere pentru 2', la 72°, extensie pentru 2' la 94°C, denaturare pentru 1' în PCR tampon, standard. Acești primeri au fost, așadar, utilizați pentru a genera o probă, marcată, prin includerea <sup>32</sup>P-dCTP în reacția PCR, cu reducerea corespunzătoare a cantității de dCTP rece. Un RT-PCR este realizat pe o varietate de țesuturi-ARN și s-a concluzionat că 2G7 este exprimat exclusiv în țesutul gras alb, printre țesuturile examinate (fig. 11A). Apoi, <sup>32</sup>P-marcată 2G7 a fost hibridizată la ARN-urile tisulare, așa cum s-a demonstrat prin analiza de absorbție Northern (fig. 11B), cum s-a arătat că ARN-ul a fost exprimat la un nivel ridicat în țesutul gras, dar acesta a fost exprimat sau neexprimat la niveluri foarte scăzute, în toate celelalte țesuturi (unde semnalele pot fi rezultatul contaminării grăsimii din preparatele tisulare). 10 μg din ARN-ul total din fiecare dintre țesuturile menționate, sunt supuse electroforezei pe gel de agaroză, cu formaldehidă. Proba este hibridizată prin absorbție la temperatura de 65°C, în tampon de hibridizare standard, Rapid Hybe (Amersham). Dimensiunea ARN a fost de circa 4,9 kB. La acest punct 2G7 s-a considerat a fi o genă candidată viabilă, pentru OB și a fost apoi analizată.

Detectarea mutației

În vederea confirmării că 2G7, care cuprinde gena OB, este necesar să se demonstreze diferențele în nivelurile exprimării ARN din secvența ADN a acestei gene în mutant, prin comparație cu animalele de tip sălbatec. Două mutații separate ale genei ob, sunt acceptabile pentru studiu, C57BL/6J ob/ob (1J) și Ckc/Smj ob/ob (2J). Acestea se vor referi apoi la 1J și respectiv 2J. (Nomenclatura informală este utilizată referindu-se la tulpinile de șoareci, studiate. Pretutindeni în această specificație și în figuri, se va înțelege că C57BL/6J se referă la C57BL/6J +/-; CKC/smj se referă la SM/Ckc -+ <sup>Dac</sup> +/-; CKC/smj ob/ob se referă la SM/Ckc -+ <sup>Dac</sup> -ob<sup>2J</sup>/ob<sup>2J</sup>). ARN s-a preparat din țesutul tisular care a fost izolat din 1J, 2J și animalele martor. ARN total pentru fiecare probă a fost tratat cu DNază și apoi a fost transcris invers. cADN rezultat, simplu răsucit, a fost apoi amplificat PCR, fie cu primerii 2G7 (condițiile sunt prezentate mai sus) pentru banda inferioară sau cu actin primerii comercial acceptabili, pentru banda superioară. Produsele RT-PCR sunt aduse pe gel de agaroză 1% TBE, fiind colorate cu bromură de etidium (fig. 12A). Aplicând RT-PCT, s-a demonstrat că în timp ce 2G7 mARN este exprimat în 1J, în toate probele martor de șoarece, acestea au lipsit complet, 2J la șoarece. Nici un semnal n-a fost detectat după 30 de cicluri de amplificare. Acest experiment a atestat o evidență directă, că 2G7 a corespuns la un exon din gena OB. Deoarece mutația 2J este relativ recentă și este menținută ca tulpină coisogenică, acest rezultat a fost prima evidență acceptabilă care a indicat că 2G7 este un exon din gena OB. Mutația localizată asemănător în regiunea promotoare care duce la un eșec total al sintezei mARN. Prezența unui semnal la 1J de șoarece în acest experiment RT-PCR, demonstrează că 1J ar putea purta punctul de mutație care nu rezultă în mărimea schimbării mării în dimensiunea probei de ARN. În plus 2G7 mARN este absent, când este testat prin RT-PCR din patru animale 2J adiționale.

Acest rezultat este confirmat prin analiza de absorbție Northern (fig. 12B), ARN-ul celulelor grase este preparat din fiecare tulpină (C57BL/6J, 1J, CKC/smj și 2J). Se prelucrează 10 μg din acest ARN și apoi se analizează prin absorbție Northern. Pata este comparată cu proba 2G7 care a fost marcată cu PCR, prin amplificare materialului, bunăoară banda din fig. 11, aplicând <sup>32</sup>P-dCTP în reacție PCR. Actina este controlarea pentru cantitatea de ARN încărcată. Semnalul actinei este la fel de obiectiv în toate probele. Semnalul OB este absent în creier deoarece mARN este specific celulelor grase. Rezultatele analizei Northern confirmă că ARN-ul specific 2G7 este absent în cazul 2J la șoareci. ARN ob este absent în CKC/smj ob/ob la șoareci, deoarece această genă a tulpinii mutante obeze este distrusă, fără a se obține vreun ARN. În plus, nivelul de 2G7 ARN este crescut de la 10 la 20 de ori în 1J, ca și țesutul gras db/db. Aceste rezultate sunt compatibile cu ipoteza că, atât OB cuprinzând hormonul de circulație sau responsabilul pentru generarea semnalului din celulele grase, modulează greutatea corporală. Aceste rezultate determină concluzia că 2G7 este gena OB și se prevede ca 1J la șoarece, să aibă un punct de mutație, probabil o mutație nonsens care duce la o terminație a translației, premature. Rezultatele analizei Northern au fost replicate aplicând preparatele de ARN în celule grase, de la patru animale diferite, 2J (fig. 13). În această analiză, ap2 este un element de transcriere specific celulelor grase, care s-a utilizat drept control, mai mult decât actina, în fig. 12B. Nu este vreo semnificație în ceea ce privește densitatea bandei ap2. ap2 este marcată prin desemnarea primerilor PCR în forma din secvența ap2 publicată. Produsele RT-PCR ale ARN în celulele grase sunt apoi marcate din nou, aplicând procesul pentru marcarea PCR. Această analiză demonstrează, prezența mARN OB la animalele normale omozigote sau

## MD 2311 G2 2003.11.30

41

heterozigote și în absența acestora la animalele mutante 2J. Mutația a fost identificată la șoareci IJ. Mutația este o schimbare de bază C ... T, care rezultă din schimbarea argininei la un codon de stop prematur aparent, la aminoacidul 108 și la toate interpretările de probabilitate pentru mutația IJ (fig. 14), cu toate nivelurile ridicate de exprimare a mRNA ob (vezi fig. 12 și fig. 13, C57BL/6J zonele ob/ob).

5 Mult mai recent, analiza de absorbție Southern a fost utilizată pentru a conchide ca mutația 2J este rezultatul unei schimbări ADN detectabile, la terminația 5' a OB, care pare să completeze exprimarea ARN abolit. Natura exactă a acestui rearanjament posibil, urmează să fie determinată. Analiza de absorbție Southern a ADN genic din CKC/smj (SM/Ckc- +<sup>Dac</sup>) și C57BL/6J la șoarece, aplicând patru endonucleaze de restricție diferite, s-a realizat în vederea determinării, dacă mutantul ob produce un model de fragment unic (fig. 15A). Circa 10 μg de ADN (derivat de la ADN genic preparat din ficat, rinichi și splină) se digeră cu enzima de restricție indicată. ADN este apoi supus la electroforeză pe gel de agaroză 1% TBE. ADN este transferat la membrana imobilizată și hibridizat la proba PCR marcată 2G7. Banda cheie este banda cea mai superioară în elementul de digestie Bg/II pentru CKC/smj ob/ob (SM/Ckc +<sup>Dac</sup> ob<sup>2J</sup>/ob<sup>2J</sup> ADN. Această bandă este cu greutatea moleculară mai mare decât la alte tulpini, indicând o mutație în această tulpină. Fig. 15B este absorbția Southern a elementului de digestie Pst/11 a ADN genic din descendentul încrucișării ob<sup>2J</sup>/+ x ob<sup>2J</sup>/+. Câțiva ADN au numai banda superioară, câțiva având numai banda inferioară și câțiva, pe ambele. Animalele având numai banda superioară sunt alo-obeze, bunăoară ob<sup>2J</sup>/ob<sup>2J</sup>. Aceste date atestă că polimorfismul (bunăoară mutația) prezentat în fig. 15A este segregat în sens genetic.

20 Exemplul 1: Clonarea cADN și determinarea secvenței OB

Aplicând proba PCR marcată 2G7, s-au izolat în total 50 de clone cADN la șoareci, din colecția cADN λgt 11 de celule grase murinice (Clonetech 5' -STRETCH cADN din țesutul gras testicular al șoarecelui elvețian, ≠ML 3005b) și 30 clone cADN umane, de hibridizare încrucișată, din colecția de celule grase umane λ10 cADN (Clonetech 5' -STRETCH cADN din abdomen (HL1108a). Screeningul colecției a fost realizat aplicând procedeele pe placa lift. Filtrele de pe placa lift sunt denaturate aplicând metode de autoclavare. Filtrele sunt hibridizate în duplicat, cu proba PCR - cu marcarea 2G7 (Tampon rapid Hybe, la temperatura de 65°C, până a doua zi). După 2 ... 4 ore de prehibridizare, filtrele sunt spălate de două ori cu SSC, 2% SDS, de două ori, timp de 30 de minute la temperatura de 65°C și apoi sunt expuse la filmul de raze X. Duplicatul pozitiv a fost placa purificată. Fagul din placa purificată a fost amplificat PCR, aplicând primeri vectori comerciali acceptabili, bunăoară λgt10 și λgt11. Produsele PCR rezultate, corespund inserției cADN pentru fiecare fag, cu o cantitate mică din secvența vectorului la fiecare terminație. Benzile au fost gel purificate și secvenționate, aplicând ordonatorul automat ABI și primerii vectorilor pentru proba ADN polimerazei.

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

40 Datele de secvenționare atestă că există 167 aminoacizi în cadrul de citire deschisă (fig. 1). Secvența consensus de inițiere a translației Kozak, a fost prezentă cu un reziduu de adenozină în circuitul ATG cu trei baze. Două clase de cADN au fost depistate ca fiind diferite prin includerea sau excluderea unui singur codon de glutamină. Acest reziduu este demonstrat într-o poziție imediată 3' la acceptorul legăturii, exonului 2G7. Deoarece codonul CAG al glutaminei include o posibilă secvența acceptor de legătură AG, se pare că există slipaj la porțiunea acceptoare de legătură cu o aparentă anulare a 5 perechi de bază, în subsetul cADN, așa cum este arătat mai jos.

50 
$$\begin{array}{c} \text{gln ser val} \\ \text{ag CAG TCG GTA (cu glutamină (SEQ ID No. 17)} \\ \text{(porțiunea acceptor de legătură)} \\ \text{ser val} \\ \text{ag CAG TCG GTA} \\ \text{(porțiunea acceptor de legătură)} \end{array}$$

55 În secvențele de mai sus, "ag" corespunde la circuitul presupus al secvenței intron, în codonul de glutamină și AG este o porțiune de legătură alternativ-putativă. Acest reziduu de glutamină este localizat într-o regiune superior conservată a moleculei și importanța acesteia pentru activitatea biologică, nu este încă aplicată. S-a detectat o secvență semnal putativă N-terminal, din care porțiunea de cleavaj de semnal este prevăzută a fi carboxi terminal la reziduu de alanină la aminoacidul din poziția 21. Această secvență

## MD 2311 G2 2003.11.30

42

semnal putativă a fost confirmată prin aplicarea algoritmului computerului la metoda von Heijne. Aplicând această tehnică, secvența-semnal cea mai probabilă a fost identificată în regiunea de codificare a polipeptidei, corespunzătoare aminoacizilor 1-23, având secvența: MCWRPLCRFLWLWSYLSYVQA ↑ VP (SEQ ID No. 10), în care săgeata indică porțiunea de cleavaj din secvența semnal putativă. Restul secvenței de aminoacizi este sporit hidrofilă și nu are nici un motiv structural notabil sau domenii de măsură a membranei altele decât secvența semnal N-terminal. În special, nu s-au demonstrat secvențe consens pentru glicozilarea cu legătură<sup>2</sup> la N sau secvențe de aminoacid bibazic, indicative pentru clivajul proteinei, în cazul proteinei prezentate pentru prelucrare (Sabatini et al. The metabolic basis of inherited disease, p. 177-223, C.V. Scriver et al. eds. McGraw-Hill, New York). Bazele de date ale cercetărilor efectuate aplicând programele Blast și Block, n-au identificat nici o secvență omoloagă.

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

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

Exemplul 2. Exprimarea OB la bacterii

Atat cADN umani cât și cei murinici codificați ob, au fost clonați în vectorul de exprimare pET-15b (Novagen). Acest vector conține promotorul T7 în conjuncție cu operatorul lac și se exprimă proteina de fuziune conținând terminația de histidina (His-tag) și o porțiune de cleavaj a trombinei lângă circuitul porțiunii de inserție a secvenței de codificare (fig. 17) (SEQ ID No.11 și 12), cADN uman și de șoarece se modifică astfel ca alanina, la capătul secvenței semnal este răsucită la porțiunea NdeI, ca o secvență separată în regiunea 3'. Inserția porțiunii NdeI este perfecționată, aplicând noii primeri ai PCR:

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

CTT ATG TTC ATAT GGT GCC GATC CAG AAA G TC (SEQ ID No. 13)

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

TCC CTC TAC ATAT GTC TTG GGAG CCT GGT GGC (SEQ ID No. 14)

Hnde-5' (primii cinci primeri umani):

TCT ATG TCC ATAT GGT GCC GATC CAA AAA GTC (SEQ ID No. 15)

Hnde-3' (primii trei primeri umani):

TTC CTT CCC ATAT GGT ACT CCTT GCA GGA AGA (SEQ ID No. 16).

Primerii conțin în mijloc 6 perechi de bază cu dereglări, care sunt introduse în porțiunile de restricție NdeI, la fiecare capăt al fragmentului PCR. Fagul purtând fie cADN umană, fie cADN de șoarece, este amplificat PCR, aplicând acei promotori. Produsul PCR este digerat cu NdeI și purificat pe gel, pe un gel de agaroză 1%, având un punct de topire scăzut. Benzile de gel purificate, sunt supuse la subclonare în vectorul pET. Plasmele care rezultă, sunt secvenționate, pentru a se asigura că mutațiile nu sunt introduse în timpul fazei de amplificare PCR a clonării. Elementele de construcție pentru cADN uman și murinic, au fost preparate pentru codificarea APN, în care glutamina 49 este absentă. În special elementele de construcție pET 15 b conținând fie secvența de codificare a OB umana, fie pe cea de șoarece, minus secvența semnal și fuzionate la His-tag, au fost realizate aplicând metoda, de clonare PCR.

## MD 2311 G2 2003.11.30

43

Aceste elemente de construcție au fost secvenționate pentru a asigura că nici o eroare de secvență n-a fost introdusă în regiunea de codificare a genei OB, în timpul fazei de amplificare PCR.

5 Două plasmide de construcție rezultante, pETM9 și ETH4, sunt selectate pentru transformarea exprimării celulelor gazdă, bacteriene. Prin inducția cu 1 mM IPTG în condiții optime, bacteria transformată este capabilă de a produce 100-300 μg/ml, polipeptidă OB de fuziune. Majoritatea proteinei OB de fuziune a fost demonstrată în corpul de incluziune. După solubilizare cu 6M guanidină HCl sau uree, proteina de fuziune a fost purificată pe o coloană de rezine, cu legături His (Ni-chelare). Condițiile pentru purificarea pe coloană a proteinei de fuziune OB (incluzând legarea, spălarea și eluarea) au fost stabilite experimental. Proteina de fuziune OB se referă la rezină la 5 mM imidazol/6 M guanidină -HCl și rămâne legată până la 20 mM imidazol/6 M guanidină -HCl. Proteina poate fi aliată din rezina la 60 mM imidazol/6 M guanidină (fig. 18 A, B). Ambele proteine de fuziune OB purificate, umane și de șoarece au fost apoi dializate în PBS pentru separarea guanidinei -HCl din preparat, apoi se aplică pentru creșterea anticorpilor policlonali.

15 În vederea testării activității biologice a produselor proteinelor de fuziune, condițiile de multiplicare a proteinelor purificate, au fost testate și dezvoltate. Acestea cuprind dializa inițială a proteinei de fuziune în soluția 1 M guanidină, urmată de diluarea cu 0,4 M a soluției de arginină. His-tag se îndepărtează din proteinele de fuziune, analizate mai sus pentru funcția biologică. Capătul separat este obținut prin tratarea proteinei de fuziune cu trombina din placenta umană. Pe lângă aceasta, secvențele de codificare a genei OB de șoarece și umane, minus secvența, semnal, trebuie să fie fiecare inserate în vectorul pET 12 c, aplicând metoda de clonare PCR. Aceste elemente de construcție pot fi direct sintetizate pe proteinele de fuziune OB, în spațiul periplasmatic al celulelor bacteriei gazdă. Proteina de fuziune separată din spațiul periplasmatic, necesită numai o simplă gel filtrare pentru a fi purificată din proteinele gazdă și nu va fi denaturată în timpul acestui procedeu.

Exemplul 3. Prepararea anticorpilor polipeptidei OB

25 În adăugare la utilizarea proteinei recombinare pentru generarea anticorpilor policlonali, un set de patru secvențe de peptide, din secvența OB murinică astfel dedusă, au fost identificate aplicând imulogenicitatea fragmentelor software (GCC Package). Cele patru fragmente de peptide cu carboxil terminal, sunt:

SEQ ID No. 18):

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

(SEQ ID No. 19):

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

(SEQ ID No. 20):

Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp

35 (SEQ ID No. 21):

Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Gys.

Aceste peptide sunt conjugate la KLH și peptidele KLH conjugate, sunt utilizate pentru imunizarea iepurilor, aplicând tehnici standard. Antiserul specific policlonal pentru fiecare peptidă este recuperat de la iepuri.

40 Exemplul 4. Translocarea polipeptidei OB, *in vitro*

În vederea confirmării prezenței secvenței semnal funcționale, cADN uman care include întregul cadru de citire deschisă, este subclonat în vectorul pGEM. Numai cADN uman este utilizat în acest experiment deoarece subclonele de șoarece n-au fost separate. Filamentul pozitiv de ARN ob uman este transcris aplicând polimeraza Sp6 și s-a utilizat în reacție de translație - *in vitro* - cu sau fără membranele microzomale pancreatice, canine. Produsul de translație primar care a migrat cu o greutate moleculară aparentă de 18 kD, care este confirmată cu cea prevăzută de secvența cADN. Incluziunea membranelor microzomale în reacție, a inhibat de 5 ori eficiența generală a translației. Cu toate acestea, circa 50-70% din producția de translație primar OB, au fost reduși cu circa 2 kD, în prezența preparatului de membrană, sugerând că secvența semnal este funcțională (fig. 19 A). Dimensiunea produsului de translație al interleucinei - 1 alfa ARN, care nu codifică secvența semnal, a fost neschimbată, când membranele microzomale au fost incluse în reacție. În vederea confirmării că translocarea proteinei OB a avut loc, produsele de translație - *in vitro* - au fost tratate cu Proteinaza-K. Tratamentul proteazei a rezultat în proteoliza completă a produsului de translație primar 18 kD, în timp ce forma prelucrată 16 kD nu a fost afectată prin tratamentul enzimatic, indicând că acesta s-a translocat în lumenul microzomilor (fig. 19 B). Datele sunt compatibile cu ipoteza că, OB este o moleculă secretată. După clivajul secvenței semnal, două reziduuri de cisteină vor rămâne în proteina prevăzută crescând posibilitatea ca molecula să conțină o legătură de bisulfură caracteristică altor polipeptide secretate (Shen et al. Science, 224: 168-171 (1984)).

Exemplul 5. Caracterizarea Genei OB

60 Pentru stabilirea legăturilor între modificările de obezitate și modificările genetice ale genei OB la om, secvența genei OB umane a fost determinată (vezi fig. 20 A până la C) (SLQ ID No. 22 și 24).

## MD 2311 G2 2003.11.30

44

Primerii specifici pentru secvența de codificare umană s-au utilizat pentru screeningul colecției PI umane. Au fost obținute trei clone PI, diferite, care s-au dezvoltat și amplificat PCR, aplicând primerii care flanchează porțiunea de legătura între primul și cel de al doilea exon de codificare. Intreaga regiune a intronului, în jurul 2 kb, a fost amplificată și parțial secvenționată (vezi fig. 20A, și așa cum s-a indicat în SEQ ID No. 22 și 24). Structura genei în ambele gene umane și murinice, a fost caracterizată aplicând analizele PCR și alte tehnici standard. Gena OB de șoarece s-a dovedit a fi confirmată celor trei exoni, din care al doilea și al treilea participă la interpretarea secvenței de codificare (fig. 20 D). Regiunea de codificare a genei OB umane prezintă aceeași structură; cu toate acestea, genei umane îi lipsesc exonul 5' și intronul (fig. 20 E).

Două seturi de primeri generați din secvențele intronice ale genei umane, au fost preparate (fig. 20 A ... C). Secvențele primerilor sunt următoarele (F și R se referă în continuare și respectiv invers):

HOB 1 gF 5'-CCC AAG AAG CCC ATC CTG-3' (SEQ ID No. 29)

HOB 1 gR 5'-GAC TAT CTG GG T CC AGT CCA GTG CC-3' (SEQ ID No. 30)

HOB 2 gF 5'-CCA CAT GCT GAG CAC TTG TT-3' (SEQ ID No. 31)

HOB 2 gR 5'-CTT CAA TCC TGG AGA TAC CTG G-3' (SEQ ID No. 32).

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

Exemplul 6. Exprimarea OB în drojdii

Urmărind clonarea pozițională a OB, este important ca să se dezvăluie mecanismul fiziologic prin care proteina OB reduce consumul de hrană și greutatea corporală. Primul pas în această direcție a fost de a produce recombinat o proteină funcțională, aplicând un sistem de exprimare. Pe lângă aceasta, relativ cu sistemul de exprimare bacterian, cu succes deplin, a fost selectat de asemenea un sistem de exprimare la drojdie. Exprimarea drojdiei are diferite caracteristici atractive, pentru exprimarea OB. Cea mai importantă este că, proteinele eucariotice active biologic sunt mult mai probabile de a fi produse. Polipeptida OB este secretată de celulele mamifere. Secreția de proteină este similară celor eucariotice, ceea ce înseamnă că aparatul secretor de drojdie este mult mai asemănător modului secretor la mamifere, relativ cu cel secretor la bacterii. În special, modificările de proteină OB atestate în celulele de mamifere vor putea fi atestate asemănător în exprimarea prin sistemul secretor de drojdie. Pe lângă aceasta, multiplicarea proteinei este efectuată în trecerea prin aparatul secretor, astfel se eliberează prin aparatul secretor al drojdiei, asemănător modului de multiplicare a proteinei cu o activitate biologică nativă. Acest fapt este semnificativ pentru OB, de oarece reziduurile celor două cisteine pot forma o punte bisulfurică.

În contrast cu modul secretor, zona de reducere a citoplasmei celulare, previne formarea punților bisulfurice și, de aceea, este esențial ca OB să treacă prin sistemul secretor în vederea formării acestei legături bisulfurice, *in vivo*. Și alte avantaje determină, cu ușurința și rapiditatea manipulării drojdiei, disponibilitatea vectorilor și a tulpinilor și o vastă experiență în domeniul tehnologiei recombinante la drojdie. Sistemul de exprimare pentru *Pichia pastoris*, a fost ales din patru motive: (1) acesta conține niveluri superioare de exprimare a proteinei heterologe, față de sistemele prezentate pentru drojdie, cum ar fi *Saccharomyces cerevisiae* (2) glicozilarea proteinei este foarte asemănătoare sistemului de mamifere în *Pichia pastoris* decât pentru *Saccharomyces cerevisiae*, (așadar, porțiunile de glicozilare nu au fost detectate pentru ob, aplicând un computer de cercetare, rămânând încă posibilitatea de glicozilare a porțiunilor neidentificate); (3) *Pichia pastoris* secretă foarte puține proteine native și, astfel, este în fond simplu de purificat proteina străină, astfel exprimată; și (4) vectorii și speciile de drojdie sunt produse acceptabile din punct de vedere comercial (din Invitrogen). Două strategii pentru generarea vectorilor de exprimare la drojdie, sunt prezentate în fig. 21 și 22. Vectorul ales este pPIC.9. Acest vector conține porțiunea de clonare chiar sub circuitul inferior al factorului de conjugare alfa, al secvenței de codificare prepro, care dirijează proteina codificată, prin gena clonată, în porțiunea de clonare care trebuie secretată de sistemul secretor. Altă caracteristică importantă a vectorului este gena HIS4, care permite selectarea pentru absorbția vectorului, aplicând tulpina de drojdie auxotropica pe mediul deficitar de histidină, urmând apoi transformarea drojdiei, cu acel vector. Strategia de clonare a fost următoarea: amplificarea PCR a cADN OB, aplicând primerul 5', care conține la capătul 3', secvența complementară secvenței OB, chiar după porțiunea de cleavaj a peptidului conducător, prevăzută și terminația 5' are o secvență complementară terminației 3' a secvenței factorului de conjugare alfa, al vectorului. Primerul 5' conține, așadar, o porțiune XhoI. Primerul 3' a fost desemnat să aibă la terminația 3', o secvență complementară la ultimii câțiva acizi amino ai OB și porțiunea EcoRI la terminația 5'. Urmărind

## MD 2311 G2 2003.11.30

45

amplificarea PCR, produșii PCR a fost digerat cu XhoI și EcoRI și clonat printr-o digestie similară pPIC.9. Urmărind clonarea ambilor cADN OB la om și șoareci, fiecare cu sau fără glutamină la codonul 49, clonele individuale au fost izolate pentru toate patru elementele de construcție și secvențate pentru a verifica că aceste elemente de construcție au fost clonate într-o orientare corectă și structură, care nu conține nici o mutație din faza de amplificare PCR. După identificarea clonilor cu secvența corectă, acestea au fost transformate în tulpină de *Pichia pastoris* GS115, un auxotrof de histidină. Pentru două elemente de construcție a OB la șoareci, clonele de drojdie transformate, sunt supuse unui screening pentru exprimarea proteinei. Ca urmare a menționării că drojdia transformată conține OB, s-au efectuat analiza ADN de absorbție și analiza de hibridizare a coloniei, ambele arătând secvența OB în drojdie transformată, dar nu și în drojdia netransformată. În continuare, drojdia transformată a secretat proteina 16kDa într-un mediu de cultură, în care, drojdia netransformată nu secretă o proteină de această dimensiune (fig. 23A). Aceasta este dimensiunea prevăzută a OB. Clonele individuale pentru ambele elemente de construcție la șoareci, au fost identificate ca fiind expresori superiori ai OB și curent, strategia de purificare a fost dezvoltată pentru purificarea ob, pentru omogenitate. O strategie a fost pentru purificarea OB pe o coloană cu schimbători de cationi (fig. 23B). Datele preliminare demonstrează că un schimbător cationic puternic poate fi utilizat. Cu toate acestea, după cromatografia cu schimbători cationici, produsul ob putativ este pierdut. Aceasta indică prezența unei proteaze în probă. O strategie pentru soluționarea acestei probleme, este de a prepara fuziunile His-tag ob pentru exprimare în drojdie (fig. 22). O alta evaluare a fost demonstrată pentru OB care nu se asociază solid cu His-tag, dar se asociază cu coloana Ni-chelare. Purificarea polipeptidului OB prin Ni-chelare, urmată de gel filtrare, duce la obținerea unui produs de o puritate suficientă pentru analiza spectrală de masă. Prin spectroscopia de masă, se confirmă că greutatea moleculară a proteinei exprimate, este identică cu greutatea moleculară prevăzută, care confirmă că OB a fost exprimată cu succes în Pichi. Cu toate acestea, procesul de purificare prin gel filtrare/Ni-chelare, nu produce o polipeptidă OB într-o formă suficient de pură. Adițional, sunt prezente molecule mici. Se pare că, activitatea proteolitică evoluează din coloana Ni-chelare în volumul liber. În acest sens, este planificat un procedeu de purificare în trei faze: Ni-chelare, schimb cationic (care elimină contaminanții cu molecule mici), urmand apoi gel-filtrarea. Prin estimarea nivelului de exprimare prin reacția de colorare cu albastru Coomassie și gelului SDS-PAGE, sunt prezentate circa 10 mg/l, când drojdia se dezvoltă în flacoane sub agitare. Aceste niveluri sunt așteptate să crească în vasele de fermentație și fermentația este inițiată în speranța obținerii unor cantități mai mari de proteină. Cu privire la elementele de construcție OB umane, clonele de drojdie transformate, conținând numeroase copii de genă OB, au fost identificate și este de așteptat ca acestea să exprime proteina OB. Pe măsura dezvoltării anticorpilor, aceștia vor fi utilizați pentru confirmarea identității proteinei secretate 16kDa.

Exemplul 7: Exprimarea nivelului superior al peptidei de fuziune OB la bacterii. Prepararea stocurilor congelate

La fiecare din cei doi alicoți de 4 ml de mediu sterilizat M9ZB, fără sursă de carbon, se adaugă 40 μl dextroză stoc (0,4 g/ml, filtrat pentru sterilizare), 10 μl stoc de ampicilină (200 mg/ml și 5 μl stoc de cloramfenicol (34 mg/ml, în etanol)). Pentru inoculare se aplică o singură colonie de *Escherichia coli* cu OB1 ADN clonat, uman și de șoarece, într-un vector Novagen pET - 14 b. Tuburile sunt incubate la temperatura de 37°C, până a doua zi. Se iau apoi 0,5 ml din culturile obținute a doua zi, care se aplică pentru inocularea a 50 ml de mediu M9ZB cu dextroză, ampicilină și cloramfenicol. Acestea sunt incubate la temperatura de 30°C și absorbanta la 600 nm ( $A_{600}$ ) a fost monitorizată periodic. La  $A_{600}$  de circa 1-1,2, 175 μl alicoți de cultură, se amestecă cu 25 μl 60% glicerol în tuburi eppendorf, de 2 ml, congelate rapid în lichid de nitrogen și păstrate la temperatura de -80°C.

Dezvoltarea culturii: 50 ml din mediul M9ZB cu 0,5 ml de dextroză 40%, 125 μl ampicilina stoc și 50 μl cloramfenicol stoc, au fost inoculați cu 1 ml stoc congelat și incubat la 30°C. La  $A_{600}$  1-1,2, 10 ml din aceasta cultură se aplică pentru inocularea fiecărui grup de patru flacoane a câte 2 litri, cu 500 ml din mediul M9ZB cu dextroză, ampicilină și cloramfenicol. Materialul este incubat la 30°C până la o inducție de  $A_{600}$  de circa 1...1,2 cu o concentrație incluziune de 0,5 mM IPTG. Culturile sunt incubate până a doua zi. Celulele sunt recoltate prin centrifugare la 4000 rotații pe minut, timp de 20 de minute. Acest sistem de exprimare produce o polipeptidă OB recombinată, ca un procentaj superior, corect, de proteine totale, pe ordinul de grame/litru de *Escherichia coli*.

Liza celulară și resuspendarea corpurilor de incluziune: pasta celulară este resuspendată într-un volum minim de 20 mM HEPES la pH 7. 2, 10% glicerol, 0,1M KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% aprotinină, 1 mM PMSF, 5 μg/ml leupeptină și 50 μg/ml DNază I. Suspendarea a fost urmată de congelare, decongelare de trei ori, aplicand nitrogen lichid și apă caldă. Celulele lizate sunt apoi centrifugate la 18000 rotații pe minut, timp de 30 de minute și resuspendate în 20 mM HEPES, la pH 7,5,

0,1 M NaCl. Suspensia este sonicată, adăugând apoi Triton X100, la o concentrație incluziune de 2%. Această suspensie este apoi centrifugată timp de 15 minute la o viteză de 18000 rotații pe minut. După mai mult de două astfel de cicluri, sunt efectuate trei cicluri de spălare cu Triton liber. În final, peletele se

## MD 2311 G2 2003.11.30

46

dizolvă în 6 M GdHCl (guanidină clorhidrică), 20 mM HEPES la pH 7,5 prin sonicare, urmata de centrifugare. Supernatantul este utilizat pentru o altă purificare. Proteina OB este purificată în stare nemultiplicată, prin cromatografie de afinitate ionică cu metale imobilizate (IMAC). Soluția este aplicată la o coloana de 40 ml, de la Pharmacia, de sefăroză cu debit fix de chelare, încărcată cu 5 volume de 50 nM NiSO<sub>4</sub> și care se echilibrează în 6 M Gd HCl, 20 mM HEPES, la pH 7,5. Coloana este spălată apoi cu 6 M Gd HCl, 30 mM imidazol, 20 mM HEPES la pH 7,5. În final, proteina este diluată cu același tampon conținând 0,2 M imidazol. Proteina nemultiplicată se aduce în 6M GdHCl, și se păstrează la 4°C, după adăogare de acetat de sodiu (NaAc) până la 10 mM și pH-ul este ajustat la circa 4,5 cu acid acetic.

Remultiplicarea și purificarea proteinei: o soluție de 6 M GdHCl conținând 100 mg de proteină, este tratată cu 67 μl de 1 M ditiotreit (DTT) și se diluează la circa 67 ml cu 6 M GdHCl, 10 mM NaAc, la pH 4,5. Amestecul se lasă sub agitare la temperatura camerei, timp de circa o oră. Se diluează apoi cu 4 l de glicerol 20%, cu 2. 5 mM CaCl<sub>2</sub> și 20 mM Tris, la pH 8,4 cu amestec tampon, sub agitare. După omogenizare, soluția rămâne la temperatura camerei, timp de circa 8 ore cu agitare continuă. Se adăogă apoi 2000 unități de trombină de bovine purificată (din trompostat, produs Parke-Davis) și amestecul rămâne în continuare sub agitare lentă. După 2,5 ore, amestecul este redozat cu 2000 unități de trombina și clivajul histidinei-tag este continuat încă 3 ore. Clivajul trombinei este oprit prin adăogarea PMSF, la o concentrație incluziune de 0,1 mM. Soluția este filtrată și păstrată la temperatura de 4°C. Proteina clevată este apoi purificată pe aceeași coloană IMAC ca mai sus, echilibrată în 1 M KCl, 20% glicerol, 20 mM HEPES, la pH 8,4 cu amestec tampon. După încărcarea soluției de proteine, aceasta se spală cu același amestec tampon și proteina clevată este diluată cu 1 M KCl, 20% glicerol, 40 mM imidazol, 20 mM HEPES, la pH 8,4. Proteina neclevată este diluată la 0,2 M imidazol. proteina clevată, purificată, este concentrată, tratată cu 50-100 mM EDTA, 10 mM fericianidă de potasiu (pentru completarea oricărei oxidari incomplete) și se filtrează prin gel, pe o coloană superdex 75 16/60. Aplicand acest procedeu, se obține un procent apropiat de 50% proteină inițială. Odată ce este purificată, proteina exprimată este caracterizată prin diferite metode. Caracterizarea fizică include metode de dispersare ușoară, dinamică, pentru determinarea omogenității structurii și se aplică ca măsură a propriei multiplicări. Datele obținute prin dispersarea ușoară, atestă că polipeptida OB umană este exprimată predominant sau exclusiv ca monomer, în timp ce polipeptida OB murinică poate fi demonstrată ca dimer, cât și ca monomer. Analizele cu reactivul Eliman și analiza spectroscopică de masă, confirmă că reziduurile de cisteină formează o legături bisulfurică la proteină. Această formă oxidată a polipeptidei este administrată la șoareci, așa cum este descris *infra*, fiind demonstrate, activitatea biologică. Dicroismul circular este utilizat pentru determinarea brută a geometriei structurale a proteinei. Spectrele CD în tamponul fiziologic (pH de circa 8, circa forța ionică fiziologică) atestă că polipeptida OB umană are circa 60% structură alfa-helicală și circa 40% structură arbitrară, inelară. Polipeptida OB murinică a fost demonstrată că are circa 50% structură alfa-helix și 50% structură arbitrară, inelară, prin spectroscopie CD. Proteoliza limitată, urmată de spectrometrie de masă (Cohen et al. 1995, supra), a fost utilizată pentru identificarea porțiunilor de polipeptidă OB, care sunt accesibile proteolizei. Analiza a demonstrat prezența unei structuri spiralate flexibile a reziduurilor de aminoacizi 54 până la 60 ( așa cum se atestă în fig. 4). Asemănător, această spirală se conectează la două domenii cu structuri definite 2°, bunăoară alfa-helix. Important este, așa cum s-a arătat în exemple, că bioactivitatea proteinei purificate a fost analizată prin administrarea proteinei la rozătoarele slabe, cât și la cele obeze, cu o pompă osmotică (bunăoară o pompă osmotică ALZET. de la Alza Corporation, Palo Alto, CA) sau prin doze bolus zilnică administrată intraperitoneal, o perioadă de cel puțin două săptămâni, fiind observate efectele privind comportamentul, hrane și greutatea corporală.

Exemplul 8. Efectele de reducere a greutateii de polipeptida OB (Leptin)

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

Materiale și metode

Leptinii au fost imunizați cu proteina recombinată, în adjuvantul Freund (HRP, Inc.). Anticorpul OB anti-șoarece imunopurificat, sunt preparați prin trecerea antiserului peste coloana de sefăroză 4B, conjugat cu proteina recombinată, așa, cum este descris de (Harlow et al. Antibodies: A Laboratory

## MD 2311 G2 2003.11.30

47

Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)). Imunoprecipitarea plasmiei de șoarece a fost efectuată după cum urmează: 0,5 ml de plasmă de la șoarece, șobolan și om, conținând circa 2,5 mM EDTA, se aduc pentru pre-ciarificare cu sefaroza -4B neconjugată, la temperatura camerei, prin basculare timp de 2 ore. Sefaroza este îndepărtată printr-un sistem de rotire și apoi se

5 adaugă 50 ml de suspensie 50% de anticorp conjugat cu sefaroză, conținând anticorpul purificat prin afinitate, la o concentrație de 1 mg/ml de seroză utilizată. O jumătate de mililitru de 2 x RIPA m tampon se adaugă pentru a se obține condițiile legăturii incluziunii, după cum urmează: 50 mM Tris-HCl, la pH

10 7,5, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% dezoxicolat de sodiu și 0,025% azidă de sodiu. Reacția este efectuată până a doua zi la temperatura de 4°C, cu basculare. Sefaroza conjugată cu anticorpul, se spală de 8 ori, aplicând un tampon RIPA, urmată de spălarea de trei ori cu PBS și apoi cu SDS-PAGE

15 15%. Proteinele sunt transferate pe nitroceluloză și analizate prin absorbția Western, cu un anticorp imunopurificat biotinitat, relativ cu proteina recombinată. Anticorpul secundar este utilizat pentru detectare, HRP-streptavidin și ECL. Pentru determinarea cantitativa a polipeptidei OB în serul de șoarece, cantitățile crescute de proteină OB recombinată multiplicată, de șoarece (0,01 ng, 0,1 ng, 0,5 ng, 2,0 ng și

20 15,0 ng) se adaugă la 100 μl de plasmă ob/ob C57BL/6J și se incubează la 4°C, timp de 3 ore cu sefaroza proteină A, conjugate cu anticorpul. După o spălare extensivă cu tamponul A (10 mM fosfat tampon de sodiu la pH 7,4; 100 mM NaCl; 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 1nM PMSF), probele sunt resuspendate în tamponul simplu, se încarcă pe 15% SDS-PAGE și se retransferă pe membrana de nitroceluloză. Analiza de absorbție Western este realizată aplicând un anticorp anti-amino-terminus biotinitat,

25 imunopurificat, ca anticorp primar și HRP-streptavidina, ca anticorp secundar, urmând detectarea prin ECL. Extractele citoplasmice sunt preparate prin omogenizarea țesutului adipos în tampon NDS (10 mM Tris la pH 7,5, 10 mM NaCl, 60 mM ICCI, 0,15 mM spermină, 0,5 mM spermidină, 14 mM beta-mercaptoetanol, 0,5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0,5% NP-40), prin omogenizare de politron și omogenizarea dounce și apoi se separă nucleii prin efectuarea centrifugării la 700 g. Imunoprecipitățile

30 sunt realizate așa cum s-a descris mai sus, exceptând faptul că, se aplică anticorpii OB anti-umani imunopurificați. Pentru ELISA, 100 ml de soluție 1 mg/ml de anticorp OB anti-uman imunopurificat, se dizolvă într-o soluție PBS tampon borat și se aduce peste noapte pentru microtitrare (Corning cat. #2595) pe plăci la temperatura de 4°C. Plăcile se spală apoi de 4 ori cu o soluție salină de borat, conținând 0,05 % Tween 20 și lichidul în exces este îndepărtat. Plăcile sunt blocate prin incubare la temperatura camerei,

35 timp de 2 ore cu 240 ml per cavitate, de soluție salină borat conținând 0,3% geletină și apoi se spală și se usucă. Atât cantități cunoscute de probe de proteină OB umană multiplicată sau probe de plasmă, într-un volum de 100 ml, sunt incubate în cavități individuale, până a doua zi, la temperatura de 4°C. După spălare, plăcile sunt incubate cu 100 ml de anticorp anti-uman imunopurificat, biotinitat (0,1 mg/ml în soluția de gelatină cu tampon borat), timp de 4 ore, la temperatura camerei. După spălare, se adaugă pe

40 plăci (HRP)-streptavidina peroxideza din hrean (0,1 mg/ml de tampon borat, 0,3% gelatină). Soluția substratului HRP (ABTS, 0,3 mg/ml și H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,01% în acid citric) este apoi utilizată pentru detectarea și măsurarea O.D., la 414 nM, pentru determinarea cantitativă a legăturii la anticorp. Secvențele codificate ale genelor OB umane și de șoarece, sunt amplificate PCR din plasmidele care conțin secvențele cADN OB și sunt subclonate în plasmidul pPIC.9 (Invitrogen). Primerul 5' uman, utilizat a fost:

45 5'GTA TCT CTC GAG AAA AGA GTG CCC ATC CAA AAA GTC CAAG 3' (SEQ ID No. 34)  
și primerul 3' utilizat, a fost:  
5' GCG CGA ATT CTC AGC ACC CAG GGC TGA GGTC 3' (SEG ID No. 35 ).

Pentru șoarece, primerul utilizat a fost:

5' GTA TCT CTC GAG AAA AGA GTG CCT ATCCAG AAA GTC CAGG 3' (SEQ ID No. 36 )

50 și primerul 3' a fost:  
5' GCG CGA ATT CTC AGC ATT CAG GGC TAA CATC 3' (SEQ ID No. 37 ).

Primerul 5', atât pentru șoarece, cât și cel uman, conține porțiunea XhoI la terminația 5' și secvențele de codificare pentru ultimii 4 aminoacizi ai secvenței semnal, factorului de conjugare alfa, prezent în vectorul pPIC 9. Acest vector dirijează secretarea genelor exprimate heterolog, din celulele mediului de cultură Primerul 5' PCR, include, așadar, primele 19 nucleotide ale genei OB în cadrul de citire deschis, după porțiunea de clevej a secvenței semnal, înainte de alanină, la aminoacidul din poziția 21. Primerul 3' conține porțiunea EcoRI la terminația 5', care este urmat imediat de secvențele complementare codonului stop OB putativ. Condițiile PCR sunt următoarele: denaturarea timp de 1 min la 94°C, susținerea timp de 1 min la 55°C și extensia timp de 2,5 min la 72°C. Ciclul inferior PCR (15

55 cicluri) și PFU polimeraza de control a citirii (Stratagena) se aplică pentru a limita numărul de mutații generate de PCR. Produsele PCR au fost digerare cu XhoI și EcoRI și clonate într-un vector de digestie

## MD 2311 G2 2003.11.30

48

similar, pPIC9. Toate elementele de construcție au fost secvenționate la ambele filamente, pentru a asigura absența oricăror mutații generate de PCR. Clonele sunt transformate în *Pichia pastoris* (His<sup>r</sup>), prin metode sferoplast și selectate pe un mediu deficitar în histidină. Circa 200 șoareci și clone

5 hibridizare a coloniei. Clonele, în număr mare de copii, sunt apoi analizate pentru exprimarea OB, inițial prin colorare Coomassie, arătând prezența unei noi proteine 16 kD, prezenta în mediul de cultura al drojdiei transformate. Banda 16 kD a fost confirmată a fi OB, aplicând anticorpii dezvoltati relativ cu proteina OB bacteriană exprimată. Proteinele recombinante sunt purificate prin metoda de purificare în două faze descrise în continuare. Spectrometria de masă, și tratamentul cu bromură de cianogen, se

10 realizează așa cum este descris de (Beavis et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6873-6877 (1990)). Întreaga secvență codificată OB din genele OB umane și de șoarece, cu C-terminal la secvența semnal, este subclonată în vectorul de exprimare pET15b (Novagen) și exprimată superior în *Escherichia coli* (BL21(DE3) pLYsS), utilizând sistemul polimerazei T7 ARN (Studier et al. Meth. Enzymology, 185:80-89 (1990)). Celulele dezvoltate la temperatura de 30°C, la o absorbantă de 0,7 la 595 nm și induse cu 0,5 mM izopropil-beta-D-tiogalacto-piranozidă, până a doua zi, sunt colectate prin centrifugare cu viteză scăzută. Liza este realizată prin trei cicluri de congelare-decongelare și digestia de ADN este realizată cu DNaza I. Extracția membranei a fost realizată prin sonicarea și solubilizarea detergentului și

15 pelitele corpului de incluziune final, sunt dizolvate în 6 M guanidină -HCl, 20 mM HEPES, pH 8,4. Proteinele recombinante OB sunt purificate în condiții denaturate, prin IMAC, aplicând o coloană de afinitate a ionilor de Ni și prin spălări cu cantități crescute de imidazol. Proteina OB denaturată, purificată, a fost apoi depozitată în 6 M guanidină clorhidrică, 10 mM acetat de sodiu (NaAc), la pH 5 și redusă prin utilizare de 1 mM DTT, la temperatura camerei, timp de o oră. Denaturarea este realizată prin diluarea proteinei reduse în 20% glicerol, 5 mM GaCl<sub>2</sub>, 5 mM NaAc la pH 5, prin omogenizare și incubare la temperatura camerei timp de 8-12 ore. După denaturare, pH-ul este ajustat la 8,4, prin adădire de Tris, la 10 mM și hexa-histidins-tag este îndepărtată prin clivajul trombinei. Proteina clevată, renaturată este repurificată prin IMAC, pentru separarea produsului din trombina și proteina de fuziune, neclevată. Proteina renaturată, clevată, este diluată de pe coloana de afinitate ionic, Ni la 40 mM imidazol, în care trombina nu este reținută și proteina de fuziune neclevată este eluată la 0,2 mM imidazol. Produșii este apoi concentrat, tratat cu 100 mM EDTA și 10 mM fericianură de potasiu și apoi este purificat prin gel-

20 filtrare, aplicând coloana superdex 75 16/60 de la Pharmacia.

Analiza Ellman este efectuată așa cum este descris de Ellman, Arch. Biochem. Biophys., 82: 70-77 (1959). Reactivul Ellman este preparat prin dizolvarea a 39, 6 mg de 5,5'-ditiobis (acid 2-nitro-benzoic) (DTNB) în 10 ml de 0,05 M fosfat, la pH 8. O curbă de calibrare a fost construită în ordinul de concentrate 10-120 mM sulfhidril liber ( aplicând 1 mM soluție stoc de DTT redus) la 412 nm. Fiecare analiză a fost realizată, aplicând reactivul Ellman 0,02 ml și având un amestec de reacție total de 0,5 ml. Coeficientul de extincție măsurat, a fost de 12974 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, pentru o grupare de sulfhidril liberă (coeficientul de corelare fiind de 0,99987), care constituie 5% din valoarea raportată mai sus, de 13600 M<sup>-1</sup>, cm<sup>-1</sup>. Se supun apoi analizei Ellman, cincizeci de ml din proteina gel filtrată, pura 2 mg/ml, corespunzător la o concentrație posibilă de sulfhidril liber, de circa 24 mM, în amestecul de reacție final. Soluția, rezultată are o valoare pentru A<sub>412</sub> de circa 0,02, sugerând că cele două reziduuri de cisteină din

35 proteină, sunt în stare oxidată formând cisteina și că grupările sulfhidrilice libere sunt complet introduse în nucleul inaccesibil al proteinei multiplicate. Rezultate identice au fost obținute prin efectuarea aceleași analize pe o proteină, nemultiplicată, în prezență de 6 M guanidină clorhidrică. Șoarecii sunt aduși în cuști individuale, în atmosferă liberă de patogeni și acclimatizați la o dietă conținând 35% (greutate/greutate). Dieta de Laborator pentru rozătoare, 5001 (PMP Feeds, Inc.), 5,9% (greutate/ greutate) amestec de puding tapiocă (General Foods) și 59, 1% apă, care are un conținut de energie de 1,30 kcal/gm. Dieta este sterilizată la autoclav și împachetată în discuri de material plastic de 60 mm, care sunt fixate la partea superioară a discurilor Petri de 100 mm. Tapioca este o dietă care se dă într-un material textil, ca o pastă, făcând-o astfel dificilă pentru animalul care împrăștie hrana în cușcă. Cu ajutorul capacelor de 100 mm, se recuperează micile cantități de hrană, împrăștiate de animal. Un disc proaspăt de hrană este adus în cușcă în fiecare dimineață și în ziua precedentă, discul este recuperat și cântărit. Diferența de greutate prevede o măsurare zilnică a consumului de hrană. Efectele proteinei recombinante asupra consumului de hrană și greutateii corporale, sunt măsurate la trei specii de șoareci: C57 B1/6J ob/ob, C57 B1/Ks db/db și CBA/J +/-, care provin de la Laboratorul Jackson. Un număr de 30 de șoareci din fiecare specie, se împarte în

45 grupe de câte 10,0 grupă, din fiecare specie, primește zilnic injecții intraperitoneale (i.p.) cu proteina ob bacteriană multiplicată, la o doză de 5 mg/g/zi, în 300 μl de PBS. O a doua grupă primește injecții intraperitoneale ( i.p.) cu același volum de PBS. Acești șoareci martor, primesc injecții cu PBS dializat conținând proteina recombinată. PBS se clarifică de endotoxină, aplicând o coloană ETOX Acticlean. Un al treilea grup de animale nu primește injecții. Consumul de hrana este înregistrat zilnic și măsurătorile greutateii corporale sunt înregistrate periodic, la intervale de peste 3,5 săptămâni. Pentru experimentul

50

55

60

hranei la perechi de animale, consumul de hrană a fost estimat la o grupă separată de șoareci ob, zilnic, relativ cu consumul la șoarecii ob care au primit proteină.

#### Rezultate

Proteina OB care circulă în plasmă de șoarece, șobolan și în plasma umană.

5 Proteina OB recombinată de șoarece și umană, se prepară aplicând pET 15 b vector de exprimare bacteriană (Novagen) și prin clonarea în *Pichia pastoris* a sistemului de exprimare la drojdie care secreta proteinele recombinante direct în mediul de cultură. Proteina ob exprimată în drojdie, include 146 aminoacizi carboxiterminali la secvența semnal, iepurii sunt imunizați cu proteine bacteriene (HRP, Inc.).

10 Anticorpii sunt imunopurificați (Research Genetics) și utilizați pentru imunoprecipitări și analizele de absorbție Western pentru proteina, din plasmă și țesutul adipos. Proteina OB din plasma de șoarece, migrează cu o greutate moleculară aparentă de 16 kD, prin SDS-PAGE. Mobilitatea electroforetică este identică cu cea a proteinei OB recombinante, secretată de drojdie, după îndepărtarea secvenței semnal (fig. 24 A). Proteina n-a fost detectată în plasma de șoarece C57 BL/6J ob/ob, care are o mutație nonsens la codonul I05. Prin diverse tipuri de antiser, se poate identifica catena polipeptidică cu rezidulul 105 redus,

15 atestat prin secvența cADN. O creștere de 10 ori a nivelului de circulație a proteinei, a fost înregistrată la șoarecele db/db relativ cu animalul martor (fig. 24 A). Imunoprecipitarea plasmei din tipul sălbatec și fa/fa de șobolan, determină o creștere de 20 de ori a nivelului proteinei OB la șobolanul mutant, comparativ cu cel de tip sălbatec (fig. 24 B). Rezultatele mutației db la fenotipul obez, sunt identice cu cele observate la șoarecele ob (Bahary et al., 1990, supra), șobolanii grași fiind obezi ca rezultat al mutației recesive în gena omoloagă db (Truett et al., 1991, supra). În vederea determinării cantitative a nivelului de OB în plasma de șoarece, cantitățile crescute de proteina recombinată sunt adăugate la ser și imunoprecipitate (fig. 24 C). O creștere lineară a intensității semnalului înregistrată prin absorbție Western, înseamnă cantități crescute de proteină recombinată. Compararea intensității semnal a proteinei native în plasma de șoarece, cu cea standard, demonstrează că nivelul de circulație a proteinei OB la

25 șoarecele de tip sălbatec, este de circa 20 ng/ml. Aceste date demonstrează că, imunoprecipitățile și analizele de absorbție Western, au fost efectuate în condiții de exces de anticorpi. Nivelurile crescute de proteină OB au fost, așadar, atestate în extractele proteice din țesutul adipos la șoarecele db/db, prezentate la martor (fig. 24 D). Așa cum era de așteptat pentru o proteină secretată, proteina din țesutul adipos a fost fracționată cu fracțiunea de membrană bruta (datele nu sunt prezentate). Probele de plasma de la șase subiecți umani slabi, având indicii de masă corporală mai mic decât 25 (BMI= greutate/lungime<sup>2</sup>), au fost imunoprecipitate aplicând anticorpii imunopurificați, la proteina umană. Materialul imunoprecipitat a migrat cu o mobilitate identică electroforetică cu cea atestată pentru 146 de aminoacizi ai proteinei umane exprimată în drojdie. Intensitatea semnalelor variază semnificativ între cele șase probe (fig. 25 A). Prin densitometrie autoradiografică se constată o diferență de circa cinci ori în nivelurile individuale HPI și HP6, cu niveluri intermediare la alți subiecți. O imunoanaliză pe bază enzimatică (ELISA) a fost dezvoltată, aplicând anticorpurile imunopurificate și proteina bacteriană multiplicată ca standard (vezi în continuare). Curba standard rezultată este arătată în fig. 25 B. Aplicând această analiză, nivelurile de plasmă ale proteinei OB la șase probe de plasmă umană, variază între 2 și 15 ng/ml (fig. 25 C). Nivelul de proteină OB din plasmă de la HP6 a fost în afara gradului linear al imunoanalizei și ≥15 ng/ml. Aceste diferențe cantitative au fost corelate cu cele rezultate din analiza de absorbție Western.

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

#### Trăsăturile structurale ale Proteinei OB.

50 Deoarece proteina OB are două reziduuri de cisteină, aceasta ar putea forma legături intramoleculare sau intermoleculare cu bisulfura, în condiții de oxidare *in vivo*. Analiza de absorbție Western se repetă cu sau fără adădire de agenți reducători, la tamponul simplu. În ambele condiții, proteina OB din serul uman, migrează ca monomer (datele nu sunt prezentate). În condiții nereducătoare, proteina imunoprecipitată din serul de șoarece db, a fost detectată la pozițiile confirmate cu cele ale ambilor monomeri 16 kD și dimeri de circa 32 kD (fig. 26 A). Jumătatea din greutate moleculară ridicată, care dispare în condițiile de reducere, demonstrează că o fracțiune din OB circulă la șoarece ca o specie de greutate moleculară mult superioară, cu formarea unei legături de bisulfură, intermoleculare. Circa 80% din OB de șoarece, circulă aproximativ ca proteină 16 kD și 20% aproximativ ca 32 kD formă de proteină. Aceleași forme moleculare s-au atestat când proteinele de șoarece și proteinele umane sunt exprimate în *Pichia pastoris* (Abrams et al. Immunol. Rev., : 5-24 (1992)). În aceste studii, secvența ADN corespunzătoare la cei 146 de aminoacizi ai proteinei OB mature, a fost clonată la partea inferioară a secvenței semnal cu factor alfa

de conjugare, în vectorul pPIC.9 (Invitrogen). Proteina OB a fost purificată din mediul de drojdie al speciilor care exprimă proteinele de șoarece și proteinele umane și se supuse electroforezei în condiții reducătoare și în condiții nereducătoare (fig. 26 A). Proteina de la șoarece a fost exprimată în fond în drojdie, ca dimer în condiții nereducătoare și numai ca monomer în prezența agenților reducători.

5 Proteina umană recombinată migrează în poziția monomerului, în ambele condiții (datele nu sunt prezentate). Proteina umană purificată exprimată în *Pichia*, are o masă moleculară de  $16,024 \pm 3$  Da, așa cum s-a determinat prin spectrometrie de masă (1990, Beavis, supra). Această valoare este în concordanță cu masa calculată din secvența de aminoacizi ai proteinei, conținând o singură punte de bisulfură, intramoleculară ( $16,024$  Da). Analiza spectrometrică de masă, cu desorbție laser pe matriță, pentru

10 produsele de cleavaj ale proteinei, în mediu de bromură de cianogen, atestă că cisteinele 117 și 167 sunt legate printr-o legătură de bisulfură intramoleculară (fig. 26 B). Bromura de cianogen determină clivajul grupării carboxi terminal, la reziduurile de metionină.

Prepararea și Caracterizarea Proteinei Recombinate Bioactive.

Proteina OB de șoarece s-a exprimat în *Escherichia coli*, din plasmidul pET 15 b, ca o proteină de

15 fuziune insolubilă, cu reziduul 20 hexe-histidină-tag N-terminal, conținând o porțiune de cleavaj a trombinei. Corpurile bacteriene de incluziune, au fost solubilizate aplicând guanidină clorhidrică și au fost purificate în condiții de denaturare, aplicând cromatografia de afinitate ionică de metal imobilizat (IMAC) (fig. 27). Proteina de fuziune denaturată, purificată, a fost redusă, diluată și s-a permis astfel multiplicarea acesteia în soluție apoasă la temperatura camerei. După clivajul trombinei, proteina OB de șoarece,

20 renaturată, conținând reziduuri cu N-terminal adiționale în număr de patru (Gly-Ser-His-Met; SEQ ID No. 38) a fost repurificată prin IMAC, la un grad de omogenitate  $> 98\%$ , așa cum s-a judecat prin spectrometrie de masă și prin sistemul SDS-PAGE. Spectrometria de masă, prin desorbția laser pe matriță, duce la o măsură a masei de  $16,414 \pm 3$  Da (masa prevăzută =  $16,415$  Da). Ambele metode SDS-PAGE pe gel, de reducere și nereducere demonstrează o singură specie moleculară, cu greutate aparentă

25 și moleculară de  $16$  kD (datele nu sunt prezentate). Dispersarea ușoară, dinamică aplicând detectorul de dimensionare moleculară DP 801 (Protein Solutions, Inc.) demonstrează că, proteina OB renaturată de șoarece este foarte monomerică, cu câteva componente de ordin superior. Proteina este tratată cu EDTA și oxidată chimic. Speciile cu greutate moleculară ridicată sunt apoi separate prin gel filtrare. Prin dispersarea ușoară, dinamică, se confirmă apoi ca proteina OB recombinată, renaturată la șoarece este

30 monodispersată. Urmărind dializa relativ cu tamponul fosfat salin (PBS), endotoxina bacteriană este separată, aplicând o coloană ETOX Acticlean (Sterogene Bioseparations, Inc.). Randamentul final de proteina a fost de  $45$  mg/l.

Analiza Ellman a fost efectuată pe proteina OB recombinată, renaturată de șoarece, pentru a evalua stadiul de oxidare (Ellman, 1959, supra). Ambele proteine, cea renaturată și proteina prelucrată cu  $6M$  guanidină clorhidrică, au demonstrat un conținut de sulfhidril liber  $< 0,5\%$ , demonstrând astfel că, produsul monomeric conține o legătură intramoleculară de bisulfură. Aceasta se confirmă prin spectrometrie de masă a produselor de cleavaj în bromură de cianogen, pentru proteina bacteriană

35 multiplicată (datele nu sunt prezentate).

Bioactivitatea proteinei OB. Proteina OB recombinată, renaturată, purificată, de șoarece, s-a administrat sub formă de injecții zilnice intraperitoneale, cu  $5$  mg/kg/zi, la grupele de  $10$  C57B1/6J ob/ob (vârsta de  $16$  săptămâni), C57Bl/Ks db/db (vârsta  $12$  săptămâni) și grupa de șoareci CBA/J +/+ (vârsta de  $8$  săptămâni). Un număr egal de animale a primit PBS ca injecție zilnică. PBS utilizat pentru injecțiile de control, este derivat din dializatul obținut după echilibrarea proteinei. Animalelor adiționale din cele trei specii de șoareci, nu li s-au făcut injecții. Hrana consumată de animalele individuale, a fost monitorizată zilnic și greutatea animalelor a fost înregistrată la intervale de trei sau patru zile. Rezultatele cumulative pentru consumul de hrană și pentru greutatea corporală, din fiecare din cele  $9$  grupe de șoareci, sunt prezentate în fig. 28 A ... F, iar semnificația statistică a datelor, este prezentată în tabelul 1. Consumul de hrană la șoarecii C57B16J ob/ob injectați cu proteină, a fost semnificativ scăzut după prima injecție și a

45 continuat să scadă până în cea de-a  $5$ -a zi, cand acesta este stabilizat la un nivel egal cu circa  $40\%$  din consumul animalelor care au primit injecții cu PBS ( $p < .001$ ). Injecția falsă de OB, la șoarece nu duce la pierderea greutății, pe parcursul perioadei de studiu de trei săptămâni. Șoarecii C57B1/6J ob/ob cărora li s-a administrat proteina, au pierdut circa  $10\%$  din greutatea corporală, după  $5$  zile ( $p < .001$ ). Aceste animale au continuat să piardă din greutate în perioada de tratament de peste trei săptămâni, iar de la acest punct, greutatea animalelor ob care au luat proteina a scăzut în mediu cu  $60\%$  din greutatea inițială ( $p < .0001$ ). O grupă aparte de șoareci ob a fost hrănită perechi, paralel cu șoarecii ob care au primit proteină. Datele din

50 fig. 29 B atestă că această grupă de perechi, a înregistrat o pierdere cu mult mai mică în greutate, relativ cu animalele care au primit proteina recombinată ( $p < .02$ ). O fotografie a doi șoareci, care au primit injecții fie cu proteină, fie cu vehicul, atestă o mare diferență în apariție, care rezultă din tratamentul cu proteine (fig. 29 B). În vederea stabilirii în continuare a efectelor proteinei, s-au realizat autopsiile a doi

60 șoareci din fiecare grupă. Inspecția globală a șoarecilor ob care au primit proteină, atestă o scădere dramatică a grăsimii corporale, ca și dimensiunile ficatului. Greutatea ficatului la șoarecele db și de tip

## MD 2311 G2 2003.11.30

51

sălbatec, este neschimbată la tratament. Ficatul șoarecilor ob care au primit injecții cu PBS, au cântărit 5,04 și 5,02 grame vs. 2,23 și 2,03 grame la animalele care au primit proteina recombinată. În contrast cu caracteristica ficatului gras, pal, la șoarecele ob, ficatul de la șoarecele ob care a primit proteină, obține caracteristica culorii închise de ficat normal (fig. 29 C). Secțiunile histologice ale ficatului, atestă că, animalele netratate, au ficatul gras care a marcat o îmbunătățire la animalele tratate cu proteină (datele nu sunt prezentate). În contrast cu șoarecii ob, nu s-au demonstrat diferențe semnificative de greutate corporală sau consum de hrană la șoarecii C57BL/Ks db/db, care primesc proteină, în raport cu grupa martor care primește vehiculul (fig. 28 A ... F, Tabelul 1). Toate cele trei grupe de șoareci dt/db au pierdut între 2 și 5 g în greutate, în perioada de tratament. Glucoza. sanghină medie la șoarecii db/db a fost măsurată aplicând un glucometru și a. fost de  $\geq 500$  mg/dl la toți șoarecii, indicând că aceste animale au dezvoltat diabetul secundar, până la obezitate. Injecția șoarecilor db, a fost terminată după două săptămâni.

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

Tabelul 1

Grupa de animale	Grupa de tratament	Zile	Modificarea greutății			
			n	media eroare standard		p
ob/ob	proteină vehicul	1-5	10	-6,38000000	0,47628190	<0,001
			9	0,14444444	0,24444444	
	proteină vehicul	1-12	10	-14,45000000	0,70793126	<0,001
			9	0,98888889	0,38058975	
	proteină vehicul	1-27	6	-24,28333333	0,69924563	<0,0001
			5	4,30000000	0,79874902	
db/db	proteină vehicul	1-5	10	-1,47000000	0,36939891	0,240
			10	-2,00000000	0,23142073	
	proteină vehicul	1-12	10	-3,75000000	0,77348418	0,610
			10	-4,19000000	0,34655447	
CBA/J	proteină vehicul	1-5	10	-0,48000000	0,17876117	0,006
			10	0,38000000	0,21489015	
	proteină vehicul	1-12	10	-0,12000000	0,45748103	0,015
			10	1,20000000	0,18378732	
	proteină vehicul	1-27	5	1,98000000	0,48723711	<0,651
			6	2,23333333	0,20763215	

### Discuții

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

## MD 2311 G2 2003.11.30

52

OB la șoarece este exprimată în drojdie, arătând că, predilecția proteinei de șoarece pentru a forma, dimeri, este rezultatul diferențelor de secvențe primare, raportate la cele umane. În timp ce este clar că monomerul are bioactivitate, activitatea funcțională a dimerului, este necunoscută. Efectul proteinei OB asupra consumului de hrană și greutatea corporală la șoarecii ob, este dramatic. După trei săptămâni de

5 tratament, șoarecele ob care primește zilnic injecții cu proteină recombinată, are o pierdere de 40% din greutatea corporală și a consumului cu 40% mai mult decât la animalele martor. Mai mult decât atât, greutatea șoarecelui ob tratat, nu este încă echilibrată în timpul în care experimentul este terminat. Rezultatele experimentului pe perechi, atestă că pierderea în greutate este rezultatul efectelor asupra consumului de hrană și a energiei cheltuite. Astfel, o grupă separată de șoarecii ob, pentru care consumul caloric a fost restricționat la cel al șoarecelui care a primit proteina, are o pierdere semnificativă în

10 greutate în raport cu animalele care au primit proteină. Reducerea consumului de hrană la șoarecele ob/ob la un nivel mai scăzut decât le șoarecele de tip sălbatec, în ziua în care primește proteina OB, atestă că, acesta este în special sensibil la efectele acesteia. Intr-adevăr, receptorul OB poate fi superior reglat la aceste animale. Consumul de hrană la șoarecii ob tratați, devine relativ constant, după cinci zile de

15 tratament. Dacă acesta este rezultatul proteinei având nivelurile ridicate, stabile, aceasta ar sugera că proteina are un timp de înjumătățire relativ lung (The Pharmacological Basis of Therapeutics, pp. 19-45. Goodman and Gilman, eds, Pergamon Press New York, (1990)). Această concluzie este confirmată cu datele din experimentele de perabioză (Coleman et al. 1978, supra; Weigle, Int. J. Obesity, 12: 567-578 (1988)). Efectele proteinei recombinată asupra greutatei corporale la tipul sălbatec de șoarece au fost

20 neînsemnate dar semnificative statistic, pe parcursul primelor două săptămâni de studiu. Deoarece diferențele de greutate între șoarecele de tip sălbatec care a primit proteină vs, PBS a fost susținută. pe perioadele din urmă, o semnificație statistică a acestor date este diminuată cu mult după trei săptămâni. Pierderea timpurie în greutate, n-a putut fi luată în considerație prin diferența de consum de hrană. Probabil, măsurarea consumului de hrană, n-a fost suficient pentru a detecta o scădere care rezultă dintr-

25 un gram diferență în greutatea corporală, în timpul tratamentului. Aceste observații diferă de rezultatele experimentelor precedente, în care rozătoarele de tipul sălbatec au fost legate prin uniunea parabolică la șoarecele db, șobolanii fa, șobolanii cu leziuni hipotalamice și șobolanii obezi) printr-o dietă bogată în calorii (Coleman et al. 1978, supra; Harris et al. 1987, supra; Harris et al. "Physiological and metabolic changes in parabiotic partners of obese rats", in Hormones, Thermogenesis and Obesity, Lardy and Straatman, eds, Elsevier Science Publishing Co, New York (1989); Hervey, J. Physiol. 145: 336-352 (1959)). În fiecare caz, animalele de tipul sălbatec devin anorectice și pierd cantități însemnate, în

30 greutate. Când nivelurile de proteină OB sunt crescute la șoarecele db și la șobolanii fa, precum și nivelurile de OB ARN crescute la șoarecele cu leziuni hipotalamice, se pare că, tipul de șoarece sălbatec poate răspunde la OB, când aceasta circulă în plasmă la un nivel suficient de ridicat. Faptele prezentate aici, sunt confirmate cu posibilitatea ca nivelurile de proteină administrate, să fie sub nivelurile endogene, cea ce conduce la echilibrarea greutatei corporale ușor scăzute. Această problema se va rezolva prin

35 determinarea cantitativă a nivelurilor de proteină OB, care circulă în plasma șoarecilor tratați. Deoarece imunoanaliza proteinei la șoarece, nu este disponibilă, prin imunoprecipitări, s-a demonstrat că nivelurile de circulație ale proteinei OB n-au fost substanțial ridicate la șoarecii de tip sălbatec, care au primit proteină. Un efect mai slab al proteinei la șoarecele sălbatec și absența răspunsului la șoarecele db, fac ca acest tratament să aibă efecte nespecifice sau efecte adverse. Toți șoarecii db care pierd cantități mici în greutate în timpul perioadei de tratament, dacă primesc sau nu proteina ob. Animalele db sunt marcant hiperglicemice și pierderea, în greutate în acest caz, pare să fie rezultatul diabetului și nu a procesului de

40 experimentare. Șoarecele db/db C57BL/Ks, dezvoltă adesea diabet și începe să piardă greutate în cantități mici, la vârsta la care animalul este utilizat în acest studiu (Coleman et al. 1978, supra). C57B1/6J ob/ob șoareci de aceeași vârstă, nu dezvoltă o hiperglicemie semnificativă. Aceste diferențe fenotipice sunt rezultatul diferențelor genetice la aceste specii (C57B/6J vs. C57B1/Ks) care poartă mutații (Coleman et al. 1978, supra). Absența detectării celor 105 de aminoacizi reduși ai proteinei, prevăzuți prin secvența cADN în genele OB la șoarecele ob/ob C57B1/6J, sugerează că proteina mutantă este fie degradată, fie netransferată. Cu toate acestea, posibilitatea ca antiserul utilizat să nu detecteze

45 această proteină redusă, nu poate fi exclusă. Creșterea de 10 ori înregistrată pentru nivelurile de proteină ob la șoarecele db, comparativ cu șoarecele de tip sălbatec, demonstrează că proteina ob este supraprodusă când există o rezistență la efectele acesteia. Aceste date corelează cu studiile OB MARN. Așa cum s-a menționat, experimentele precedente au demonstrat ca mutațiile la șoarecele db și la genele

50 de șobolan fa, care sunt aplicate în regiunile cromozomale omoloage, au ca rezultat supraproducția factorului plasmatic care susține greutatea corporală (Truett et al., 1991; supra; Coleman, 1978, supra; Hervey, 1959, supra). În ambele cazuri, s-a demonstrat că animalele mutante sunt rezistente la efectele proteinei OB. Această posibilitate este confirmată prin faptul că proteina OB nu are nici un efect asupra greutatei corporale sau asupra consumului de hrană, când este administrată la șoarecele db. Obezitatea la

55 oameni, poate fi asociată cu nivelurile crescute de proteină OB din plasmă, la indivizii care sunt insensibili la hormoni. Pe de altă parte, exprimarea redusă a OB ar putea, așadar, să conducă la obezitate,

60

## MD 2311 G2 2003.11.30

53

în cazul în care pot fi depistate niveluri "normale" (cu scădere necorespunzătoare) de proteină. Astfel, nivelurile de proteină OB din plasma umană, pot constitui un marker pentru diversele forme de obezitate. Într-o grupă mică cu subiecți slabi cu valoarea BMI < 25, se pot detecta prin analiza ELISA, niveluri scăzute, de nanograme, ale proteinei OB de circulație. Semnificativ, concentrațiile variabile sunt menționate sugerând că, nivelul de exprimare și (sau) sensibilitate la proteină, poate juca un rol oarecare în determinarea greutateii corporale. Partea de acțiune a proteinei OB este necunoscută. Proteina afectează atât consumul de hrană și energie consumată, acest fapt fiind confirmat prin studiile clinice care indică modificările ambelor sisteme ce acționează pentru reglarea greutateii corporale (Leibel et al. M. Engl. J. Med. 332: 621-628 (1995); Keeseey et al. "Metabolic defense of the body weight set-point", in Association for Research in Nervous and Mental Disease, pp. 87-96, Stunkard and Stellar, eds. Raven Press, New York (1984)). Hipotalamusul este asemănător implicat la partea inferioară a circuitului polipeptidic OB, în metoda de control a greutateii corporale, așadar, are efecte directe asupra unei variantei posibile de organe.

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

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

Materiale și metode.

Hibridizarea *in situ*.

Țesăturile cu grăsime albă din regiuni abdominale identice, de la șoarecii de tip sălbatec (wt) și de la șoarecii db au fost prelucrate simultan, conform metodei modificate, descrisă de Richardson et al. Growth, Development & Aging, 56: 149-157 (1992). Deci, țesăturile sunt fixate în soluție Bouin, timp de 2 ore, la temperatura de 4°C. Acestea sunt apoi deshidratate printr-un tratament serial de creștere a concentrațiilor de etanol din 10% până la 100% fiecare, timp de 5 minute, la temperatura de 4°C. Urmează incubarea acestor țesuturi cu xilen, timp de 1 ora și cu parafină, timp de 2 ore, la temperatura de 65°C. Greutatea fiind inserată, țesăturile grase db/db sunt secționare și montate apoi, în aceleași condiții. Secțiunile sunt uscate la temperatura de 65°C, timp de 1 ora și tratate cu xilen și diluții seriale de etanol, de la 10% până la 50% fiecare, timp de 3 minute, la temperatura camerei. O probă contrasens ARN a genei OB este sintetizată prin transcrierea *in vitro* a genei OB linearizate, din secvența codificată la partea superioară a promotorului polimerazei Sp6 ARN. Hibridizarea *in situ* s-a efectuat exact conform descrierii lui Schaeeren -Wiemers et al. Histochemistry, 100: 431-440 (1993).

Prepararea ARN și cultura celulară.

ARN total și absorbția Northern, s-au preparat așa cum s-a descris. Celulele vasculare stromale și adipocitele s-au preparat conform descrierii lui Rodbell și ARN din ambele fracțiuni, s-a preparat conform lui Dani et al. Mol. Cell. Endocrinol. 63: 199-298 (1989); Rodbell, J. Biol. Chem. 239: 375-380 (19). După subclonare, celulele 3T3-F442 s-au dezvoltat în mediul Dulbecco-Eagle modificat, conținând 10% ser de bovine fetal (definit ca mediu standard) (Dani et al. "Molecular biology techniques in the study of adipocyte differentiation", in Obesity in Europe vol. 88, pp. 371-376, Bjorntorp and Rossner, Eds, John Libbey Company Ltd. London, England (1989)). La confluență, celulele au fost tratate în mediu standard suplimentat cu 2 nM triiodotironină (T3) și 17 nM insulină. După 12 zile, ARN a fost preparat ca mai sus.

Tratamentul cu tioglucoza de aur (GTG).

Șoarecii femele CBA/J în vârstă de 2 luni, sunt tratate cu o singură injecție intraperitoneală de aurotioglucoză (Catalogul Sigma No. A 0632) la o doză de 0,2 miligrame/gram, în soluție salină normală. Animalele de control sunt injectate cu o soluție salină normală. Șoarecii se cântăresc, după o lună de la tratament. Țesutul adipos ARN este izolat de la animalele tratate, a căror greutate a crescut mai mult decât cu douăzeci de grame, după tratamentul cu GTG.

Rezultate.

Genă OB a fost demonstrată recent, ca fiind exprimată în țesutul adipos (Zhang et al. Nature, 372: 425-432 (1994)). Deoarece țesutul adipos este compus din multe tipuri de celule incluzând adipocitele,

## MD 2311 G2 2003.11.30

54

preadipocitele, fibroblaștii și celulele vasculare, *in situ*, hibridizarea a fost realizată pe secțiuni din țesutul gras epididimal din laba animalelor normale, aplicând riboprobe de OB sens și contrasens (Richardson et al. 1992, supra; Wasserman, "The concept of the fat organ", in Rodahl, Issekutz, fat as a tissue", pp. 22-92, McGraw Hill, New York (1964)). Când se aplică o probă contrasens, semnalele pozitive sunt detectabile în toate adipocitele din această secțiune (Figura 30-marcat-Wt). Semnalele n-au fost menționate, când proba contrasens s-a hibridizat la secțiunile de creier (datele nu sunt prezentate). Hibridizarea probei contrasens la secțiuni a țesutului adipos de la șoarecele C57B1/ Ks db/ db, a fost mult crescută, confirmând exprimarea OB ARN de adipocitele specifice și demonstrând creșterea înaltă a nivelului de OB ARN per adipocit, la aceste animale (Figura 30 - marcat db/db). Șoarecele mutant la poziție DB este masiv obez, ca parte a sindromului care este identic fenotipic, relativ la cel atestat în C57B1/ 6J ob/ob la șoarece (Bahary et al. 1990, supra).

OB ARN nu s-a sintetizat din celulele stromale ale țesutului adipos, separat din adipocite. Așa cum s-a așteptat, celulele fracțiunea adipocitei exprimată OB ARN, aplică analiza de absorbție Northern (Figura 31). Același rezultat a fost obținut aplicând RT-PCR (datele nu sunt prezentate). Pe aceste date se bazează concluzia că, numai adipocitele exprimă gena OB. Datele despre adipocitele din cultură, confirmă această concluzie. În aceste studii, celulele 3T3-F442A sunt cultivate, aplicând condițiile care duc la acumularea de lipide, ce parte a programului celular care conduce la diferențiere în adipocite. OB ARN n-a fost exprimat în celule de dezvoltare, exponențial, nici confluent celulelor preadipicitare 3T3-F442A, care exprimă markerii timpurii, în timp ce diferențierea acestor celule în adipocite, duce la exprimarea unor niveluri detectabile de OB ARN (Figura 31) (Dani et al. J. Biol. Chem. 264: 10119 -10125 (1989)). Nivelul de OB ARN este extrem de sensibil la condițiile de cultură, încât n-a fost observat nici un masaj, post-confluent celulelor care n-au fost expuse insulinei. Studiile de hibridizare atestă că OB ARN este exprimată *in vivo* în diferite depozite de țesuturi grase, incluzând țesuturile epididimale, parametricale, abdominale, perirenale și inghinala labei de animal. (Figura 32A). Nivelul precis de exprimare în fiecare depozit a fost întrucâtva variabil, cu niveluri de exprimare a OB ARN mai scăzute pentru țesutul gras parametric și inghinal. OB ARN este, așadar, exprimată în țesutul adipos brun, nivelul de exprimare fiind de circa 50 de ori mai scăzut pentru țesutul gras, brun, raportat la alte depozite tisulare adipoase. Aceste diferențe cantitative sunt corelate liber cu diferențele menționate mai sus, în dimensiunea celulară, între depozitele de celule, grase diferite (Johnson et al. J. Lipid Res. 13: 2-11 (1972)). Cantitatea de OB ARN în țesutul gras brun este neafectată prin expunere la rece (Figura 32 B). În acest experiment, nivelul de proteină necuplată ARN (UCP) este crescut la țesutul gras brun, după expunere la rece, în timp ce nivelul de ob ARN nu este schimbat (Jacobson et al. J. Biol. Ghem. 260: 16250-16254 (1985)). În fond, aceste date confirmă că toate adipocitele sunt capabile de a produce OB ARN și demonstrează un nivel variabil de exprimare la diferite depozite de țesuturi grase. Aceste date sprijină posibilitatea ca nivelul de proteine codificate să se coreleze cu masa totală de țesut adipos. Nivelurile de OB ARN la șoarecele db/db și șoarecele cu leziuni ale hipotalamusului, au fost măsurate. Leziunile hipotalamusului ventromedial (VMH) au ca rezultat obezitatea, ca parte a sindromului care seamănă cu cel atestat la șoarecii ob/ob și db/db (Bray et al. Metabolism, 24: 99-117 (1975)). Experimentele parabiozei demonstrează că, astfel de leziuni au ca rezultat o supraexprimare a factorului blod-borne care sprijină consumul de hrană și greutatea corporală (Hervey, 1959, supra). Rezultate similare sunt menționate atunci când șoarecele mutant în poziția db este parabiozat la șoarecele normal, sugerând că receptorul OB poate fi codificat prin poziție db (Coleman et al. 1978, supra). Astfel, obezitatea care rezultă din leziunile VMH și mutație db, pot fi, așadar, rezultatul rezistenței la efectele proteinei OB. În acest caz, o creștere secundară a nivelurilor de OB ARN în țesutul adipos poate fi prevăzută. Leziunile hipotalamice sunt induse la șoarecele la femelă CBA, aplicând tioglucoză de aur, chimică (GTG) (Debons et al. Fed. Proc. 36: 143-147 (1977)). Acest tratament are ca rezultat, leziunile hipotalamice specifice, în fond în hipotalamusul ventromedial (VMH), cu o dezvoltare ulterioară a obezității în câteva săptămâni. De obicei, o singură injecție intraperitoneală a GTG de 0,2 miligrame/gram greutate corporală cauzează dezvoltarea obezității în patru săptămâni. Șoarecii femele de o lună CBA/J (20-25 grame) sunt tratați cu GTG și apoi greutatea acumulată a animalelor tratate în raport cu martorii, este prezentată în tabelul 2. ARN în țesutul adipos, este preparat de la șoarecele db/db și de la animalele tratate cu GTG, care au adăugat 20 grame. Prin analiza de absorbție Northern se atestă o creștere de douăzeci de ori a nivelului de OB ARN la șoarecii de două luni, de tip db/db tratați cu GTG, comparativ cu animalele normale. (Figura 33).

TABELUL 2. Câștigul în greutate, la șoarecii tratați cu tioglucoză de aur.

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

## MD 2311 G2 2003.11.30

55

Șoarecii femele de două luni, sunt tratați cu tioglucoză de aur (GTG). Sunt utilizați șoarecii CBA/J. Tioglucoza de aur (A0632 Sigma), este administrată intraperitoneal, într-o soluție salină, normală, la un dozaj de 2,0 miligrame/gram. Greutatea corporală pentru animalele martor și pentru cele injectate, a fost înregistrată sus de injectare și după o lună de la injectare. Animalele sunt menținute câte cinci într-o cușcă și sunt hrănite, ad libitum. Cantitatea de greutate acumulată la o lună după injectare, este prezentată în Tabelul 2. Animalele cu greutate corporală acumulată mai mare decât 20 grame, la o lună după injectare, sunt selectate pentru studiul următor.

### Discuții.

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

Prezentul exemplu atestă că produsul genetic OB este exprimat exclusiv prin adipocitele din depozitele tisulare adipoase. Acest rezultat este confirmat prin faptul ca, produșii de proteină, al genei OB să coreleze cu depozitele de lipide din organism. Mai mult decât atât OB ARN este multiplicată de douăzeci de ori la șoarecele db și la cel cu leziuni hipotalamice. La aceste animale, creșterea actuală a nivelului OB ARN pe celulă, poate fi chiar mai mare decât de douăzeci de ori, deoarece dimensiunea celulei adipocitului este sporită de circa cinci ori la aceste animale (vezi Figura 30) (Debons et al. 1977, supra). Aceste date așează gena db și hipotalamusul la partea inferioară a curentului OB, în cea ce privește modul de control al greutății corporale, ele sunt în consens cu ipoteza că receptorul OB este codificat în poziția db (Coleman et al. Diabetologia 14: 141-143 (1978)). Clonarea moleculară a receptorului și (sau) genei db, va rezolva această problemă. Creșterea nivelului de OB ARN la db/db înregistrată și la șoarecii tratați cu GTG, demonstrează că celulele nonautonome funcționează ca și genă OB produsă în celulele grase (Ashwell et al. Proc. R. Soc. Lond. 195: 343-353 (1977); Ashwell et al. Diabetologia, 15: 465-470). Astfel, dacă proteina codificată acționează direct asupra celulelor grase pentru a inhiba dezvoltarea sau diferențierea, supraexprimarea genei OB la șoarecele de tip sălbatec, tratat cu GTG, duce la un fenotip slab. Fenomenul se explică prin faptul ca proteina OB funcționează ca o endocrină, ca o moleculă de semnalizare care este secretată de adipocite și acționează direct sau indirect asupra hipotalamusului. Efectele directe asupra hipotalamusului vor necesita ca mecanismele să existe pentru a permite trecerea produsului genetic OB, prin bariera sanghină a creierului. Mecanismele cuprinzând organul circumventricular și (sau) transportorii specifici, ar permite accesul la creier a moleculei de dimensiunea care este codificată de gena OB (Johnson et al., FASEB J, 7: 678- 686 (1983); Baura et al. J. Clin. Invest., 92:1824-1830 (1993); Pardridge, Endocrine Reviews, 7: 314-330 (1986)). Cu toate acestea, ipoteza trebuie să fie acceptată cu prudență, până la identificarea mijloacelor prin care proteinele ar putea traversa bariera sanghină din creier. Mai mult decât atât, este necesar să se facă evaluarea efectelor posibile asupra altor organe ținta. Celulele grase de semnal, care sunt responsabile de o variantă cantitativă la nivelul de exprimare al genei OB, nu sunt încă cunoscute, dar se corelează cu diferențele în dimensiunile celulelor adipocite. Adipocitele de la șoarecele db/db, sunt de cinci ori mai mari decât cele de la șoarecele normal, având o dimensiune celulară de circa 1,0 μg lipide/celulă (Johnson et al., 1972, supra). O evidență precedentă, a indicat că, conținutul lipidelor celulare și (sau) dimensiunea acestora, reprezintă un parametru important în determinarea greutății corporale (Faust et al. Am. J. Physiol., 235: 279-286 (1978); Faust et al. Science, 197: 393-396 (1977)). Aceasta ar însemna că, fiecare celulă grasă este exprimată la un nivel scăzut de OB ARN, care crește în continuare în proporție în dependență de dimensiunea celulei. De asemenea este posibil ca dimensiunea celulară să nu fie parametrul acceptat, dar mai mult, acesta se corelează cu semnalul intracelular, care crește exprimarea genei OB în adipocitele din șoarecele db/db și cel lezionat VMH. În orice caz, componentele modului transducției de semnal, care reglează sinteza de OB ARN, sunt la fel de importante în determinarea greutății corporale. Influențele genetice și cele de mediu, care reduc nivelul de exprimare al OB, pot acționa pentru creșterea greutății corporale, pe măsura influențării scăderii sensibilității la proteina codificată. Moleculele specifice care reglează nivelul de exprimare al genei OB, sunt încă necunoscute și se preconizează determinarea nivelurilor genei de control care conduc la o variantă cantitativă în nivelul OB ARN și la examinarea elementelor de reglare a genei OB. Identificarea moleculelor care reglează exprimarea genei OB în adipocite și a celor care mediază efectele proteinei codificate la porțiunile de acțiune ale acesteia, va duce la o mai bună înțelegere a mecanismelor fiziologice, care reglează greutatea corporală.

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

OB ARN se exprimă la niveluri ridicate în țesutul adipos uman și la niveluri substanțial scăzute în placenta și inimă. Aplicația genei OB umane la mai mulți cromozomi artificiali din drojdie, adiacenți YAC, începe cu cromozomul 7 q 31,3. Pe lângă aceasta, pentru confirmarea poziției relative a genei pe baza cartării genetice comparative la șoarece și la om, acest studiu a identificat 8 markeri microsateliți

## MD 2311 G2 2003.11.30

56

stabiliți în imediata apropiere fizică a genei umane OB. Deoarece mutațiile la OB de șoarece pot avea ca rezultat sindromul care pare apropiat de obezitatea morbidă la om, acești markeri genetici reprezintă instrumentele importante pentru studierea rolului posibil al genei OB în formele ereditare ale obezității umane.

5     Materiale și Metode.

      Analiza absorbției Northern.

      ARN total este preparat din țesutul adipos, aplicând metode Chirgwin et al. Biochem.18: 5294-5299 (1979). Metodele de analiză prin absorbție Northern, radiomarcare și hibridizare, se efectuează așa cum s-a descris (Zhang et al., 1994, supra). Absorbția Northern a polia<sup>+</sup>ARN (MTN uman, MTN II uman și  
10    MTN II fetal uman) s-a obținut din CLONETECH (Palo Alto, CA), ca primeri PCR utilizați pentru generarea probei de actină umană radiomarcată.

      Dezvoltarea STS.

      Analiza PCR specifici (STS) la porțiunea anexată a secvenței, se dezvoltă și se optimizează în esență, așa cum s-a descris ((Green et al. PCR Methods Applic., 1991; Green et al. Genomics, 11: 548-564  
15    (1991); Green, "Physical mapping of human chromosomes: generation of chromosome-specific sequence-tagged site", in Methods in Molecular Genetics Vol. 1, Gene and Chromosome Analysis (Part A) pp. 192-210, Adolph ed., Academic Press. Inc. San Diego (1993); Green et al. Hum. Mol. Genet, 3: 489-501 (1994)). Fiecare STS este denumit aplicând prefixul 'sWSS' urmat de un număr unic. Detaliile despre STSs 19 menționate aici, sunt prezentate în Tabelul 3, cu o informație adițională (bunăoară condițiile de reacție PCR, secvența completa ADN), care este disponibilă de la GenBank and /sau the Genome Data Base (GDB). Pentru microsatelitul specific STSs, primerii de oligonucleotide utilizați în analiza PCR (Tabelul 3), au corespuns fie celor utilizați pentru analiza de genotip (Tabelul 4 ), fie celor desemnați (adesea cu programul de computer OSP) (Hiller et al., PCR Methods Applic 1: 124-126 (1991)), aplicând secvența ADN disponibilă de la GenBank. Tabelul 5 ilustrează STSs în YAC adiacent, conținând gena  
20    OB umană.

      Conform Figurii 35, se prezintă al 19-lea STS specific cromozomului 7, cartat la YAG adiacent, conținând gena OB umană. În fiecare caz, denumirea de 'sWSS' desemnată, relevantă alias, denumirea poziției însemnata GDB, sursa STS, secvențele primerului PCR, dimensiunea STS și numărul de  
30    identificare al GDB, sunt indicate. Sursele STSs sunt următoarele: 'YAC End' (terminație inserată izolată de YAC) (Green, 1993, supra), 'Lambda Clone' (clone lambda specifică cromozomului 7 randomizat (Green et al. 1991, supra; Green, 1993, supra), 'Genetic Marker' (markerul microsatelit, vezi Tabelul 2) (Green et al. 1994, supra), 'Inserție YAC (segmentul randomizat din inserția YAC) și 'gene' (STS specific gene). De menționat ca, pentru câțiva STSs specifici markerului genetic, primerii PCR utilizați pentru identificarea YACs (se prezintă în acest tabel) sunt diferiți de cei utilizați pentru analiza genotipului de performanță (tabelul 4), deoarece detectarea YACs conținând markerul genetic, nu necesită  
35    amplificarea însăși a regiunii polimorfe. Toate analizele PCR indicate, au utilizat o temperatură de susținere de 55°C, exceptând cele pentru sWSS494, sWSS883, sWSS1529 și sWSS2619 (care au utilizat 50°C), sWSS999 și sWSS1174 (aplicând 60°C) și sWSS808 (65°C). Detaliile adiționale privind analizele PCR specifice STS, sunt disponibile GDB.

40

## MD 2311 G2 2003.11.30

57

Tabelul 3

Denumire STS	Alias	Pozitie	Sursa	Primerii PCR	Dimensiune (bp)	Secv. ID No.	GDB ID No.
sWSS1734		D7S2185	Terminatie YAC	CAA GAC AAA TGAGAT AAGG	72	39 40	G00-455-235
sWSS494		D7S2016	Clonă lambda	CTAAC ACC TTT CCATTC TTATATTCACCTTTCCTCTC	112	41 42	G00-334-404
sWSS883	UI528	D7S1498	Marcher genetic	TGC AGT AAGCTGTGATTG AG GTGCAGCTTTAATTGTGAGC	490	43 44	G00-455-262
sWSS2359	AFMa065zg9	D7S1873	Marcher genetic	AGTGTGTGTTTCTCCTG AAAGGGGATGTGATAAGTG	142	45 46	G00-455-247
sWSS2336	AFMa125wh1	D7S1874	Marcher genetic	GGTGTACGTTTAGTTAC GGAATAATGAGAGAAGATTG	112	47 48	G00-455-244
sWSS1218	AFM309yf1	D7S680	Marcher genetic	GCTCAACTGACAGAAAAC GACTATGTAAAAGAAATGCC	154	49 50	G00-307-733
sWSS1402		D7S1916	Terminatie YAC	AAAGGCTTCTAATCTAC CCTTCCAACCTCTTTGAC	137	51 52	G00-344-044
sWSS999		D7S1674	Terminatie inserție YAC	TAAACCCCTTTCGTTC TTGCATAATAGTCACACC	105	53 54	G00-334-839
sWSS1751		D7S2186	Terminatia YAC	CCAAAATCAGAATTGTGAGAAG AAACCGAAGTTCAGATACAG	186	55 56	G00-455-238
sWSS1174	AFM218xf10	D7S514	Marcher genetic	AATATCTGACATTGGCAC TTAGACCTGAGAAAAGAG	144	57 58	G00-307-700
sWSS2061		D7S2184	Terminatie	GTTCACAATACAAAATCC CTTCCATTAGTGTCTATAG	200	59 60	G00-455-241
sWSS2588		D7S2187	Terminatie YAC	ATCACTACACCTAATC CCATCTACATTCCACC	117	61 62	G00-455-253
sWSS808	Pax4	PAX4	Gena	GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA TTGCCAGGCAAGAGGGCTGGAC	153	63 64	G00-455-259
sWSS1392	AFM206xcl	D7S635	Marcher genetic	CTCAGGTATGTCITTTATC TGCTCTGCATTCCTTTTC	75	65 66	G00-307-815
sWSS1148	AFM199xh12	D7S504	Marcher genetic	GACACATACAAACACAAG ATTGAGTTGAGGTAGTAG	60	67 68	G00-307-652
sWSS1529		D7S1943	Terminatie YAC	CAGGGATTTCTAATTGIC AAAAGATGGAGGCTTTTG	116	69 70	G00-334-119
sWSS2619	OB	OB	Gena	CGTTAAGGGAAGGAACCTCTGG TGGCTTAGAGGAGTCAGGGA	106	71 72	G00-455-256
sWSS404		D71956	Clonă lambda	ACCAGGGTCAATACAAAAG TAAITGTGCTTCTTTC	122	73 74	G00-334-251
sWSS2367	AFMa345wc9	D7S1875	Marcher genetic	CAATCTGGCTTCATTGT AAGGTGGTAGGATGCTA	81	75 76	G455-250

Tabelul 4

### MARCHERII MICROSATELITULUI IN CONTIGUL YAC, CONTINÂND GENA OB UMANA

Denumire marcher	Tipul	Pozitie	Primeri	Secvența ID No.	GDB ID No.
UT 528	Tetra.	D7S1498	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG GTGCAGCTTTAATTGTGAGC	77 78	G00-312-446
AFMa65zg9	(CA) <sub>n</sub>	D7S1873	AGCTTCAAGACTTTNAGCCT GGTCAGCAGCACTGTGATT	79	G00-437-253
AFMa125wh1	(CA) <sub>n</sub>	D7S1874	TCACCTTGAGATTCCATCC AACACCGTGGTCTTATCAAA	81 82	G00-437-263
AFM309yf10	(CA) <sub>n</sub>	D7S680	CATCCAAGTTGGCAGTTTTT AGATGCTGAATCCCAGACA	83 84	G00-20-283
AF206xcl	(CA) <sub>n</sub>	D7S635	CCAGGCCATGTGGAAC AGTCTTGGCTTGGCTCAGT	87	G00-199-240
AFM199xh12	(CA) <sub>n</sub>	D7S504	TCTGATTGCTGGCTGC GCGCGTGTGTATGGTGAG	89 90	G00-188-280
Fma345wc9	(CA) <sub>n</sub>	D7S1875	AGCTCTTGGCAAATCACAT GCCTAAGGGAATGAGACACA	91 92	G00-437-259

## MD 2311 G2 2003.11.30

58

Un număr de opt marcheri de microsateleți cartajați la YAC conțin adiacent gena umană OB (figura 35), așa cum sunt prezentați în tabel. În fiecare caz, denumirea de marker (indicată alias în tabelul 3) tipul de satelit (se repetă tetranucleotida - 'Tetra' sau (CA)<sub>n</sub>, denumirea, poziția însemnată GDB, secvențele primer utilizate pentru analiza genotipului pe bază de PCR și numărul de identificare GDB, sunt indicate. Detaliile adiționale privind analizele PCR și polimorfismele, sunt disponibile la GDB. STS specific OB umane (sWSS 2619) este desemnat aplicând secvența ADN obținută din regiunea 3' netransferată, a cADN. STS specific Pax4 uman (sWSS808) este dezvoltat aplicând următoarea strategie. Primerii de oligonucleotide, specifici pentru gena Pax4 la șoarece (GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA) (SEQ ID No. 63) și (GGGAGCCTTGCTCTGGTACAAAG) (SEQ ID No. 93) (Walther et al., 1991, Genomics 11: 424-434) (1991)), se aplică pentru amplificarea unui fragment 204 - bp din ADN genic uman (care este un produs de aceeași dimensiune ca și cel generat de ADN genic la șoarece). Această analiză PCR n-a fost acceptabilă pentru identificarea YACs corespunzătoare, deoarece un produs cu dimensiuni similare (20-bp) a fost de asemenea amplificat din ADN în drojdie. Cu toate acestea, analiza secvenței ADN a produsului PCR generat din ADN uman, elevează substituiri la pozițiile 20, între cele 156 baze analizate (datele nu sunt prezentate). Aplicând această secvență specific umană, un nou primer (TTGCCAGGCAAAGAGGGCTGGAC) (SEQ ID No. 64) a fost desemnat și utilizat cu primii primeri specifici Pax4 de șoarece, de mai sus (vezi tabelul 3). Rezultatele analizei PCR specifice Pax4 umane, n-au amplificat semnificativ produșii din drojdie, astfel ADN a fost utilizat pentru identificarea corespunzătoare YACs.

Identificarea YACs prin screeningul pe bază de PCR.

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

Rezultate și discuții

Examinarea exprimării tisulare a genei OB prin analiza de adsorbție Northern, relevă că OB ARN este exprimat la un nivel ridicat în țesutul adipos uman și la un nivel mult mai scăzut în placentă și inimă (fig. 34). Dimensiunea ARN (circa 4,5 kb), a fost echivalentă la oameni și șoareci ca și în fiecare dintre țesuturile exprimate. În aceste studii, semnale mai înalte de cinci ori, au fost atestate în 10 μg din țesutul adipos total ARN, ca și în 2 μg de poli A<sup>+</sup>, ARN placentar. Un semnal de cinci ori mai scăzut, în comparație cu placentă, a fost atestat în poli A<sup>+</sup> ARN din inimă. Se estimează că, nivelul de OB ARN este de circa 250 ori mai mic în placentă, decât în țesutul adipos. În acest experiment, OB ARN n-a fost detectat în nici una din celelalte țesuturi analizate, incluzând creierul, plămânul, ficatul, mușchii scheletici, rinichii și pancreasul. Experimentele adiționale, n-au relevat OB ARN în splină, timus, prostată, testicul, ovar, intestin subțire, colon, leucocitele din circulația periferică sau creierul fetal, ficat sau rinichi (datele nu sunt prezentate). De asemenea este posibil ca OBV să fie exprimată la un nivel nedetectabil (prin analiza de adsorbție Northern), în aceste țesuturi, sau în alte țesuturi care n-au fost studiate. Modelele de exprimare umane observate, diferă întrucâtva de cele de la șoareci, în care OB ARN este detectată aproape exclusiv în țesutul adipos.

Cartarea comparativă a regiunii genetice OB, în genomul de șoarece și genomul uman.

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

Cartarea (sWSS2619) de amplificare a unui segment mic din regiunea 3' netransferată a genei umane OB, a fost utilizată pentru screeningul colecției de clone YAC, care este mult îmbogățită pentru ADN cromozomul 7 uman (Green et al. 1995a, Genomics 25: 170-183) și 9YACs se identifică ca (yWSS691, yWSS1332, yWSS1998, yWSS2087, yWSS3319, yWSS3512, yWSS4875, yWSS4970, yWSS5004). Pentru a verifica dacă acești YACs conțin o genă OB umană autentică, s-au efectuat două experimente adiționale. Mai întâi, fiecare YAC a fost testat printr-o a doua analiză PCR specifică OM umane și toate au fost depistate pozitive. (Datele n-au fost prezentate). În al doilea rând, ADN din drojdie, din fiecare clonă, a fost digerat cu EcoRI și analizat prin

## MD 2311 G2 2003.11.30

59

hibridizare in gel-transfer, aplicând o probă derivată de la cADN OB umană. În toate aceste exemple, a fost atestată o singură bandă de hibridizare, această bandă a fost aceeași ca dimensiune, în YACs și clona PI este aplicată deja că ar conține gena OB umană (datele nu sunt prezentate). Aplicand programul computerului SEGMAP (Green and Green 1991, supra) și alte date conținute de STS pe baza YAC, care au fost generate pentru cromozomul 7 (Green et al. 1991, supra; Green et al. 1994, supra; Green et al. 1995, supra). A fost demonstrat că gena OB umană rezidă în YAC, prezentat adiacent în fig. 35. În special, acest contig constă din 43 YACs suprapuși și 19 STSs cu ordonare unică. Amănuntele despre fiecare din cele 19 STSs sunt prezentate în tabelul 3. Pe lângă aceasta relativ cu STS specific OB acest contig conține, așadar, un STS (sWSS808) specific pentru gena Pax4 umană (Tamura et al. 1994, supra; Stapleton et al. 1993, Nature Genet. 3: 292-298), 7STSS derivat din cromozomul 7 specific YACs, 2STSS derivate de la cromozomul 7, clonele lambda specifice și, în deosebi, cei 8 microsateleți specifici STSS. Detalii adiționale despre acești 8 markeri genetici, incluzând secvențele primerilor utilizați pentru analiza genotipului, sunt prezentate în tabelul 2. De menționat, că există YAC redundant pe bază de conectivitatea contigului în fond (bunăoară, există doi sau mai mulți YACs conectați la fiecare pereche adiacentă de STSs), care formează un suport puternic pentru ordonarea relativă a STSs, arătată în fig. 35. Așa cum se prezintă în fig. 35, orientarea prevăzută pentru OB umană conținând YAC contig, este aceea că, sWSS1734 este centrometrică, mult STS (de exemplu mai aproape de CFTR), în care sWSS2367 este telomerică, mai mult STS (bunăoară mai aproape de CPA). Această orientare este bazată predominant pe datele de cartare comparative, care plasează Pax4 proximal și OB distal în blocul sintetic prezent nADN la șoarece și ADN uman (Zhang et al. 1994, supra). Genă OB se cartează aproape de terminația telomerică a contigului, pe baza plasamentului OB specifice STS (sWSS2619). În timp ce contigul prezentat în fig. 35 este dedus prin SEGMAP, fără a se considera dimensiunile pentru YAC (în care STS-urile sunt etalate echidistant una de alta), o analiză similară a datelor SEGMAP care se numără pentru dimensiunile YAC, indică faptul că, dimensiunea totală a regiunii acoperite de contig este chiar peste 2 Mb (datele nu sunt prezentate). Astfel, în timp ce toți cei 8 microsateleți specifici STS (tabelul 4) sunt conținuți în intervalul genic care cuprinde 2 Mb în stare brută, cel de al treilea, cel mai apropiat de terminația telomerică a contigului (sWSS1392, sWSS1148 și sWSS2367) este, în special, mai apropiat chiar de gena OB (poate în intervalul cel mai mic, de circa 500 kb), de fapt, toate cele trei STSs din urmă, sunt prezente, în cel puțin o singură OB umană, conținând YACs. De menționat că, intervalul între Pax4 uman (sWSS808) și ob (sWSS2619) este estimat a fi de circa 40 kb, din care această regiune este prevăzută să cuprindă circa 1 Mb la șoarece (Zgang et al. 1994, supra). În final, 3 din YACs în contig (yWSS691, yWSS999 și yWSS2935) au fost analizați prin FISH demonstrându-se că hibridizează exclusiv la 7q31,3. Unul din acești YACs (yWSS691) conține STS specific OB, în timp ce alte 2 clone conțin specific Pax4. Ultimele rezultate sunt în fond confirmate de distribuția citogenetică precedentă, de la Pax4 uman, până la 7q32 uman (Tamura et al. 1994, supra). Pe baza acestor date, gena OB umană, poate fi distribuită în banda citogenică 7q31,3.

Exemplul 11: Polipeptida OB umană este biologic activă la șoarece

Grupele formate din câte 10 șoareci ob/ob, sunt tratate prin injecție interaperitoneală (i.p.), cu câte 10 μg/g/zi de polipeptidă OB murină sau umană (bacteriană) sau salină. După pentru zile, grupa care primește soluția salină, adaugă în greutate 0,3 grame. Grupa care adaugă în greutate OB murinică, pierde 3,2 g (p<.01 comparativ cu controlul salin). Aceste grupe au fost, așadar, testate pentru consumul de hrană. Datele pentru consumul de hrană sunt prezentate în tabelul 5; datele pentru masa corporală sunt prezentate în tabelul 6.

Tabelul 5

Consumul de hrană/zi (g) la șoarecele ob/ob tratat prin injecții intraperitoneale  
(valoarea ±S.Dev.)

Tratament	Ziua 0	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 3	Ziua 4	Ziua 5	Ziua 6	Ziua 7
Salină	13,4±2,6	12,8	12,8	13,1	14,0	12,3	12,4	8,3
OB murinică	14,9	3,7	4,4	5,1	8,9	8,1	8,7	3,5
OB umană	14,3	10,3	8,7	7,0	8,9	5,3	3,8	13,0

Tabelul 6

Greutatea corporală și modificarea greutății la șoarecele ob/ob tratat (valoarea ±S. Dev.)

Tratament	Greut. corp. (Ziua 0)	Greut. corp. (Ziua 4)	Modif. % (Ziua 0-4)	Greut. corp. (Ziua 6)	Modif. % (Ziua 0-6)
Salină	39,9±1,8	40,7±1,6	0,8±0,5	41,1±2,2	1,2±1,1
OB murinică	39,5±2,1	36,2±2,0	-3,3±1,2	36,3±2,2	-3,1±1,2
OB umană	39,5±2,0	37,6±1,7	-2,0±1,0	36,1±1,3	-3,5±1,3

50





## MD 2311 G2 2003.11.30

62

Rația II: 10 ml/l soluție cu urme de metal  
200 g/l bacto-triptonă  
100 g/l extract de drojdie  
110 g/l glucoză

5 Soluția de vitamine (seria, rația I): 0,5 g de biotină, 0,4 g de acid folic 4,2 g de riboflavină, se dizolvă în 450 ml de apă și 3 ml de hidroxid de sodiu NaOH 10 N și amestecul se aduce la 500 ml, cu apă · 14 g de piridoxină clorhidrică și 61 g de niacină, se dizolvă în 150 ml de apă și 50 ml de hidroxide sodiu NaOH 10 N și se aduc la 250 ml, cu apă · 54 g de acid pantotenic se dizolvă în 200 ml de apă ce se aduc la 250 ml. Cele 3 soluții se combină și se aduc la un volum total de 10 litri.

10 Soluția cu urme de metal (seria, rația I):  
Clorură ferică ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ): 27 g/l  
Clorura de zinc ( $\text{ZnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ): 2 g/l  
Clorură de cobalt ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ): 2 g/l  
Molibdat de sodiu ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ): 2 g/l  
Clorură de calciu ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ): 1 g/l  
Sulfatul de cupru ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ): 1,9 g/l  
15 Acid boric ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ): 0,5 g/l  
Clorură de mangan ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ): 1,6 g/l  
Citrat de sodiu dihidrat: 73,5 g/l.

Procedeul de purificare pentru polipeptida OB murinică.

20 Purificarea este însoțită de următoarele faze (numai dacă nu se notează altfel, fazele următoare sunt efectuate la 4°C):

1. Pasta celulară. Pasta celulară de *Escherichia coli*, se suspendă de 5 ori în volume de 7 mM EDTA, la pH 7,0. Celulele în EDTA sunt apoi distruse prin cele două faze, cu microfluidizatorul. Celulele obținute sunt centrifugate la 4,2 rotații pe minut, timp de o oră, într-o centrifugă Beckman JB - 6, cu un rotor J5 - 4,2.

25 2. Spălarea corpului de incluziune # 1. Supernatantul de mai sus, este separat și peletele se resuspendă de 5 ori cu volume de 7 mM RDTA, la pH 7,0 și se omogenizează. Amestecul este centrifugat ca în faza.

3. Spălarea corpului de incluziune # 2. Supernatantul de mai sus, se îndepărtează și peletele se aduc pentru resuspendare în 10 volume de 20 mM Tris, la pH 8,5, 10 mM DTT și 1% dezoxicolat și apoi se omogenizează. Acest amestec se centrifughează ca în faza 1.

30 4. Spălarea corpului de incluziune # 3. Supernatantul de mai sus, se îndepărtează și peletele sunt resuspendate în 10 volume de apă distilată și se omogenizează. Acest amestec se centrifughează ca în faza 1.

5. Multiplicare. Peletele sunt multiplicare cu 15 volume de 10 mM HEPES, la pH 8,5, cu 1% sarcozină de sodiu (N-lauril sarcozină), la temperatura camerei. După 60 de min, soluția se completează cu 60 mM sulfat de cupru și apoi se ține sub agitare până a doua zi.

35 6. Îndepărtarea sarcozinei. Amestecul obținut este diluat apoi cu 5 volume de 10 mM Tris amestec tampon, la pH 7,5, apoi centrifugat ca în faza 1. Supernatantul se colectează și se amestecă sub agitare, timp de o oră, cu rezina Dowex 1-X4, la 20-50 meshi, sub formă de clorură (la 0,066% volum total de amestec multiplicat, diluat). Acest amestec se toarnă apoi pe coloană și se colectează eluantul. Îndepărtarea sarcozinei este efectuată prin HPLC.

40 7. Precipitarea acidă. Eluantul din faza precedentă se colectează și pH-ul este ajustat la valoarea 5,5, apoi se incubează timp de 30 de min la temperatura camerei. Acest amestec se centrifughează ca în faza 8.

8. Cromatografia pe schimbători cationici. Valoarea pH-ului supernatantului din faza precedentă, se ajustează la 4,2, iar supernatantul se aduce pe Sefaroză CM, în debit rapid (CM Sepharose Fast Flow). Se aplică gradient de douăzeci de volume, pe coloană, la 20 mM NaOAc, la pH 4,2 și NaCl de la 0 M la 1,0 M.

45 9. Cromatografia HIC. Frațiunile de vârf unite de pe Sepharoză CM (stabilite prin analiza în radiații ultraviolete) din faza anterioară, se ajustează cu 0,2 M sulfat de amoniu. Gradientul de 20 volume sare al coloanei în fază reversă este dat la 5 mM NaOAc, la pH 4,2, cu 0,4 M până la 0 M sulfat de amoniu. Acest material este apoi concentrat și diafiltrat în PBS.

Rezultate

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

55

## MD 2311 G2 2003.11.30

63

Tabelul 8

Pierderea în greutate după infuzarea continuă

Timp (zile)	Vehicul (PBS)	Polipeptida OB recombinată
Zilele 1...2	3,24 +/- 1,13	1,68 +/- 1,4
Zilele 3...4	4,3 +/- .97	-2,12 +/- .79
Zilele 5...6	4,64 +/- .96	-4,62 +/- 1,3

5 Așa cum se observă, la finalul regimului de infuzare continuă timp de 6 zile, animalele care au primit polipeptida OB, au pierdut peste 4% din greutatea corporală, comparativ cu greutatea de referință. Este o pierdere substanțială de greutate l, mult mai rapidă decât în cazul utilizării injectării intraperitoneale (i.p.). Pierderea în greutate numai cu 2,6-3,0% a fost înregistrată la finalul perioadei de injectare în cea de a 32-a zi, la șoarecele de tip sălbatec (normal), cu injectarea zilnică intraperitoneală (i.p.) a polipeptidei OB murinice recombinate la 10 mg/kg doză și această pierdere în greutate n-a fost mai mare decât 4% în oricare timp de dozare, conform schemei (datele nu sunt prezentate). Datele prezentate au indicat că prin infuzarea continuă, la un dozaj mai mic de 20 de ori (0,5 mg/kg vs. 10 mg/kg) se obține o pierdere în greutate mai mare, într-un timp mai scurt. Rezultatele obținute sunt prezentate cu semnificație statistică, bunăoară -4,62% cu p<.0001.

10 Exemplul 14. Clonarea și exprimarea analogului polipeptidei OB umane recombinate  
 15 Acest exemplu prevede compozițiile și metodele pentru prepararea unui analog al polipeptidei OB în versiune umană recombinată.

20 Versiunea umană a OB ADN a fost construită din OB ADN murinic, ca în exemplul 13 de mai sus, prin înlocuirea regiunii între porțiunile MluI și BamHI, cu duplexul ADN (format din oligonucleotide sintetice), în care au fost desemnate 20 de substituiți de codoane. Codoanele pentru arginină la șoarecele matur, în poziție 35 și leucina, la șoarecele matur în poziția 74, au rămas neschimbate. Porțiunea MluI este arătată sub linia solidă în secvența următoare. Acest ADN a fost așezat în vectorul pCFM 1656 (ATCC Accession No. 69576), în același mod ca pentru proteina murinică recombinată, așa cum s-a descris mai sus.

25 Secvența ADN (dublu răsucit) OB met umană recombinată și secvența de aminoacid (SEQ ID No. 96 și 97).

```

5  CATATGGTACCGATCCAGAAA GTCAGGACGACACC AAAACCTTAATT AAAACGATCGTT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
   GTA TAC CAT GGC TAG GTC TTT CAA GTC CTG CIG TGG TTT TGG AAT TAA TTT TGC TAG CAA
   M V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V -
30  ACGCGTATCAACGACATCAGTCA CACCCA GTCGGT CAGCTCTAAACAGCGTGTACAGGC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
   TGCGCATAGTTGCTGTAGTCA GTG TGG GTC AGC CAC TCG AGA TTT GTC GCACAA TGT CCG
   T R I N D I S H T Q S V S S K Q R V T G-
35  CTG GAC TTC ATC CCG GGT CTG CAC CCG ATC CTG ACC TTG TCC AAA ATG GAC CAG ACC CTG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
   GAC CTG AAG TAG GGC CCA GAC GTG GGC TAG GAC TGG AAC AGG TTT TAC CTG GTC TGG GAC
   L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L -
40  GCTGTATACCAGCAGATCTTA ACC TCC ATG CCG TCCC GFAACGTTCTTCAGATCTCTAAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
   CGA CAT ATG GTC GTC TAG AAT TGG AGG TAC GGC AGG GCA TTG CAA GAA GTC TAG AGA TTG
   A V Y Q Q I L T S M P S R N V L Q I S N-
45  GAC CTC GAG AAC CTT CGC GAC CTG CTG CAC GTG CTG GCA TTC TCC AAA TCC TGCCAC CTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
   CTGGAGCTCTTGAA GCG CTGGAC GAC GTG CAC GAC CGT AAG AGG TTT AGG ACG GTG GAC
45  D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L-
   CCA TGG GCT TCA GGT CTT GAG ACT CTG GAC TCT CTG GGC GGG GTC CTG GAA GCA TCC GGT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
   GGT ACC CGA AGT CCA GAAC TCG A GAC CTG AGA GAC CCG CCC CAG GAC CTT CGT AGG CCA
   P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G-
50  TAC AGC ACC GAA GTT GTT CTG TCC CGT CTG CAG GGT TCC CTT CAG GAC ATG CTT CTC TGG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
   ATG TCG TGG CTT CAA CAA CGAG AC AGG GCA GAC GTC CCA AGG GAA GTC CTG TAC GAA ACC
   Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W-
55  CAG CTG GAC CTG TCT CCG GGT TGT TAA TGG ATCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 454
   GTC GAC CTG GAC AGA GGC CCA ACA ATT ACC TAG G
   Q L D L S P G C
    
```

## MD 2311 G2 2003.11.30

64

Fermentația.

5 Fermentația celulelor gazdă, de mai sus, pentru a produce polipeptida OB umană recombinată, s-a realizat aplicând condițiile și compozițiile descrise mai sus, pentru materialul murinic recombinat. Aceste rezultate au fost analizate pentru randament (g/l), prepararea-purificarea materialului OB uman recombinat, cantități minore de proteină bacteriană, corelate cu analiza de exprimare bacteriană.

Tabelul 9

Analiza exprimării polipeptidei OB umane			
Timp	OD (0 600 nm)	Randament (g/l)	Exprimare (mg/OD·L)
Ind. + 2 ore	47	1,91	41
Ind. + 4 ore	79	9,48	120
Ind. + 6 ore	95	13,01	137
Ind. + 8 ore	94	13,24	141
Ind. + 10 ore	98	14,65	149

10 Prescurtări: Ind. + – ore, reprezintă orele după inducția exprimării proteinei, așa cum s-a descris în exemplul 13, pentru materialul murinic recombinat, aplicând pCFM 1656.

O.D.: densitate optică, care s-a măsurat prin spectrofotometrie, ca miligrame per O.D. unități pe litru mg/O.D·L: exprimarea în termeni de miligrame proteină per unitate O.D., per litru.

Purificarea polipeptidei ob umane, recombinate.

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

Exemplul 15. Studiile de răspuns la doză

25 Un studiu adițional a demonstrat că răspunsul la doză există în cazul administrării continue a proteinei OB. În acest studiu, s-au utilizat șoareci de tip sălbatec (neobezi, de tip CD-1, cântărind de la 35, la 40 g), cărora li s-a administrat proteina OB murinică recombinată, aplicând metode similare cu cele din exemplul 12 și exemplul 13. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 10 de mai jos (cu procente de pierdere în greutate, comparative cu greutatea de referință, măsurată mai sus):

Tabelul 10

Răspunsul de doză, cu administrare continuă		
Doza	Timpul	% reducere în greutatea corporală
0,03 mg/kg/zi	Ziua 2	3,5
1 mg/kg/zi	Ziua 2	7,5
1 mg/kg/zi	Ziua 4	14

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

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

35 Șoarecii de tip C57B1/6J ob/ob de 16 săptămâni, se tratează cu 5 μg/g/zi de leptină și vehicul, sau nu primesc nici un tratament, timp de 33 de zile. În al doilea experiment, șoarecii în vârstă de 7 săptămâni, sunt tratați cu 10 μg/g/zi de leptină umană, leptină murinică sau vehicul, timp de 12 zile. Șoarecii sunt sacrificați și se evaluează apoi greutatea corporală totală, compoziția organismului, nivelurile de insulină și nivelurile de glucoză. Datele obținute în aceste experimente, sunt prezentate în tabelul 11.

40

## MD 2311 G2 2003.11.30

65

Tabelul 11

Greutatea corporală, compoziția, nivelurile de insulină și glucoză la șoarecii tratați

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

5

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

10

Exemplul 17. Efectele dozelor ridicate de leptină asupra șoarecelui de tip sălbatec  
Șoarecii slabi de control pentru cei ob/ob (C57B1/6J +/-) care sunt injectați odată pe zi intraperitoneal l.p. cu 10  $\mu\text{g/g}$  de leptină murinică sau vehicul (PBS) și greutatea corporală și consumul de hrană se măsoară peste două săptămâni. Se observă o semnificativă scădere a greutății corporale începând cu ziua a 4-a și o semnificativă scădere a consumului de hrană, pentru prima săptămână. Cu toate acestea, după o săptămână, nivelurile de consum de hrană devin apropiate pentru ambele grupe de șoareci. Animalele au fost sacrificate la sfârșitul a două săptămâni și apoi s-a determinat compoziția organismului. Rezultatele analizei compoziției organismului. sunt prezentate în Tabelul 12. Datele atestă scăderea grăsimilor organismului la animalele care au primit leptină, relativ cu cele care au primit PBS.

15

20

## MD 2311 G2 2003.11.30

66

Tabelul 12

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

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

5

Un al doilea experiment atestă efectele injecțiilor administrate intraperitoneal i.p. de două ori pe zi, cu câte 12,5 μg/g de leptină murinică, la șoarecii de tip sălbatec C57BL/6J. Se observă o scădere semnificativă a greutății corporale și consumului de hrană asociate cu injectarea de două ori pe zi a polipeptidei. Pentru acest experiment, animalele sunt plasate în camere metabolice. Hrana constă în dieta de hrană sub formă de pulbere Purina #5001. Această dietă din experimentele precedente, a utilizat hrana formată din dietă, tapiocă și apă. Astfel, hrana utilizată în camerele metabolice are un conținut caloric mai ridicat, care explică de ce cantitatea de hrană consumată diferă de cea a altor animale cu dietă conținând apă.

Lista de mai jos prezintă referințele din comentariile menționate mai sus, și în special referințele privind procedeele experimentale și comentariile.

15 Bahary et al. Genomics, 11: 33-47 (1991).

Bahary et al. Genomics, 13: 761-769 (1992).

Bahary et al. Molecular mapping of mouse chromosomes 4 and 6: Use of a flow-sorted Robertsonian chromosome (1991).

Blank et al. Mammalian Genome, 1: s51-s78 (1991).

20 Bogardus et al. Annals of the New York Academy of Sciences, 630: 100-115 (1991).

Friedman et al., Mammalian Genome, 1: 130-144 (1991).

Harris, FASEB J. 4: 3310-3318 (1990).

Jacobowitz et al. N. Engl. J. Med. 315: 96-100 (1986).

Kessey, in Obesity, pp. 144-166, Stunkard ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co. (1980).

25 Kessey et al. Ann. Rev. Psychol. 37: 109-133.22 (1986).

Leibel et al. "Genetic variation and nutrition in obesity: Approaches to the molecular genetics of obesity", in Genetic Variation and Nutrition, pp. 90-101, Simopoulos and Childs eds. S. Karger, Basel (1990).

Siegel et al. Cytogenet. Cell Genet., 61(3); 184-185 (1992).

30 Prezenta invenție poate fi alcătuită și în altă formă sau poate fi realizată prin alte metode, fără a se îndepărta de la spiritul sau caracteristicile ei esențiale. Prezenta descriere este acceptată, deoarece în toate aspectele ilustrative și nerestrictive, scopul invenției fiind indicat în revendicările anexate, toate modificările care se referă la semnificarea și gradul de echivalență sunt de asemenea cuprinse în prezenta invenție.

## MD 2311 G2 2003.11.30

67

Diversele referințe sunt citate pe parcursul întregii specificației, fiecare dintre acestea fiind încorporate aici în totalitate.

5 Așa cum se atestă în revendicări, invenția este în conformitate cu specificația, cu referințele și materialele inițiale. Solicitanții au depus în 9 august 1995, următoarele depozite cu colecția Culturii de tip American 12301, Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852-1178. U.S.A., conform reglementărilor de la Treaty Budapesta, privind Recunoașterea internațională a depozitelor de Microorganisme în calitate de procedeu patentat: *Escherichia coli* H14 harboring plasmid pETH 14, accesion No. 69880 și *Escherichia coli* M9 harboring plasmid pETM9, accesion No. 69879.

### 10 SEQUENCE LISTING

#### (1) GENERAL INFORMATION:

15 (i) APPLICANT: JEFFREY M. FRIEDMAN, YIYING ZHANG, RICARDO PROENCA, MARGHERITA MAFFEI, JEFFREY HALAAS, KETAN GAJIWALA, AND STEPHEN K. BURLEY

(ii) TITLE OF INVENTION: MODULATORS OF BODY WEIGHT, CORRESPONDING NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, AND DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USES THEREOF

20 (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 99

#### (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

25 (A) ADDRESSEE: Klauber & Jackson  
(B) STREET: 411 Hackensack Avenue  
(C) CITY: Hackensack  
(D) STATE: New Jersey  
(E) COUNTRY: USA  
(F) ZIP: 07601

#### 30 (v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

#### 35 (vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: PCT/US95/10479  
(B) FILING DATE: August 17, 1995  
(C) CLASSIFICATION:

#### 40 (vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/483,211  
(B) FILING DATE: June 7, 1995  
(C) CLASSIFICATION:

#### 45 (vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/438,431  
(B) FILING DATE: May 10, 1995  
(C) CLASSIFICATION:

#### 50 (vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/347,563  
(B) FILING DATE: November 30, 1994  
(C) CLASSIFICATION:

#### 55 (vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/292,345  
(B) FILING DATE: August 17, 1994  
(C) CLASSIFICATION:

#### 60 (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

# MD 2311 G2 2003.11.30

68

(A) NAME: Jackson Esq., David A.  
(B) REGISTRATION NUMBER: 26,742  
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 600-1-087 PCT

5 (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 201 487-5800  
(B) TELEFAX: 201 343-1684  
(C) TELEX: 133521

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 2793 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
15 (C) STRANDEDNESS: double  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(A) DESCRIPTION: Murine ob cDNA

20

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

25

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Murine

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS  
30 (B) LOCATION: 57..560

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

35 GGATCCCTGC TCCAGCAGCT GCAAGGTGCA AGAAGAAGAA GATCCCAGGG AGGAAA 56

ATG TGC TGG AGA CCC CTG TGT CGG TTC CTG TGG CTT TGG TCC TAT CTG 104  
Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu  
1 5 10 15

40 TCT TAT GTT CAA GCA GTG CCT ATC CAG AAA GTC CAG GAT GAC ACC AAA 152  
Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys  
20 25 30

45 ACC CTC ATC AAG ACC ATT GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG 200  
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr  
35 40 45

50 CAG TCG GTA TCC GCC AAG CAG AGG GTC ACT GGC TTG GAC TTC ATT CCT 248  
Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro  
50 55 60

55 GGG CTT CAC CCC ATT CTG AGT TTG TCC AAG ATG GAC CAG ACT CTG GCA 296  
Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala  
65 70 75 80

60 GTC TAT CAA CAG GTC CTC ACC AGC CTG CCT TCC CAA AAT GTG CTG CAG 344  
Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln  
85 90 95

ATA GCC AAT GAC CTG GAG AAT CTC CGA GAC CTC CTC CAT CTG CTG GCC 392  
Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala



## MD 2311 G2 2003.11.30

70

TCTGAAAGGG TGAGGCATTT TCTTACCTCT GTGGCCACAT AGTGTGGCTT TGTGAAAAGG  
1488

5 ACAAAGGAGT TGA CTCTTTC CGGAACATTT GGAGTGTACC AGGCACCCTT GGAGGGGCTA  
1548

AAGCTACAGG CCTTTTGTG GCATATTGCT GAGCTCAGGG AGTGAGGGCC CCACATTTGA  
1608

10 GACAGTGAGC CCCAAGAAAA GGGTCCCTGG TG TAGATCTC CAAGGTTGTC CAGGGTTGAT  
1668

CTCACAATGC GTTCTTAAG CAGGTAGACG TTTGCATGCC AATATGTGGT TCTCATCTGA  
1728

15 TTGGTTCATC CAAAGTAGAA CCCTGTCTCC CACCCATTCT GTGGGGAGTT TTGTTCCAGT  
1788

GGGAATGAGA AATCACTTAG CAGATGGTCC TGAGCCCTGG GCCAGCACTG CTGAGGAAGT  
1848

20 GCCAGGGCCC CAGGCCAGGC TGCCAGAATT GCCCTTCGGG CTGGAGGATG AACAAAGGGG  
1908

25 CTGGGTTTT TCCATCACCC CTGCACCCTA TGTCACCATC AA ACTGGGGG GCAGATCAGT  
1968

GAGAGGACAC TTGATGAAA GCAATACACT TTAAGACTGA GCACAGTTTC GTGCTCAGCT  
2028

30 CTGTCTGGTG CTGTGAGCTA GAGAAGCTCA CCACATACAT ATAAAAATCA GAGGCTCATG  
2088

TCCCTGTGGT TAGACCCTAC TCGCGGCGGT GTACTCCACC ACAGCAGCAC CGCACCGCTG  
2148

35 GAAGTACAGT GCTGTCTTCA ACAGGTGTGA AAGAACCTGA GCTGAGGGTG ACAGTGCCCA  
2208

GGGAACCCCT GCTTGCAGTC TATTGCATTT ACATACCGCA TTTCAGGGCA CATTAGCATC  
2268

40 CACTCCTATG GTAGCACACT GTTGACAATA GGACAAGGGA TAGGGGTTGA CTATCCCTTA  
2328

45 TCCAAAATGC TTGGGACTAG AAGAGTTTTG GATTTTAGAG TCTTTTCAGG CATAGGTATA  
2388

TTTGAGTATA TATAAAATGA GATATCTTGG GGATGGGGCC CAAGTATAAA CATGAAGTTC  
2448

50 ATTTATATTT CATAATACCG TATAGACACT GCTTGAAGTG TAGTTTTATA CAGTGTTTTA  
2508

AATAACGTTG TATGCATGAA AGACGTTTTT ACAGCATGAA CCTGTCTACT CATGCCAGCA  
2568

55 CTCAAAAACC TTGGGGTTTT GGAGCAGTTT GGATCTTGGG TTTTCTGTTA AGAGATGGTT  
2628

60 AGCTTATACC TAAAACCATA ATGGCAAACA GGCTGCAGGA CCAGACTGGA TCCTCAGCCC  
2688

## MD 2311 G2 2003.11.30

71

TGAAGTGTGC CCTTCCAGCC AGGTCATACC CTGTGGAGGT GAGCGGGATC AGGTTTTGTG  
2748

5 GTGCTAAGAG AGGAGTTGGA GGTAGATTTT GGAGGATCTG AGGGC 2793

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 167 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

15 (ii) MOLECULE TYPE: protein

(A) DESCRIPTION: Murine ob polypeptide

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

20 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

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

30 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

35 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

40 Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro  
115 120 125

45 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

50 Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys  
165

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

55 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 700 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

60 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

# MD 2311 G2 2003.11.30

72

(A) DESCRIPTION: Human ob cDNA where N represents any nucleotide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

5 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

10 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 46..546

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

```
NNNGNNGTTG CAAGGCCCAA GAAGCCANN NTCCTGGGAA GGAAA ATG CAT TGG      54
                Met His Trp
                1
20 GGA ACC CTG TGC GGA TTC TTG TGG CTT TGG CCC TAT CTT TTC TAT GTC      102
   Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu Phe Tyr Val
     5         10         15
25 CAA GCT GTG CCC ATC CAA AAA GTC CAA GAT GAC ACC AAA ACC CTC ATC      150
   Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile
     20         25         30         35
30 AAG ACA ATT GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG CAG TCA GTC      198
   Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val
     40         45         50
35 TCC TCC AAA CAG AAA GTC ACC GGT TTG GAC TTC ATT CCT GGG CTC CAC      246
   Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His
     55         60         65
40 CCC ATC CTG ACC TTA TCC AAG ATG GAC CAG ACA CTG GCA GTC TAC CAA      294
   Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln
     70         75         80
45 CAG ATC CTC ACC AGT ATG CCT TCC AGA AAC GTG ATC CAA ATA TCC AAC      342
   Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn
     85         90         95
50 GAC CTG GAG AAC CTC CGG GAT CTT CTT CAC GTG CTG GCC TTC TCT AAG      390
   Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys
    100         105         110         115
55 AGC TGC CAC TTG CCC TGG GCC AGT GGC CTG GAG ACC TTG GAC AGC CTG      438
   Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu
    120         125         130
60 GGG GGT GTC CTG GAA GCT TCA GGC TAC TCC ACA GAG GTG GTG GCC CTG      486
   Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu
    135         140         145
65 AGC AGG CTG CAG GGG TCT CTG CAG GAC ATG CTG TGG CAG CTG GAC CTC      534
   Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu
    150         155         160
70 AGC CCT GGG TGC TGAGGCCTT GAAGGTCCTT CTCCTGCAA GGACTNACGT      585
```

## MD 2311 G2 2003.11.30

73

Ser Pro Gly Cys  
165

5 TAAGGGAAGG AACTCTGGTT TCCAGGTATC TCCAGGATTG AAGAGCATTG CATGGACACC  
645

CCTTATCCAG GACTCTGTCA ATTTCCCTGA CTCCTCTAAG CCACTCTTCC AAAGG 700

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 167 amino acids

(B) TYPE: amino acid

15 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(A) DESCRIPTION: Human ob polypeptide

20 (vi) ORIGINAL SOURCE: Human

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

25 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

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

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

40 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

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

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

55 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

60 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

## MD 2311 G2 2003.11.30

74

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 166 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear
- 5
- (ii) MOLECULE TYPE: protein  
(A) DESCRIPTION: Murine ob polypeptide lacking Gln at position 49
- 10
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Murine
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:
- 15 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
- 20 Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr  
35 40 45
- Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly  
25 50 55 60
- Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val  
65 70 75 80
- 30 Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile  
85 90 95
- Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe  
100 105 110
- 35 Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu  
115 120 125
- Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val  
40 130 135 140
- Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu  
145 150 155 160
- 45 Asp Val Ser Pro Glu Cys  
165
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:
- 50 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 166 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear
- 55 (ii) MOLECULE TYPE: protein  
(A) Description: Human ob polypeptide lacking Gln at position 49
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 60 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

# MD 2311 G2 2003.11.30

75

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

5 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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu  
30 145 150 155 160

Asp Leu Ser Pro Gly Cys  
165

35 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 176 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
40 (C) STRANDEDNESS: double  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)  
(A) DESCRIPTION: exon 2G7  
45

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

GTGCAAGAAG AAGAAGATCC CAGGGCAGGA AAATGTGCTG GAGACCCCTG TGTCGGGTCC  
60

55 NGTGGNTTTG GTCCTATCTG TCTTATGTNC AAGCAGTGCC TATCCAGAAA GTCCAGGATG  
120

ACACCAAAG CCTCATCAAG ACCATTGTCA NCAGGATCAC TGANATTCA CACACG 176

60 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

## MD 2311 G2 2003.11.30

76

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
5 (C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
10 (A) DESCRIPTION: PCR 5O primer for exon 2G7
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:  
CCAGGGCAGG AAAATGTG 18
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:  
20
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 22 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
25 (C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: PCR 3O primer for exon 2G7
- 30 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: YES
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:  
35 CATCCTGGAC TTTCTGGATA GG 22
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:  
40
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 23 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear
- 45 (ii) MOLECULE TYPE: peptide  
(A) DESCRIPTION: putative N-terminal signal peptide
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:  
50 Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu Trp Leu Trp Ser Tyr Leu  
1 5 10 15  
Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro  
20
- 55 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:  
60
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 287 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: double

## MD 2311 G2 2003.11.30

77

- (D) TOPOLOGY: circular
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (plasmid)  
(A) DESCRIPTION: pET-15b expression vector
- 5 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 10 (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: T7 promoter  
(B) LOCATION: 20..37
- 15 (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: lac operator  
(B) LOCATION: 39..64
- (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: CDS  
20 (B) LOCATION: 108..243
- (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: His-Tag  
(B) LOCATION: 123..137
- 25 (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: Thrombin cleavage site  
(B) LOCATION: 184..196
- 30 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:
- AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG CGGATAACAA  
60
- 35 TTCCCCTCTA CAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACC ATG GGC AGC 116  
Met Gly Ser  
1
- AGC CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC 164  
40 Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser  
5 10 15
- CAT ATG CTC GAG GAT CCC GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG 212  
45 His Met Leu Glu Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys Glu Ala Glu  
20 25 30 35
- TTG GCT GCT GCC ACC GCT GAG CAA TAA CTA G CATAACCCCT TGGGGCCTCT 263  
Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln \*  
40
- 50 AAACGGGTCT TGAGGGGTTT TTTG 287
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:
- 55 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 43 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear
- 60 (ii) MOLECULE TYPE: protein

## MD 2311 G2 2003.11.30

78

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro  
1           5           10           15  
5  
Arg Gly Ser His Met Leu Glu Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys  
          20           25           30  
10  
Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln  
          35           40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

- 15 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 32 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 20 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Murine 5O primer
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 25 (iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

30 CTTATGTTCA TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC 32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

- 35 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 32 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 40 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Murine 3O primer
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 45 (iv) ANTI-SENSE: Yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

50 TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC 32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

- 55 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 32 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 60 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Human 5O primer

## MD 2311 G2 2003.11.30

79

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:  
TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC 32
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:
- 10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 32 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
15 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Human 3O primer
- 20 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: Yes
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:  
25 TTCCTTCCCA TATGGTACTC CTTGCAGGAA GA 32
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:
- 30 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 11 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: double  
35 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA  
(A) DESCRIPTION: Splice acceptor site in ob
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 40 (iv) ANTI-SENSE: NO
- (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: Splice acceptor site
- 45 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:  
AGCAGTCGGT A 11
- 50 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 16 amino acids  
55 (B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide  
(A) DESCRIPTION: ob peptide fragment
- 60 (v) FRAGMENT TYPE: internal

## MD 2311 G2 2003.11.30

80

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Murine

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

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

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 15 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
15 (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide  
(A) DESCRIPTION: ob peptide fragment

20 (v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Murine

25 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

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

30 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 19 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
35 (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide  
(A) DESCRIPTION: ob peptide fragment

40 (v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Murine

45 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

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

50 Ser Leu Asp

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

55 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: unknown

60 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

# MD 2311 G2 2003.11.30

81

(A) DESCRIPTION: ob peptide fragment

(v) FRAGMENT TYPE: Carboxyl terminal

5 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Murine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

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

Ser Pro Glu Cys  
20

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20 (A) LENGTH: 414 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: double  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

25 (A) DESCRIPTION: portion of the human ob gene including noncoding sequence  
upstream of first exon, coding sequence of first exon, and 50 region of first intron

(iii) HYPOTHETICAL: NO

30 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

35 (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: CDS  
(B) LOCATION: 38..181

40 (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: 50 region of first intron  
(B) LOCATION: 182..414

45 (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: 50 noncoding sequence of the human ob gene from which the HOB 1gF  
DNA primer was generated  
(B) LOCATION: 11..28

50 (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: intronic sequence of the human ob gene from which the HOB 1gR  
primer was generated  
(B) LOCATION: 241..260

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

55 GGTGCAAGG CCCAAGAAGC CCATCCTGGG AAGGAAA ATG CAT TGG GGA ACC CTG 55  
Met His Trp Gly Thr Leu  
1 5

60 TGC GGA TTC TTG TGG CTT TGG CCC TAT CTT TTC TAT GTC CAA GCT GTG 103  
Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu Phe Tyr Val Gln Ala Val



# MD 2311 G2 2003.11.30

83

(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: CDS  
(B) LOCATION: 291..648  
5

(ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: 3O of first intron  
(B) LOCATION: 1..290

10 (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: intronic sequence of the human ob gene HOB from which the HOB  
2gF primer was generated  
(B) LOCATION: 250..269

15 (ix) FEATURE:  
(A) NAME/KEY: 3O noncoding sequence of the human ob gene from which the HOB  
2gR DNA primer was generated  
(B) LOCATION: 707..728

20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

CTGGTTCTTT CAGGAAGAGG CCATGTAAGA GAAAGGAATT GACCTAGGGA AAATTGGCCT  
60  
GGGAAGTGGA GGGAACGGAT GGTGTGGGAA AAGCAGGAAT CTCGGAGACC AGCTTAGAGG  
25 120

CTTGGCAGTC ACCTGGGTGC AGGANACAAG GGCCTGAGCC AAAGTGGTGA GGGAGGGTGG  
180

AAGGAGACAG CCCAGAGAAT GACCCTCCAT GCCCACGGGG AAGGCAGAGG GCTCTGAGAG  
30 240

CGATTCTCC CACATGCTGA GCACTTGTTCC TCCCTCTTCC TCCTNCATAG CAG TCA 296  
Gln Ser  
35 1

GTC TCC TCC AAA CAG AAA GTC ACC GGT TTG GAC TTC ATT CCT GGG CTC 344  
Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu  
5 10 15

40 CAC CCC ATC CTG ACC TTA TCC AAG ATG GAC CAG ACA CTG GCA GTC TAC 392  
His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr  
20 25 30

45 CAA CAG ATC CTC ACC AGT ATG CCT TCC AGA AAC GTG ATC CAA ATA TCC 440  
Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser  
35 40 45 50

50 AAC GAC CTG GAG AAC CTC CGG GAT CTT CTT CAC GTG CTG GCC TTC TCT 488  
Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser  
55 60 65

AAG AGC TGC CAC TTG CCC TGG GCC AGT GGC CTG GAG ACC TTG GAC AGC 536  
Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser  
55 70 75 80

CTG GGG GGT GTC CTG GAA GCT TCA GGC TAC TCC ACA GAG GTG GTG GCC 584  
Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala  
85 90 95

60 CTG AGC AGG CTG CAG GGG TCT CTG CAG GAC ATG CTG TGG CAG CTG GAC 632

## MD 2311 G2 2003.11.30

84

Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp  
100 105 110

5 CTC AGC CCT GGG TGC T GAGGCCTGA AGGTCACTCT TCCTGCAAGG ACTACGTAA 688  
Leu Ser Pro Gly Cys  
115

GGGAAGGAAC TCTGGCTTTC CAGGTATCTC CAGGATTGAA GAGCATTGCA TGGACACCCC  
748

10 TTATCCAGGA CTCTGTCAAT TTCCTGACT CCTCTAAGCC ACTCTCCAA AGG 801

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

15 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 119 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

20 (ii) MOLECULE TYPE: protein

(A) DESCRIPTION: C-terminal portion of the human ob protein encoded by  
second exon

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

25 Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro  
1 5 10 15

30 Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala  
20 25 30

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln  
35 40 45

35 Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala  
50 55 60

40 Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu  
65 70 75 80

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val  
85 90 95

45 Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln  
100 105 110

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys  
115

50 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: unknown

55 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

60

(vi) ORIGINAL SOURCE:

## MD 2311 G2 2003.11.30

85

(A) ORGANISM: pichia yeast

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

5

Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala  
1           5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 4 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: unknown

15

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal

20

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: pichia yeast

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

25

Glu Ala Glu Ala  
1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 4 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: unknown

35

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: Internal

40

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: pichia yeast

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

45

Leu Glu Lys Arg  
1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

50

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

55

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: HOB 1gF DNA primer generated from the 50 noncoding  
the human ob gene

sequence of

60

(iii) HYPOTHETICAL: NO

## MD 2311 G2 2003.11.30

86

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

5

CCCAAGAAGC CCATCCTG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: HOB 1gR DNA primer generated from the first  
sequence of the human ob gene

intronic

20

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: YES

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

25

GACTATCTGG GTCCAGTGCC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

35

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: HOB 2gR DNA primer generated from the first  
the human ob gene

intronic sequence of

40

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

45

CCACATGCTG AGCACTTGTT

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

50

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 22 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

55

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: HOB 2gR DNA primer generated from the 30 noncoding  
sequence of the human ob gene

60

(iii) HYPOTHETICAL: NO

## MD 2311 G2 2003.11.30

87

(iv) ANTI-SENSE: YES

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

5 CTTCAATCCT GGAGATACCT GG 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 10 (A) LENGTH: 51 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: double  
(D) TOPOLOGY: circular

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(A) DESCRIPTION: pPIC.9 cloning site

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:

CTCGAGAAAA GAGAGGCTGA AGCTTACGTA GAATTCCTTA GGCCGGCCGG G 51

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 30 (A) LENGTH: 40 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: PCR 5O primer for amplifying human ob cDNA sequence

35

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

40 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:34:

GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCCATCCAA AAAGTCCAAG 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 45 (A) LENGTH: 31 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
50 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: PCR 3O primer for amplifying human ob cDNA sequence

55

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: YES

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:35:

60

GCGCGAATTC TCAGACCCA GGGCTGAGGT C 31

## MD 2311 G2 2003.11.30

88

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 40 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 10 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: PCR 5O primer for amplifying murine ob cDNA sequence
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 15 (iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:36:

20 GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCTATCCAG AAAGTCCAGG 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

- 25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 31 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 30 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: PCR 3O primer for amplifying murine ob cDNA sequence
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 35 (iv) ANTI-SENSE: YES

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:37:

GCGCGAATTC TCAGCATTCA GGGCTAACAT C 31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38:

- 45 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 4 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein  
(A) DESCRIPTION: tetrapeptide at N-terminus of renatured murine ob protein after  
thrombin cleavage
- 50 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Murine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:

55 Gly Ser His Met  
1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:39:

- 60 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

## MD 2311 G2 2003.11.30

89

- (A) LENGTH: 19 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 5
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1734
- 10
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 15
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:  
CAAGACAAAT GAGATAAGG 19
- 20
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:40:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 25
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1734
- 30
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 35
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:  
AGAGTTACAG CTTTACAG 18
- 40
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:41:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 19 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 45
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS494
- 50
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 55
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 60
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:41:

## MD 2311 G2 2003.11.30

90

CTAAACACCT TTCCATTCC

19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 22 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

10 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS494

(iii) HYPOTHETICAL: NO

15 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:42:

TTATATTAC TTTTCCCCTC TC

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43:

- 25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
30 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS883

35 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

40 (A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:43:

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44:

- 50 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

55 (A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS883

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

60

(vi) ORIGINAL SOURCE:

## MD 2311 G2 2003.11.30

91

(A) ORGANISM: Human  
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:

5 GTGCAGCTTT AATTGTGAGC 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:45:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
10 (A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
15 (A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2359
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO  
20
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:45:  
25 AGTGTTGTGT TTCTCCTG 18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:46:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
30 (A) LENGTH: 19 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
35 (A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2359
- (iii) HYPOTHETICAL: NO  
40
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human  
45

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:46:  
AAAGGGGATG TGATAAGTG 19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:47:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
55 (A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
60 (A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2336
- (iii) HYPOTHETICAL: NO

## MD 2311 G2 2003.11.30

92

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

5

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:47:

GGTGTTACGT TTAGTTAC

18

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:48:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

15

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2336

20

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

25

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:48:

30 GGAATAATGA GAGAAGATTG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:49:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

35

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1218

40

(iii) HYPOTHETICAL: NO

45

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

50

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:49:

GCTCAACTGA CAGAAAAC

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:50:

55

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

60

(D) TOPOLOGY: linear

## MD 2311 G2 2003.11.30

93

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1218
- 5 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 10 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:50:  
GACTATGTAA AAGAAATGCC 20
- 15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:51:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
20 (C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1402
- 25 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 30 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:51:  
35 AAAGGGCTTC TAATCTAC 18
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:52:  
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
40 (C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 45 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1402
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 50 (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 55 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:52:  
CCTTCCAAC TCTTTGAC 18
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:53:  
60 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

## MD 2311 G2 2003.11.30

94

- (A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 5
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS999
- 10
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 15
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:53:  
TAAACCCCT TTCTGTTC 18
- 20
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:54:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 19 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 25
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS999
- 30
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 35
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:54:  
TTGCATAATA GTCACACCC 19
- 40
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:55:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 22 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 45
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1751
- 50
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 55
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 60
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:55:

## MD 2311 G2 2003.11.30

95

CCAAAATCAG AATTGTCAGA AG

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:56:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
10 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1751
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 15 (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:56:

AAACCGAAGT TCAGATACAG

20

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:57:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
30 (B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1174
- 35 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 40 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:57:

45 AATATCTGAC ATTGGCAC

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:58:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
50 (B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 55 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1174
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 60 (iv) ANTI-SENSE: NO

## MD 2311 G2 2003.11.30

96

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:58:  
TTAGACCTGA GAAAAGAG 18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:59:

10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 19 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
15 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2061

20 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

25 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:59:  
GTTGCACAAT ACAAATCC 19

30 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:60:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
35 (B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2061

40 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

45 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:60:  
50 CTTCCATTAG TGTCTTATAG 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:61:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
55 (A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

60 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2588

## MD 2311 G2 2003.11.30

97

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 5 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:61:
- 10 ATCACTACAC ACCTAATC 18
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:62:
- 15 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 20 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2588
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 25 (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 30 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:62:
- CCATTCTACA TTTCCACC 18
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:63:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 24 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 40 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS808
- 45 (iii) HYPOTHETICAL: NO  
(iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 50 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:63:
- GGCTGTGTGA GCAAGATCCT AGGA 24
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:64:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 23 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single
- 60

## MD 2311 G2 2003.11.30

98

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS808

5

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

10

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:64:

15

TTGCCAGGCA AAGAGGGCTG GAC

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:65:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1392

(iii) HYPOTHETICAL: NO

30

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

35

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:65:

CTCAGGTATG TCTTTATC

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:66:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

45

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1392

50

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

55

(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:66:

TGICTCTGCA TTCTTTTC

18

60

## MD 2311 G2 2003.11.30

99

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:67:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 10 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1148
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 15 (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:67:  
GACACATACA AACACAAG 18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:68:

- 25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 19 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 30 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1148
- 35 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 40 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:68:  
ATTGAGTTGA GTGTAGTAG 19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:69:

- 45 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 50 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1529
- 55 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 60 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

## MD 2311 G2 2003.11.30

100

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:69:

CAGGGATTTC TAATTGTC 18

5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:70:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

10 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

15 (A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS1529

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

20 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:70:

25 AAAAGATGGA GGCTTTG 18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:71:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

30 (A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

35 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2619

(iii) HYPOTHETICAL: NO

40 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

45 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:71:

CGTTAAGGGA AGGAACTCTG G 21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:72:

50 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

55 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2619

60 (iii) HYPOTHETICAL: NO

## MD 2311 G2 2003.11.30

101

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

5

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:72:

TGGCTTAGAG GAGTCAGGGA

20

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:73:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

15

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS404

20

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

25

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:73:

30 ACCAGGGTCA ATACAAAG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:74:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

35

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS404

40

(iii) HYPOTHETICAL: NO

45

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

50

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:74:

TAATGTGTCC TTCTTGCC

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:75:

55

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

60

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

## MD 2311 G2 2003.11.30

102

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2367

5 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

10 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:75:

CAATCCTGGC TTCATTG 18

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:76:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
20 (C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2367

25 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

30 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:76:

35 AAGGTGGGTA GGATGCTA 18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:77:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
40 (C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker UT528

(iii) HYPOTHETICAL: NO

50 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

55 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:77:

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG 20

60 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:78:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

## MD 2311 G2 2003.11.30

103

- (A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 5
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker UT528
- 10
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 15
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:78:
- GTGCAGCTTT AATTGTGAGC 20
- 20
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:79:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 25
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFMa065zg9
- 30
- (iii) HYPOTHETICAL: NO  
(iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 35
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:79:
- AGCTTCAAGA CTTNAGCCT 20
- 40
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:80:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 19 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 45
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFMa065zg9
- 50
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 55
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 60
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:80:
- GGTCAGCAGC ACTGTGATT 19

## MD 2311 G2 2003.11.30

104

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:81:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 19 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 10 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFMa125wh1
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- 15 (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human
- 20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:81:

TCACCTTGAG ATTCCATCC 19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:82:

- 25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
30 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFMa125wh1
- 35 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
40 (A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:82:

45 AACACCGTGG TCTTATCAAA 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:83:

- 50 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- 55 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFM309yf10
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 60 (vi) ORIGINAL SOURCE:

## MD 2311 G2 2003.11.30

105

(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:83:

5 CATCCAAGTT GGCAGTTTTT 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:84:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 10 (A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

15 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFM309yf10

(iii) HYPOTHETICAL: NO

20 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

25 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:84:

AGATGCTGAA TTCCCAGACA 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:85:

30 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 35 (A) LENGTH: 16 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFM218xf10

40 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

45 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:85:

50 TGGGCAACAC AGCAAA 16

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:86:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 55 (A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

60 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFM218xf10

## MD 2311 G2 2003.11.30

106

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

5 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:86:

10 TGCAGTTAGT GCCAATGTCA 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:87:

15 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 16 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

20 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFM206xc1

(iii) HYPOTHETICAL: NO

25 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

30 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:87:

CCAGGCCATG TGGAAC 16

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:88:

35 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
40 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFM206xc1

45 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

50 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:88:

55 AGTTCTTGGC TTGCGTCAGT 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:89:

60 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 16 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single

## MD 2311 G2 2003.11.30

107

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFM199xh12

5

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

10

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:89:

15

TCTGATTGCT GGCTGC

16

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:90:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

(A) LENGTH: 17 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFM199xh12

(iii) HYPOTHETICAL: NO

30

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

35

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:90:

GCGCGTGTGT ATGTGAG

17

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:91:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

45

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFMa345wc9

50

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

55

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:91:

60

AGCTCTTGGC AAAC TCACAT

20

## MD 2311 G2 2003.11.30

108

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:92:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

- 10 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: Marker AFMa345wc9

(iii) HYPOTHETICAL: NO

15 (iv) ANTI-SENSE: NO

- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: Human

- 20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:92:

GCCTAAGGGA ATGAGACACA 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:93:

- 25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 24 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

- 30 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)  
(A) DESCRIPTION: primer for mouse Pax4 gene

35 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: murine

- 40 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:93:

GGGAGCCTTG TCCTGGGTAC AAAG 24

45 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:94:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 491 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
50 (C) STRANDEDNESS: double  
(D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA  
55 (A) DESCRIPTION: Recombinant murine met ob

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

- 60 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: murine

# MD 2311 G2 2003.11.30

109

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 41..478

5

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:94:

```
TCTAGATTG AGTTTTAACT TTTAGAAGGA GGAATAACAT ATG GTA CCG ATC CAG    55
                Met Val Pro Ile Gln
10                1      5

AAA GTT CAG GAC GAC ACC AAA ACC TTA ATT AAA ACG ATC GTT ACG CGT    103
Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg
                10      15      20

15 ATC AAC GAC ATC AGT CAC ACC CAG TCG GTC TCC GCT AAA CAG CGT GTT    151
Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val
                25      30      35

20 ACC GGT CTG GAC TTC ATC CCG GGT CTG CAC CCG ATC CTA AGC TTG TCC    199
Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser
                40      45      50

25 AAA ATG GAC CAG ACC CTG GCT GTA TAC CAG CAG GTG TTA ACC TCC CTG    247
Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu
                55      60      65

30 CCG TCC CAG AAC GTT CTT CAG ATC GCT AAC GAC CTC GAG AAC CTT CGC    295
Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg
                70      75      80      85

35 GAC CTG CTG CAC CTG CTG GCA TTC TCC AAA TCC TGC TCC CTG CCG CAG    343
Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln
                90      95      100

40 ACC TCA GGT CTT CAG AAA CCG GAA TCC CTG GAC GGG GTC CTG GAA GCA    391
Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala
                105      110      115

45 TCC CTG TAC AGC ACC GAA GTT GTT GCT CTG TCC CGT CTG CAG GGT TCC    439
Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser
                120      125      130

CTT CAG GAC ATC CTT CAG CAG CTG GAC GTT TCT CCG GAA TGT TAATGGA    488
Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys
                135      140      145

TCC                491
```

50 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:95:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 147 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

55

(ii) MOLECULE TYPE: protein

- (A) DESCRIPTION: Recombinant murine met ob protein

60

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:95:

## MD 2311 G2 2003.11.30

110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Cys  
145

30 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:96:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
35 (A) LENGTH: 454 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: double  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA  
40 (A) DESCRIPTION: Recombinant human met ob

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

45 (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM: human

(ix) FEATURE:  
50 (A) NAME/KEY: CDS  
(B) LOCATION: 4..444

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:96:

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

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

# MD 2311 G2 2003.11.30

111

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

5 CCG ATC CTG ACC TTG TCC AAA ATG GAC CAG ACC CTG GCT GTA TAC CAG 192  
Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln  
50 55 60

10 CAG ATC TTA ACC TCC ATG CCG TCC CGT AAC GTT CTT CAG ATC TCT AAC 240  
Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Leu Gln Ile Ser Asn  
65 70 75

15 GAC CTC GAG AAC CTT CGC GAC CTG CTG CAC GTG CTG GCA TTC TCC AAA 288  
Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys  
80 85 90 95

20 TCC TGC CAC CTG CCA TGG GCT TCA GGT CTT GAG ACT CTG GAC TCT CTG 336  
Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu  
100 105 110

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

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

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

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:97:

35

### (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 147 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

40

### (ii) MOLECULE TYPE: protein

(A) DESCRIPTION: Recombinant human met ob protein

45

### (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:97:

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

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

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

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

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

60

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser

## MD 2311 G2 2003.11.30

112

85 90 95

5 Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly  
100 105 110  
Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser  
115 120 125  
10 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser  
130 135 140  
Pro Gly Cys  
145

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:98:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 amino acids

(B) TYPE: amino acid

20 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

25

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:98:

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

Arg Gly Ser His Met  
20

35 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:99:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 amino acids

(B) TYPE: amino acid

40 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal His-tag

45

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:99:

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

Arg Gly Ser Pro  
20

## MD 2311 G2 2003.11.30

113

### (57) Revendicări:

- 5 1. Polipeptidă de obezitate (OB), având 145...167 de aminoacizi ai secvenței aminoacidice SEQ NOS: 2, 4, 5 sau 6, capabilă să moduleze greutatea corporală a animalelor.
2. Polipeptidă OB conform revendicării 1, având cel puțin o grupă chimică legată la aceasta.
3. Polipeptidă OB, având cel puțin 83% de omologie față de secvența aminoacidică a polipeptidei OB, prezentată prin secvența SEQ ID NOS: 2, 4, 5 sau 6.
- 10 4. Fragment imunogen al polipeptidei OB, selectat din grupa, care include: Val-Pro-Ile-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr (SEQ ID NO: 18); Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala (SEQ ID NO: 19); Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp (SEQ ID NO: 20); și Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys (SEQ ID NO: 21).
- 15 5. Analog uman al polipeptidei OB, incluzând secvența aminoacidică SEQ ID NO: 4 sau SEQ ID NO: 6, în care cel puțin un aminoacid selectat din grupa care include aminoacizii 53, 56, 71, 85, 89, 92, 95, 98, 110, 118, 121, 122, 126, 127, 128, 129, 132, 139, 157, 159, 163, și 166 (conform numerotării din secvența SEQ ID NO: 4) este substituit cu un alt aminoacid.
- 20 6. Analog uman al polipeptidei OB conform rev. 5, în care substituția se face cu un aminoacid divergent al polipeptidei OB la șoarece cu secvența SEQ ID NO: 2 sau SEQ ID NO: 5.
7. Analog uman al polipeptidei OB conform rev. 5, în care substituția se face cu alanină.
8. Analog uman al polipeptidei OB conform rev. 5, selectat din grupa ce include polipeptidele în care:
- (a) rezidul serinei în poziția 53 este substituit cu glicină, alanină, cisteină, valină, metionină sau treonină;
- 25 (b) rezidul serinei în poziția 98 este substituit cu glicină, alanină, valină, cisteină, metionină sau treonină și
- (c) rezidul argininei în poziția 92 este substituit cu asparagină, lizină, histidină, glutamină, acid glutamic, acid asparagic, serină, treonină, metionină sau cisteină.
- 30 9. Analog al polipeptidei OB, care include secvența aminoacidică SEQ ID NOS: 2, 4, 5 sau 6 selectată din grupa ce include polipeptidele în care:
- (a) cel puțin un reziduu de acid asparagic este substituit cu acid glutamic,
- (b) cel puțin un reziduu de izoleucină este substituit cu leucină,
- (c) cel puțin un reziduu de glicină sau valină este substituit cu alanină,
- (d) cel puțin un reziduu de arginină este substituit cu histidină,
- 35 (e) cel puțin un reziduu de tirozină sau fenilalanină este substituit cu triptofan,
- (f) cel puțin un reziduu în pozițiile 121...128 (conform numerotării secvenței SEQ ID NO: 4) este substituit cu glicină sau alanină și
- (g) cel puțin un reziduu în pozițiile 54...60 sau 118...166 (conform numerotării secvenței SEQ ID NO: 4) este substituit cu lizină, acid glutamic, cisteină sau prolină.
- 40 10. Polipeptidă OB conform uneia din rev. 1, 2, 5 sau 6, selectată din grupa ce include polipeptidele:
- (a) având deleția reziduurilor în pozițiile 1...21 și
- (b) polipeptide conform revendicării (a), având metionină în poziția 21 sau secvența glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 38) în pozițiile 18...21, sau secvența metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 98) în pozițiile 1...21.
- 45 11. Polipeptidă OB conform uneia din rev. 1, 2, 5 sau 6 selectată din grupa ce include polipeptidele:
- (a) având deleția reziduurilor în pozițiile 1...21 și
- (b) polipeptide conform revendicării (a), având secvența leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 26) în pozițiile 14...21, sau secvența acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 27) în pozițiile 18...21, sau secvența leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SEQ ID NO: 28) în pozițiile 18...21, sau secvența metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SEQ ID NO: 99) în pozițiile 2...21 sau secvența glicină-serină-prolină, în pozițiile 18...21.

55

## MD 2311 G2 2003.11.30

114

12. Polipeptidă OB conform uneia din rev. 3, 7, 8 sau 9, selectată din grupa ce include polipeptidele:
- (a) având deleția reziduurilor în pozițiile 1...21 și
- 5 (b) polipeptide conform revendicării (a), având metionina în poziția 21 sau secvența glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 38) în pozițiile 18...21, sau secvența metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 98) în pozițiile 1...21 sau secvența leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 26) în pozițiile 14...21, sau
- 10 secvența acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 27) în pozițiile 18...21, sau secvența leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SEQ ID NO: 28) în pozițiile 18...21, sau secvența metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SEQ ID NO: 99) în pozițiile 2...21, sau secvența glicină-serină-prolină în pozițiile 18...21.
13. Analog uman redus al polipeptidei OB, incluzând secvența aminoacidică SEQ ID NO: 2, 4, 5 sau 6,
- 15 selectat din grupa (conform numerotării din secvența SEQ ID NO : 4) incluzând polipeptidele în care:
- (a) cel puțin un reziduu în pozițiile 121...128 este omis,
- (b) reziduurile 1...116 sunt omise,
- (c) reziduurile 1...21 și 54...167 sunt omise,
- (d) reziduurile 1...60 și 117...167 sunt omise,
- 20 (e) reziduurile 1...60 sunt omise,
- (f) reziduurile 1...53 sunt omise,
- (g) analog al subgrupeii (a) în care reziduurile 1...21 sunt omise și
- (h) analog conform subgrupelor (a) – (g) având acidul N-terminal sau secvența de aminoacizi, selectată
- 25 din grupa, care include:
- (1) metionină,
- (2) secvența glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 38),
- (3) secvența metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-histidină-metionină (SEQ ID NO: 98),
- 30 (4) secvența leucină-acid glutamic-lizină-arginină-acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 26),
- (5) secvența acid glutamic-alanină-acid glutamic-alanină (SEQ ID NO: 27),
- (6) secvența leucină-acid glutamic-lizină-arginină (SEQ ID NO: 28),
- (7) secvența metionină-glicină-serină-serină-histidină-histidină-histidină-histidină-histidină-serină-serină-glicină-leucină-valină-prolină-arginină-glicină-serină-prolină (SEQ ID NO: 99) și
- 35 (8) secvența glicină-serină-prolină.
14. Moleculă de acid nucleic izolată, care codifică polipeptida OB conform uneia din revendicările 1...13.
15. Moleculă de ADN utilizată în asigurarea expresiei polipeptidei OB, având activitatea biologică care modulează greutatea animalelor, selectată dintr-o grupă care include:
- (a) moleculele ADN definite în secvențele SEQ ID NO: 1 și 3,
- 40 (b) molecule ADN hibridizabile cu moleculele ADN definite conform (a) și
- (c) moleculele ADN care dirijează exprimarea secvenței de aminoacizi codificate de oricare dintre moleculele de ADN menționate.
16. Moleculă de acid nucleic marcată detectabil hibridizabilă cu molecule ADN conform revendicării 14 sau 15.
- 45 17. Vector, care cuprinde o moleculă de ADN selectată dintr-o grupă, care include:
- (a) o moleculă de acid nucleic conform revendicării 14 și
- (b) o moleculă de acid nucleic conform revendicării 14 legată funcțional cu secvența care controlează expresia.
18. Vector, care cuprinde o moleculă de ADN selectată dintr-o grupă, care include:
- 50 (a) o moleculă de ADN conform revendicării 15 și
- (b) o moleculă de ADN conform revendicării 15 legată funcțional cu secvența care controlează expresia.

## MD 2311 G2 2003.11.30

115

19. Anticorp monoclonal, specific față de polipeptida OB conform oricărei din revendicările 1...9 sau 13, sau un fragment al acestuia legand antigenul.
- 5 20. Anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia legând antigenul, conform revendicării 19, marcat cu marcarea detectabilă.
21. Anticorp policlonal, specific față de polipeptida OB conform oricărei din revendicările 1...9 sau 13, sau un fragment al acestuia legand antigenul.
22. Anticorp policlonal sau un fragment al acestuia legând antigenul, conform revendicării 21, marcat cu marcarea detectabilă.
- 10 23. Compoziție farmaceutică pentru reducerea greutateii corporale a animalelor, conținând o substanță activă și un purtător farmaceutic acceptabil, **caracterizată prin aceea** că în calitate de substanță activă aceasta conține polipeptida OB conform uneia din revendicările 1...9 sau 13 într-o cantitate eficientă.
- 15

### (56) Referințe bibliografice:

1. EP 0 566 410 A2 1993.10.20

**Șef Secție:**

GUȘAN Ala

**Examinator:**

BANTAȘ Valentina

**Redactor:**

UNGUREANU Mihail

# MD 2311 G2 2003.11.30

116

GGATCCCTGCTCCAGCAGCTGCAAGGTGCAAGAAGAAGAAGATCCCAGGGAGGAAAATGTG	61
<u>M C</u>	2
CTGGAGACCCTGTGTGCGGTTCTGTGGCTTTGGTCCTATCTGTCTTATGTTCAAGCAGT	121
<u>W R P L C R F L W L W S Y L S Y V Q A V</u>	22
GCCTATCCAGAAAGTCCAGGATGACACCAAACCTCATCAAGACCATTGTCACCAGGAT	181
<u>P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I</u>	42
CAATGACATTTACACACGCGAGTCGGTATCCGCCAAGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTT	241
<u>N D I S H T Q S V S A K Q R V T G L D F</u>	62
CATTCTGGGCTTCAACCCATTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTA	301
<u>I P G L H P I L S L S K M D Q T L A V Y</u>	82
TCAACAGGTCCTCACCAGCCTGCCTTCCAAAATGTGCTGCAGATAGCCAATGACCTGGA	361
<u>Q Q V L T S L P S Q N V L Q I A N D L E</u>	102
GAATCTCCGAGACCTCCTCCATCTGTGGCCTTCTCCAAGAGCTGCTCCCTGCCTCAGAC	421
<u>N L R D L L H L L A F S K S C S L P Q T</u>	122
CAGTGGCCTGCAGAAGCCAGAGAGCCTGGATGGCGTCTGGAAGCCTCACTCTACTCCAC	481
<u>S G L Q K P E S L D G V L E A S L Y S T</u>	142

Fig. 1a

AGAGGTGGTGGCTTTGAGCAGGCTGCAGGGCTCTCTGCAGGACATTCTTCAACAGTTGGA	541
<u>E V V A L S R L Q G S L Q D I L Q Q L D</u>	162
TGTTAGCCCTGAATGCTGAAGTTTCAAAGGCCACCAGGCTCCCAAGAATCATGTAGAGGG	601
<u>V S P E C *</u>	167
AAGAAACCTTGGCTTCCAGGGGTCTTCAGGAGAAGAGAGCCATGTGCACACATCCATCAT	661
TCATTTCTCTCCCTCCTGTAGACCACCCATCCAAAGGCATGACTCCACAATGCTTGACTC	721
AAGTTATCCACACAATTCATGAGCACAAGGAGGGGCCAGCCTGCAGAGGGGACTCTCAC	781
CTAGTTCTTCAGCAAGTAGAGATAAGAGCCATCCCATCCCCTCCATGTCCCACCTGCTCC	841
GGGTACATGTTCTCCGTGGGTACACGCTTCGCTGCGGCCAGGAGAGGTGAGGTAGGGA	901
TGGGTAGACCTTTGGGCTGTCTCAGAGTCTTTGGGAGCACCGTGAAGGCTGCATCCACA	961
CACAGCTGAAACTCCCAAGCAGCACACGATGGAAGCACTTATTTATTTATTCTGCATTCT	1021
TATTTTGGATGGATCTGAAGCAAGGCATCAGCTTTTTCAGGCTTTGGGGTTCAGCCAGGA	1081
TGAGGAAGGCTCCTGGGGTGTGCTTTCAATCCTATTGATGGGTCTGCCGAGGCAAACC	1142

Fig. 1b

## MD 2311 G2 2003.11.30

117

TAATTTTTGAGTGACTGGAAGGAAGGTTGGGATCTTCAAACAAGAGTCTATGCAGGTAG 1201  
CGCTCAAGATTGACCTCTGGTGACTGGTTTTGTTTCTATTGTGACTGACTCTATCCAAAC 1261  
ACGTTTGCAGCGGCATTGCCGGGAGCATAGGCTAGGTTATTATCAAAGCAGATGAATTT 1321  
TGTC AAGTGAATATGTATCTATGTGCACCTGAGGGTAGAGGATGTGTTAGAGGGAGGGT 1381  
GAAGGATCCGGAAGTGTCTCTGAATTACATATGTGTGGTAGGCTTTTCTGAAAAGGGTGA 1441  
GGCATTTTCTTACCTCTGTGGCCACATAGTGTGGCTTTGTGAAAAGGACAAAGGAGTTGA 1501  
CTCTTTCCGGAACATTTGGAGTGAC CAGGCACCCTTGGAGGGGCTAAAGCTACAGGCCT 1561  
TTTGTGGCATATTGCTGAGCTCAGGGAGTGAGGGCCCCACATTTGAGACAGTGAGCCCC 1621  
AAGAAAAGGGTCCCTGGTGTAGATCTCCAAGTTGTCCAGGGTTGATCTCACAATGCGTT 1681  
TCTTAAGCAGGTAGACGTTTGCATGCCAATATGTGGTTCTCATCTGATTGGTTCATCCAA 1741  
AGTAGAACCTGTCTCCACCATTCTGTGGGGAGTTTTGTTCCAGTGGGAATGAGAAAT 1801  
CACTTAGCAGATGGTCTGAGCCCTGGGCCAGCACTGCTGAGGAAGTGCCAGGGCCCCAG 1861

Fig. 1c

GCCAGGCTGCCAGAATTGCCCTTCGGGCTGGAGGATGAACAAAGGGGCTTGGGTTTTTCC 1921  
ATCACCCCTGCACCCTATGTACCATCAAACCTGGGGGGCAGATCAGTGAGAGGACACTTG 1981  
ATGGAAAGCAATACACTTTAAGACTGAGCACAGTTTCGTGCTCAGCTCTGTCTGGTGCTG 2041  
TGAGCTAGAGAAGCTCACCACATACATATAAAAATCAGAGGCTCATGTCCCTGTGGTTAG 2101  
ACCCTACTCGCGCGGTGTACTCCACCACAGCAGCACCGCACCCTGGAAGTACAGTGCT 2161  
GTCTTCAACAGGTGTGAAAGAACCTGAGCTGAGGGTGACAGTGCCAGGGGAACCCTGCT 2221  
TGCAGTCTATTGCATTTACATACCGCATTT CAGGGCACATTAGCATCCACTCCTATGGTA 2281  
GCACACTGTTGACAATAGGACAAGGGATAGGGGTTGACTATCCCTTATCCAAAATGCTTG 2341  
GGACTAGAAGAGTTTTGGATTTTAGAGTCTTTTCAGGCATAGGTATATTTGAGTATATAT 2401  
AAAATGAGATATCTTGGGGATGGGGCCCAAGTATAAACATGAAGTTCATTTATATTTTAT 2461  
AATACCGTATAGACACTGCTTGAAGTGTAGTTTTATACAGTGTTTTAAATAACGTTGTAT 2521  
GCATGAAAGACGTTTTTACAGCATGAACCTGTCTACTCATGCCAGCACTCAAAAACCTTG 2581

Fig. 1d

GGGTTTTGGAGCAGTTTGGATCTTGGGTTTTCTGTTAAGAGATGGTTAGCTTATACCTAA 2641  
AACCATAATGGCAAACAGGCTGCAGGACCAGACTGGATCCTCAGCCCTGAAGTGTGCCCT 2701  
TCCAGCCAGGTCATACCCTGTGGAGGTGAGCGGGATCAGGTTTTGTGGTGCTAAGAGAGG 2761  
AGTTGGAGGTAGATTTTGGAGGATCTGAGGGC 2821

Fig. 1e

## MD 2311 G2 2003.11.30

118

```

---G--GTTG CAAGGCCAA GAAGCCA-- -TCCTGGAA GGAAAATGCA   50
TTGGGAACC CTGTGCGGAT TCTTGTGGCT TTGGCCCTAT CTTTCTATG   100
TCCAAGCTGT GCCCATCAA AAAGTCCAAG ATGACACCAA AACCCATC   150
AAGACAATTG TCACCAGGAT CAATGACATT TCACACACGC AGTCAGTCTC   200
CTCCAAACAG AAAGTACCG GTTTGGACTT CATTCTGGG CTCCACCCCA   250
TCCTGACCTT ATCCAAGATG GACCAGACAC TGGCAGTCTA CCAACAGATC   300
CTCACCAGTA TGCCTTCCAG AAACGTGATC CAAATATCCA ACGACCTGGA   350
GAACCTCCGG GATCTTCTC ACGTGCTGGC CTTCTCTAAG AGCTGCCACT   400
TGCCCTGGGC CAGTGGCCTG GAGACCTGG ACAGCCTGGG GGGTGTCTG   450
GAAGCTTCAG GCTACTCCAC AGAGGTGGTG GCCCTGAGCA GGCTGCAGGG   500
GTCTCTGCAG GACATGCTGT GGCAGCTGGA CCTCAGCCCT GGGTGTGAG   550
  
```

Fig. 2a

```

GCCTTGAAGG TCACTCTTCC TGCAAGGACT -ACGTTAAGG GAAGGAACTC   600
TGGTTTCCAG GTATCTCCAG GATTGAAGAG CATTGCATGG ACACCCCTTA   650
TCCAGGACTC TGTCAAATTC CCTGACTCCT CTAAGCCACT CTTCAAAGG   700
  
```

Fig. 2b

```

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

Fig. 3

# MD 2311 G2 2003.11.30

119

```

MOUSE  MCWRPLCRFL WLWSYLSYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS 50
      * * * * *
HUMAN  MHWGTLCGFL WLWPLYFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS

MOUSE  VSAKQRTVGL DFIPGLHPIL SLSKMDOTLA VYQQVLTSLP SONVLIQIAND 100
      * * * * *
HUMAN  VSSKQKVTVGL DFIPGLHPIL TLSKMDOTLA VYQQILTSMPS SRNVLIQISND

MOUSE  LENLRDLLHL LAFSKSCSLP QTSGLQKPES LDGVLEASLY STEVVALSRL 150
      - * * * * *
HUMAN  LENLRDLLHV LAFSKSCHLP WASGLETLDS LGGVLEASGY STEVVALSRL

MOUSE  QGSLQDILQ LDVSPQC 167
      - * *
HUMAN  QGSLQDMLWQ LDLSPGC
    
```

Fig. 4

```

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

Fig. 5

# MD 2311 G2 2003.11.30

120

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

Fig. 6

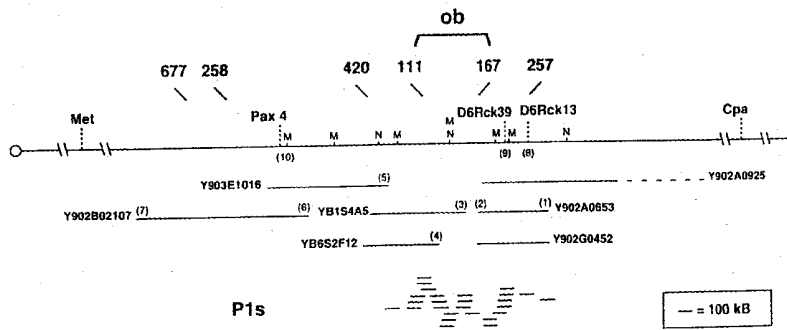


Fig. 7

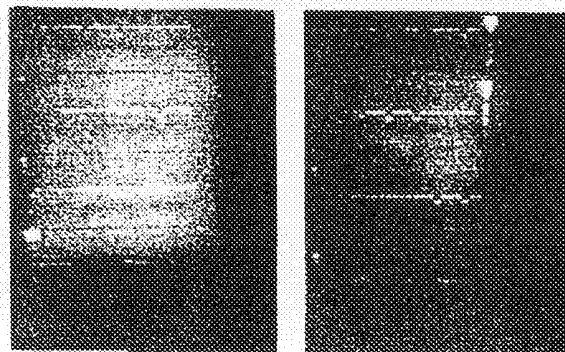


Fig. 8

MD 2311 G2 2003.11.30

121

1 2 3 4 5 6 7

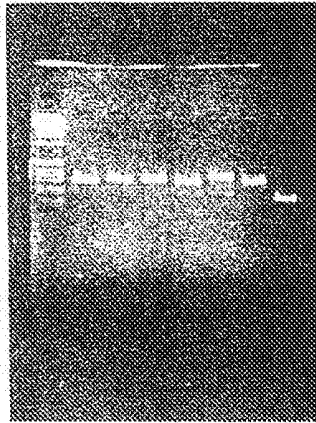


Fig. 9

```

+10      +20      +30      +40
GTGCAAGAAG AAGAAGATCC CAGGGCAGGA AAATGTGCTG GAGACCCCTG
-----
CACGTTCTTC TTCTTCTAGG GTCCCGTCCT TTTACACGAC CTCTGGGGAC

+10      +20      +30      +40
TGTCGGGTCC NGTGGNTTTG GTCCTATCTG TCTTATGTNC AAGCAGTGCC
-----
ACAGCCAGG NCACCNAAAC CAGGATAGAC AGAATACANG TTCGTACCGG

+10      +20      +30      +40
TATCCAGAAA GTCCAGGATG ACACCAAAG CCTCATCAAG ACCATTGTCA
-----
ATAGGTCTTT CAGGTCCTAC TGTGGTTTTC GGAGTAGTTC TGGTAACAGT

+10      +20      +30      +40
NCAGGATCAC TGANATTTCA CACACG
-----
NGTCCTAGTG ACTNTAAAGT GTGTGC
    
```

Fig. 10

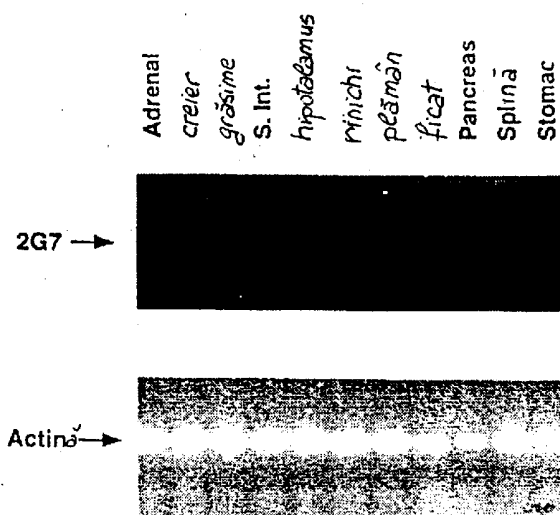


Fig. 11a

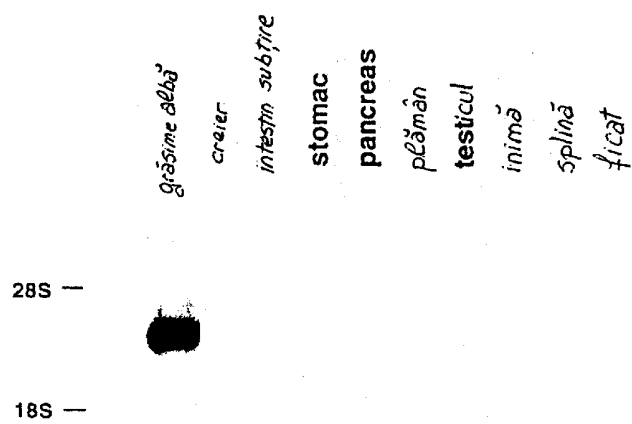


Fig. 11b

123



Fig. 12a

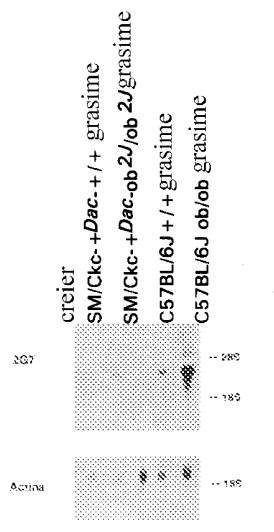


Fig. 12b

MD 2311 G2 2003.11.30

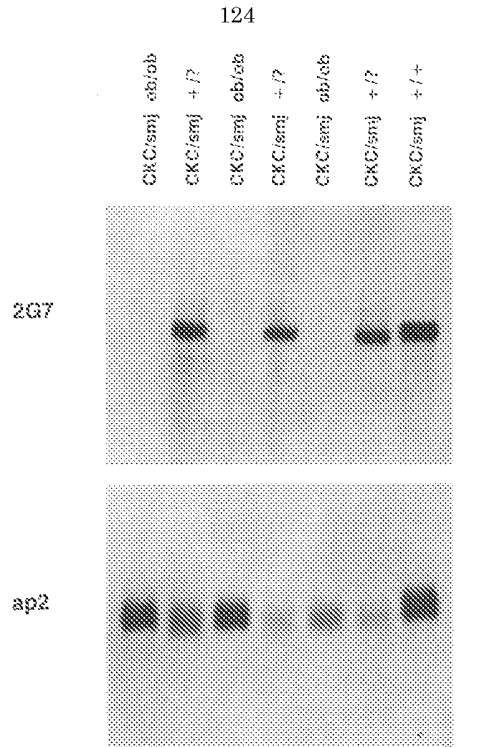


Fig. 13

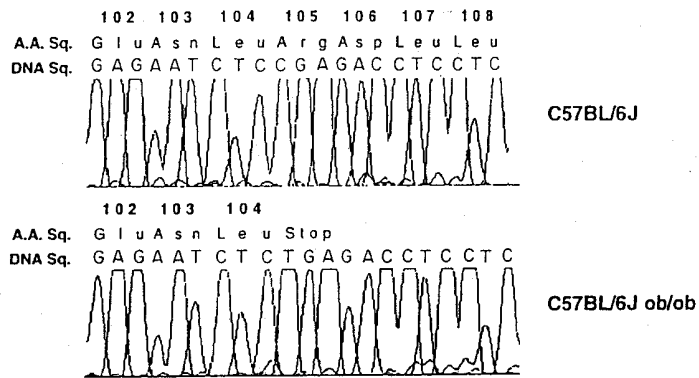


Fig. 14

# MD 2311 G2 2003.11.30

125

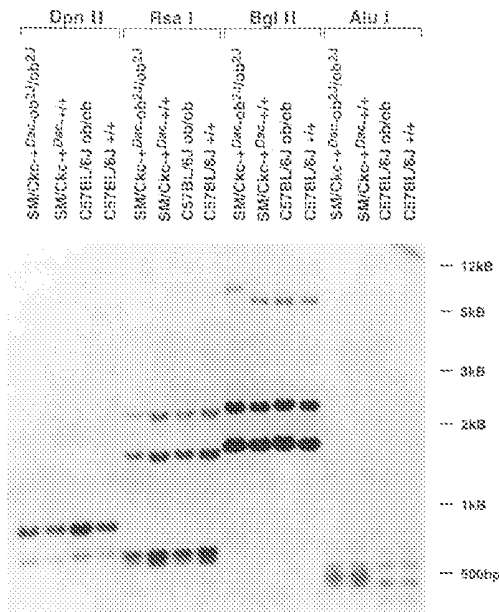


Fig. 15a

## BglIII Digestii

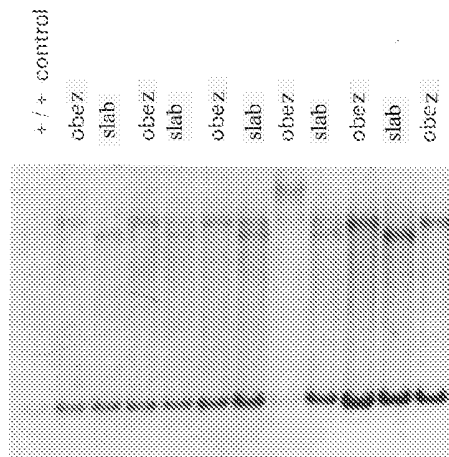


Fig. 15b

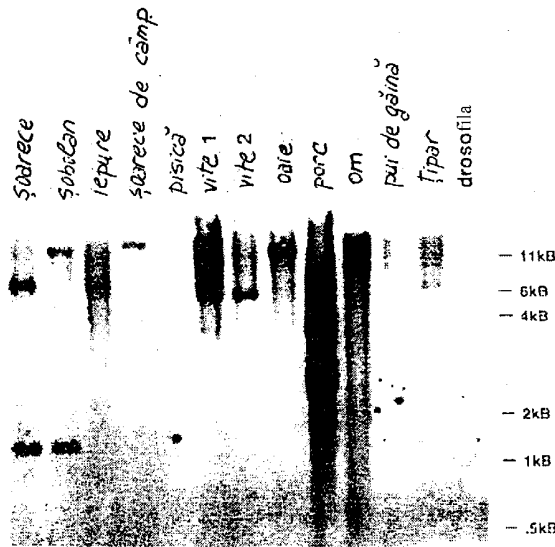


Fig. 16

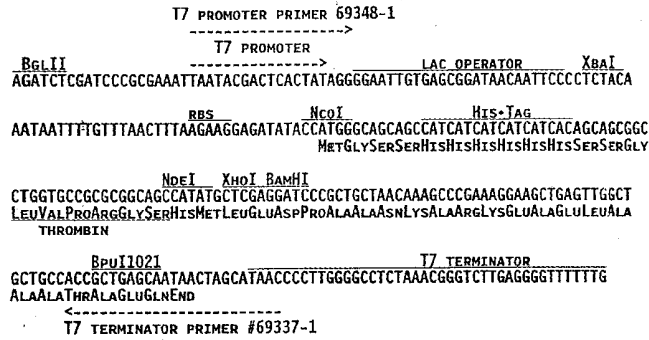


Fig. 17

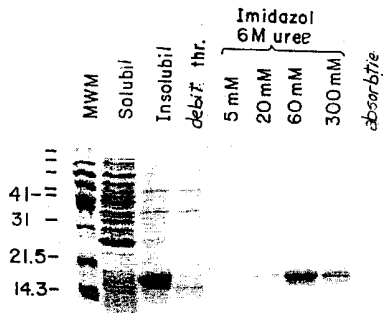


Fig. 18a

MD 2311 G2 2003.11.30

127

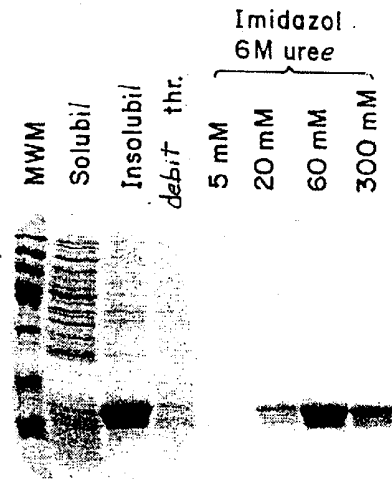


Fig. 18b

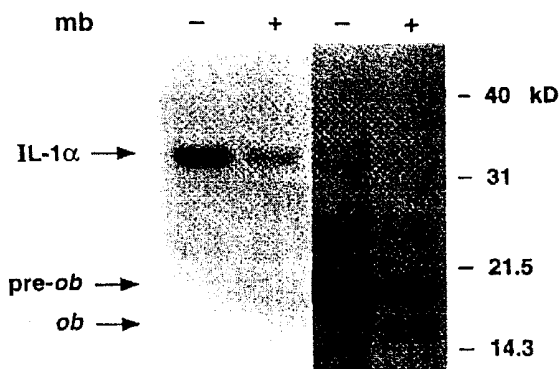


Fig. 19a

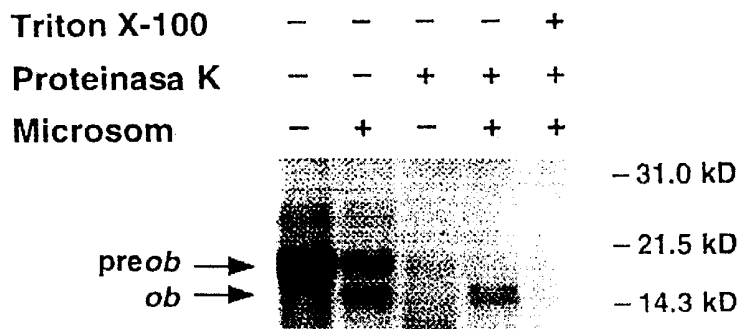


Fig. 19b

MD 2311 G2 2003.11.30

128

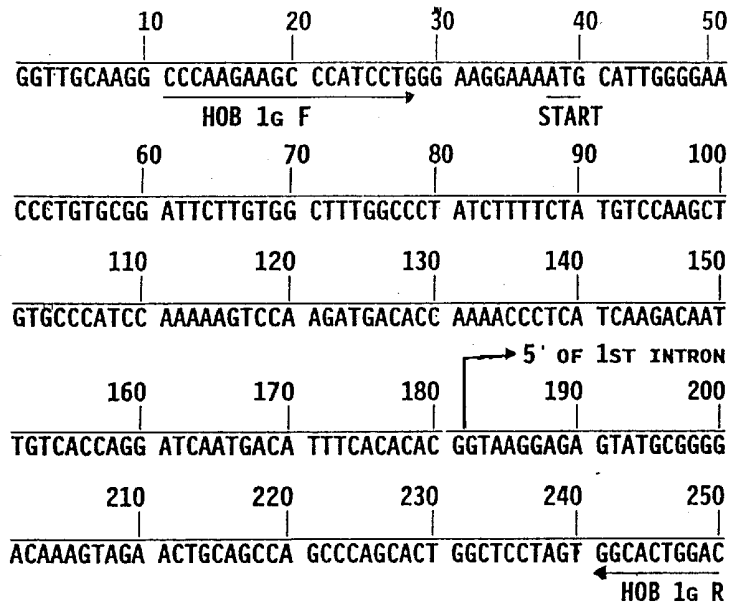


Fig. 20a

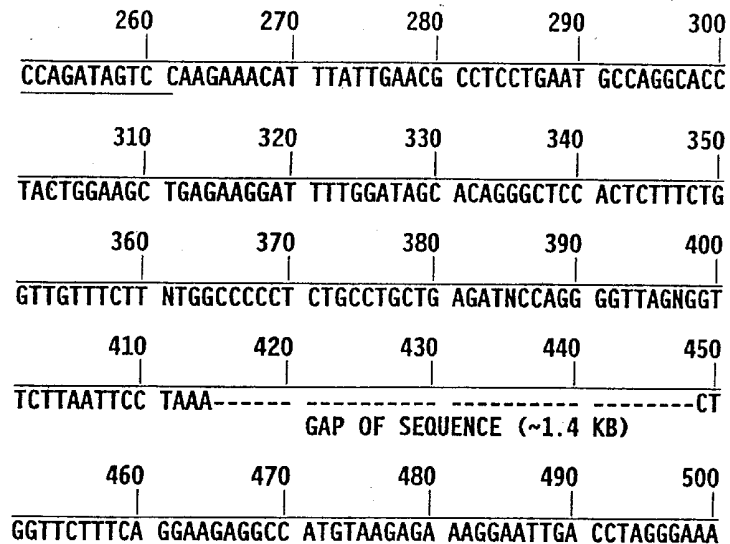


Fig. 20b

# MD 2311 G2 2003.11.30

129

510	520	530	540	550
ATTGGCCTGG	GAAGTGGAGG	GAACGGATGG	TGTGGGAAAA	GCAGGAATCT
560	570	580	590	600
CGGAGACCAG	CTTAGAGGCT	TGGCAGTCAC	CTGGGTGCAG	GANACAAGGG
610	620	630	640	650
CCTGAGCCAA	AGTGGTGAGG	GAGGGTGGAA	GGAGACAGCC	CAGAGAATGA
660	670	680	690	700
CCCTCCATGC	CCACGGGGAA	GGCAGAGGGC	TCTGAGAGCG	ATTCTCCCA
			3' OF 1ST INTRON ←	
710	720	730	740	750
CATGCTGAGC	ACTTGTTC	CCTCTTCCTC	CTNCATAGCA	GTCAGTCTCC
HOB 2g F →				

Fig. 20c

760	770	780	790	800
TCCAAACAGA	AAGTCACCGG	TTTGGACTTC	ATTCTGGGC	TCCACCCAT
810	820	830	840	850
CCTGACCTTA	TCCAAGATGG	ACCAGACACT	GGCAGTCTAC	CAACAGATCC
860	870	880	890	900
TCACCAAGTAT	GCCTTCCAGA	AACGTGATCC	AAATATCCAA	CGACCTGGAG
910	920	930	940	950
AACTCCGGG	ATCTTCTTCA	CGTGCTGGCC	TTCTTAAGA	GCTGCCACTT
960	970	980	990	1000
GCCCTGGGCC	AGTGGCCTGG	AGACCTTGG	CAGCCTGGGG	GGTGCCTGG

Fig. 20d



# MD 2311 G2 2003.11.30

131

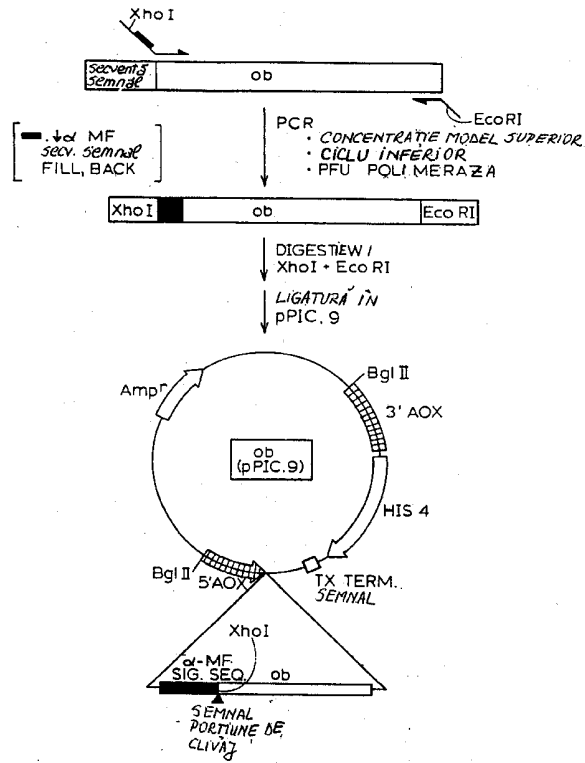


Fig. 21a

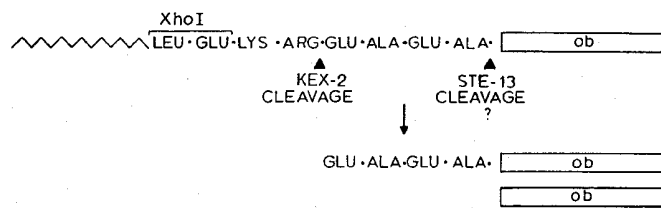


Fig. 21b

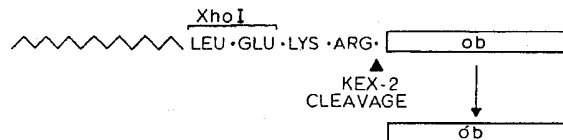


Fig. 21c

132

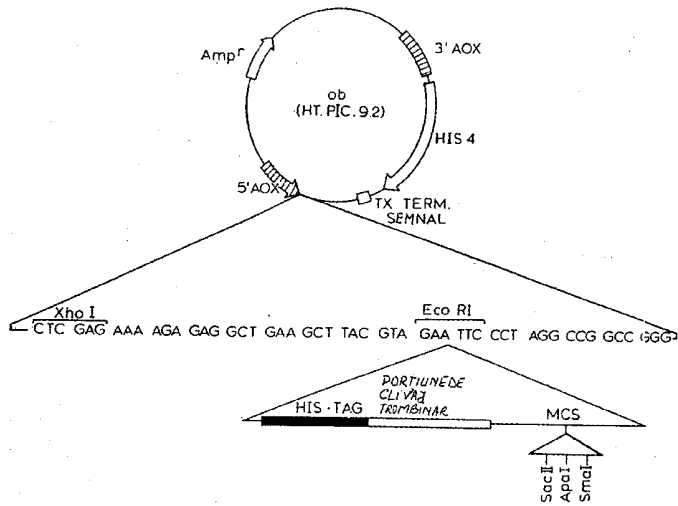


Fig. 22a

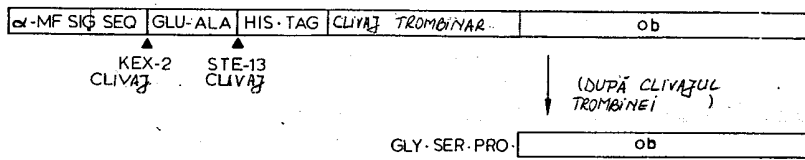


Fig. 22b

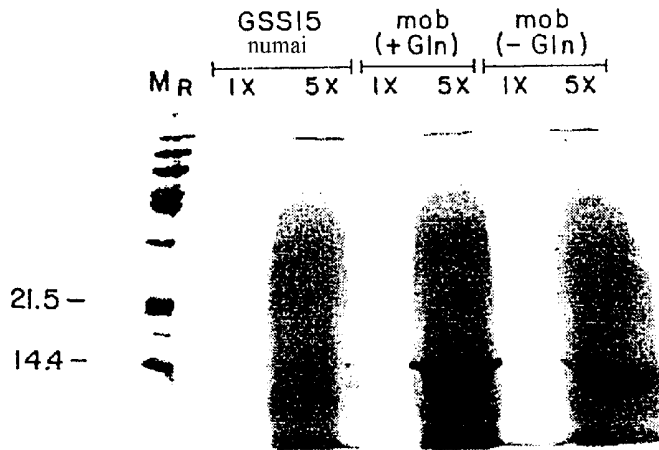


Fig. 23a

MD 2311 G2 2003.11.30

133

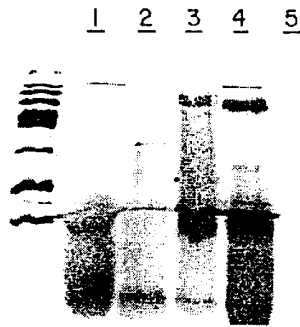


Fig. 23b

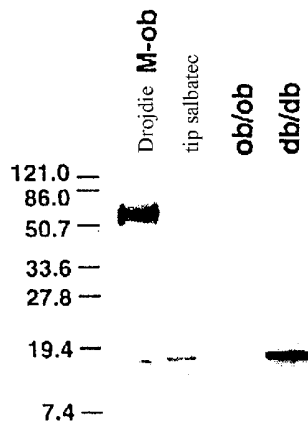


Fig. 24a

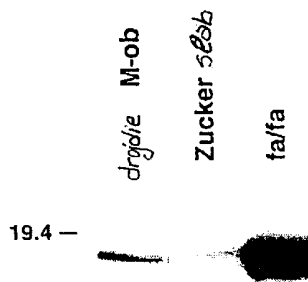


Fig. 24b

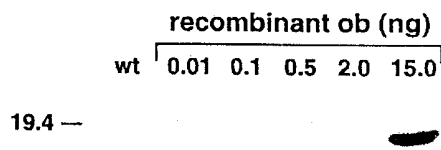


Fig. 24c

# MD 2311 G2 2003.11.30

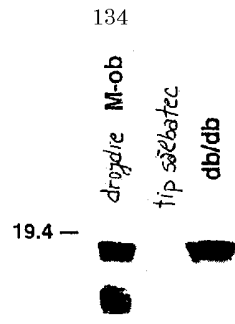


Fig. 24d

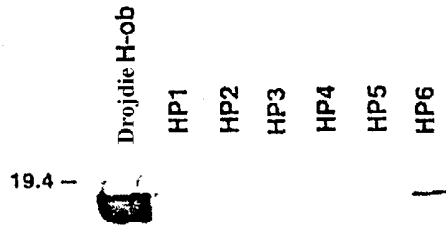


Fig. 25a

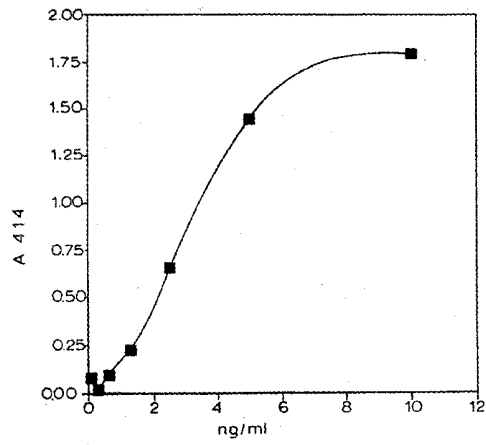


Fig. 25b

# MD 2311 G2 2003.11.30

135

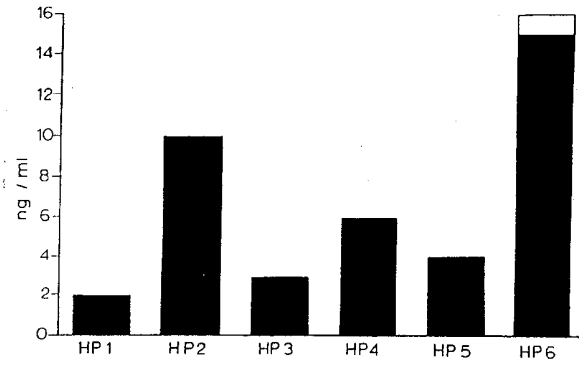


Fig. 25c

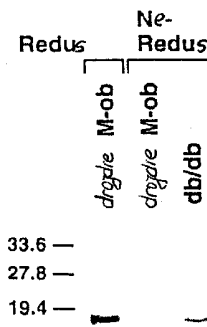
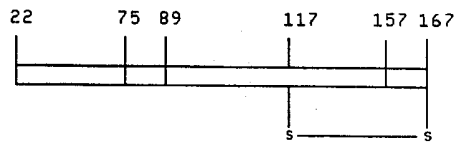


Fig. 26a

ob uman



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

Fig. 26b

# MD 2311 G2 2003.11.30

136

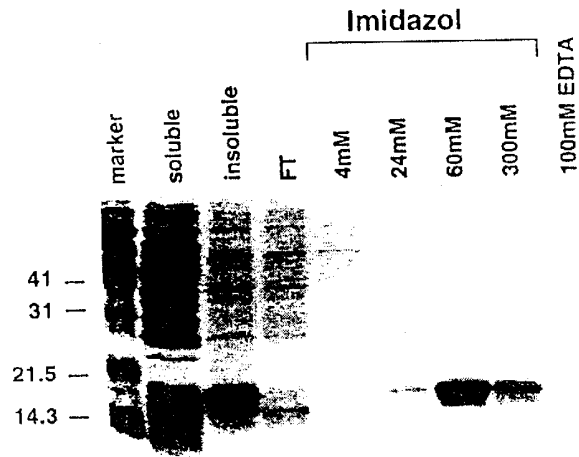


Fig. 27

ab/ab

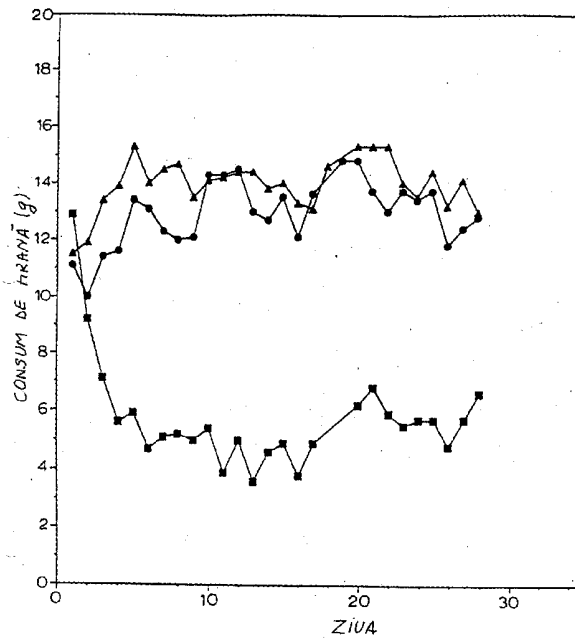


Fig. 28a

MD 2311 G2 2003.11.30

137

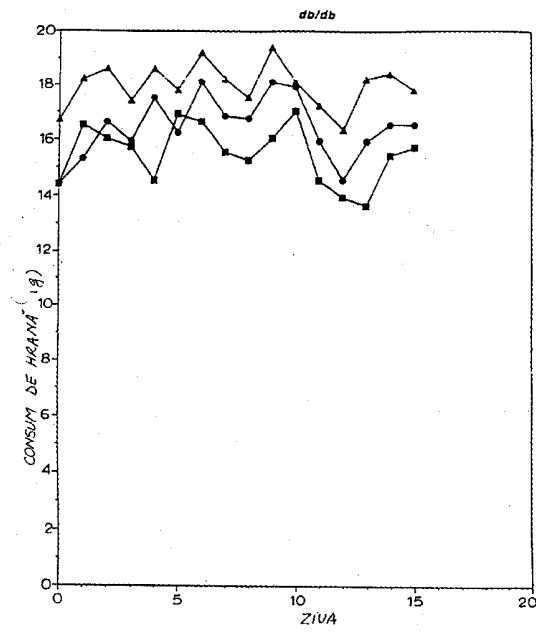


Fig. 28b

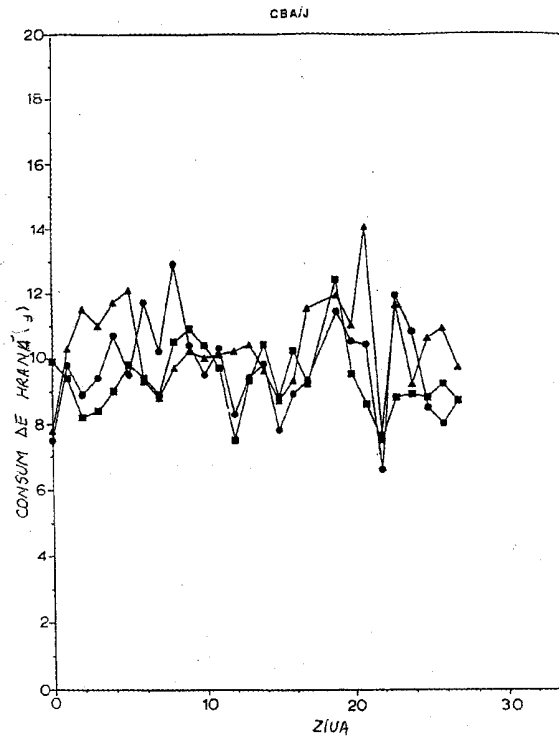


Fig. 28c

MD 2311 G2 2003.11.30

138

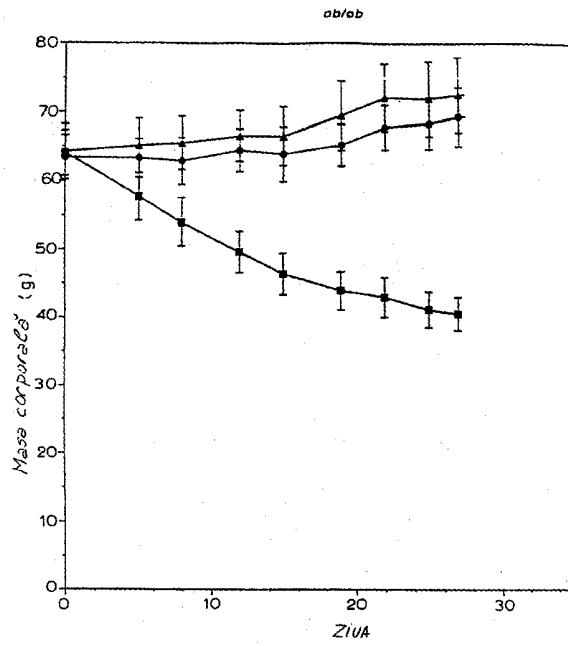


Fig. 28d

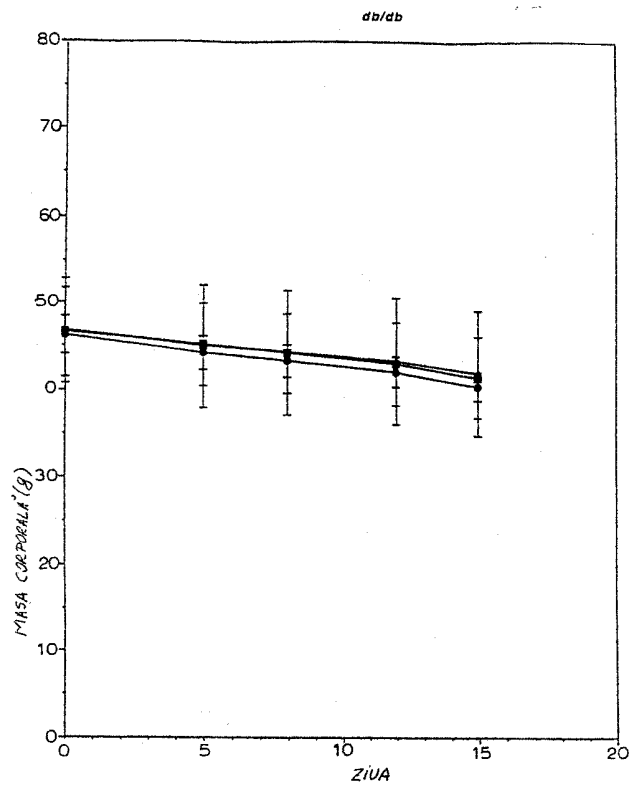


Fig. 28e

# MD 2311 G2 2003.11.30

139

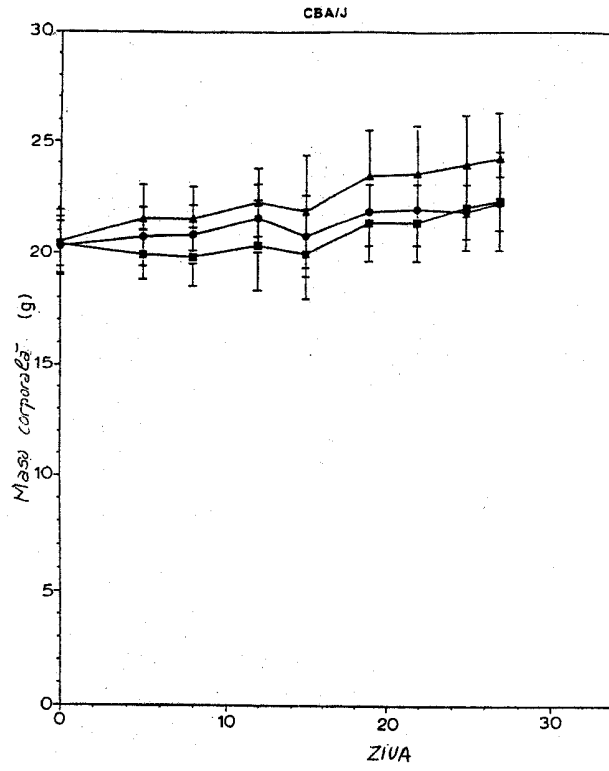


Fig. 28f

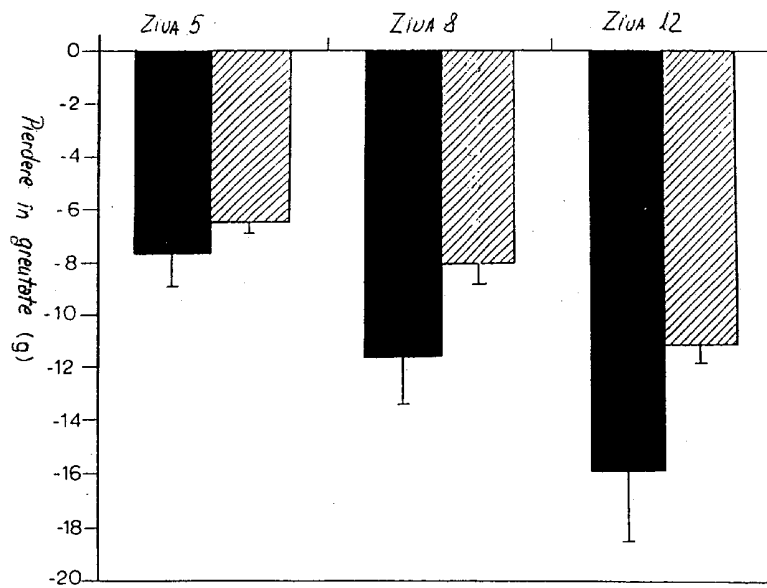


Fig. 29a



Fig. 29b

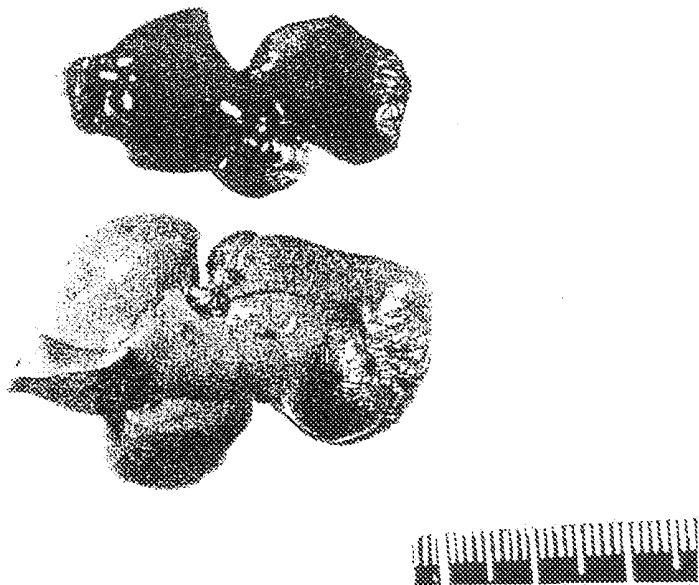


Fig. 29c

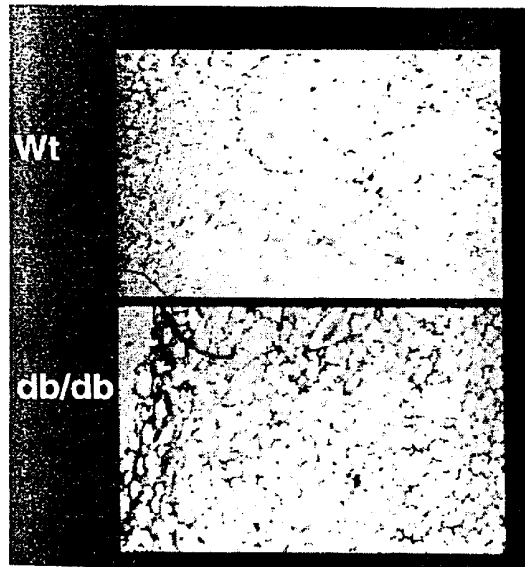


Fig. 30

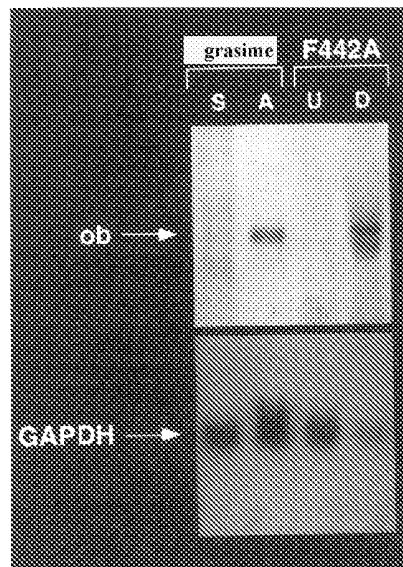


Fig. 31

MD 2311 G2 2003.11.30

142

1 2 3 4

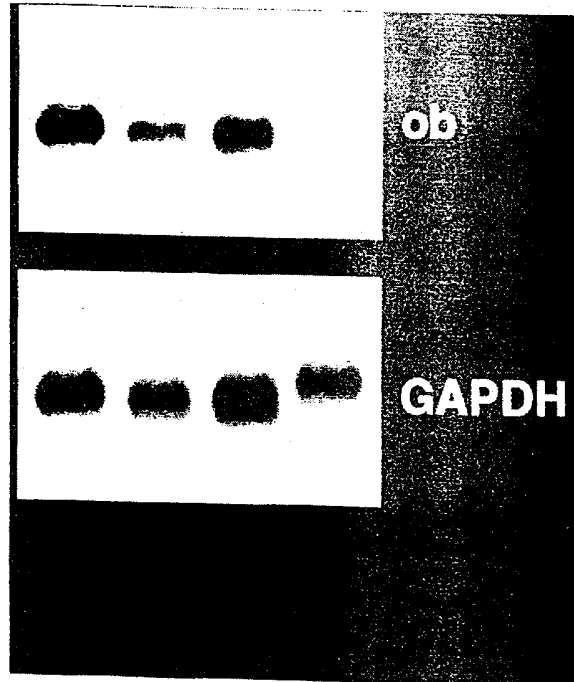


Fig. 32a

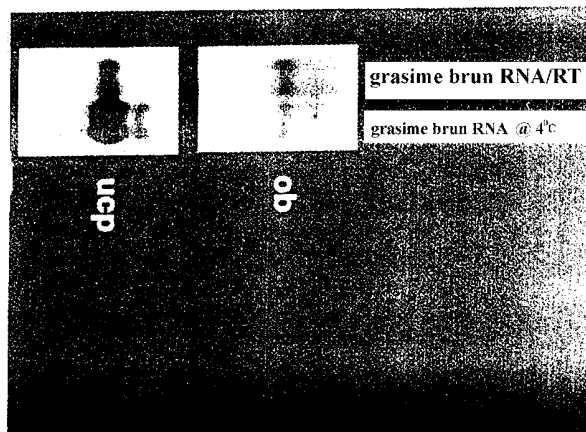


Fig. 32b

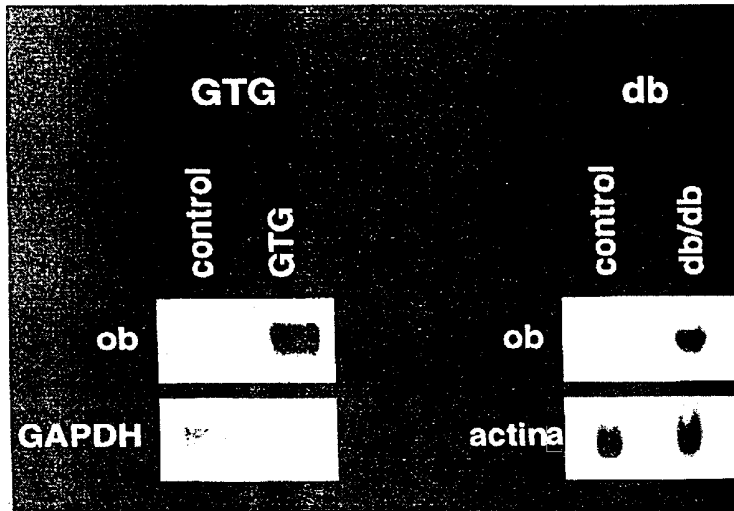


Fig. 33

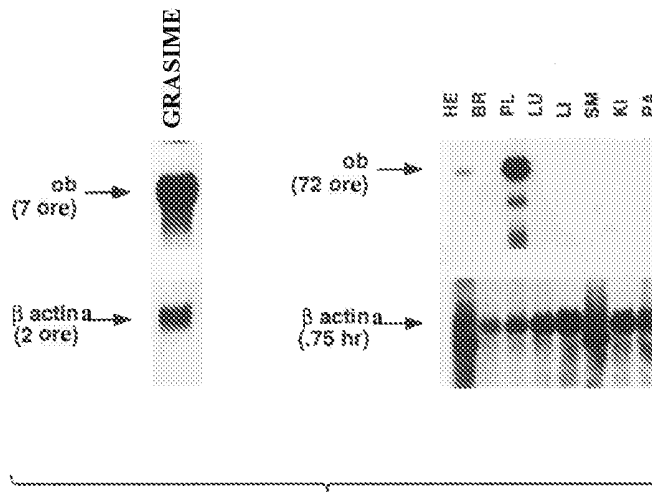


Fig. 34

# MD 2311 G2 2003.11.30

144

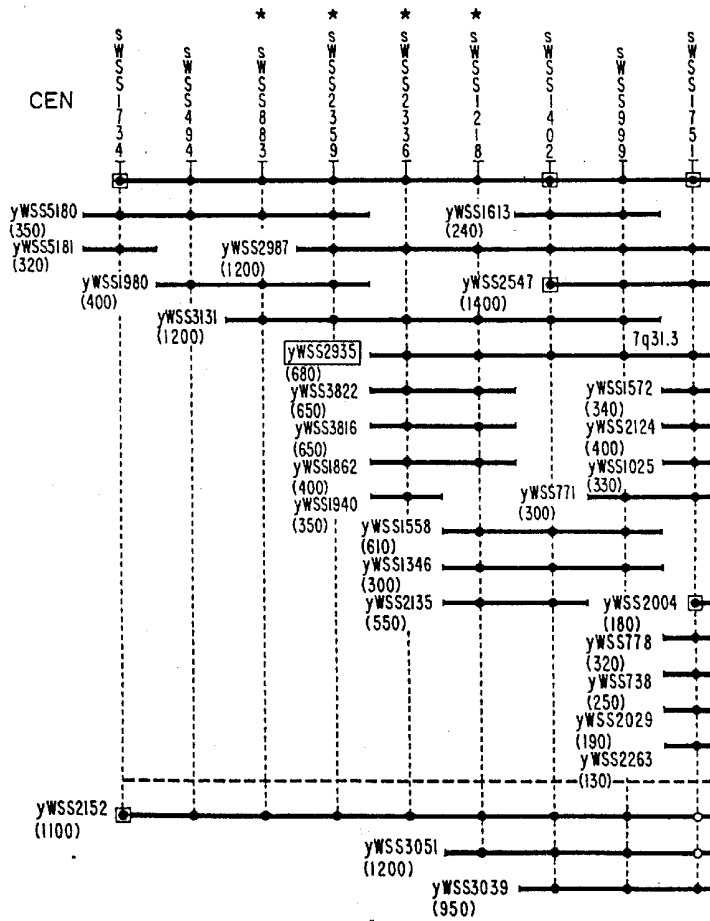


Fig. 35a

# MD 2311 G2 2003.11.30

145

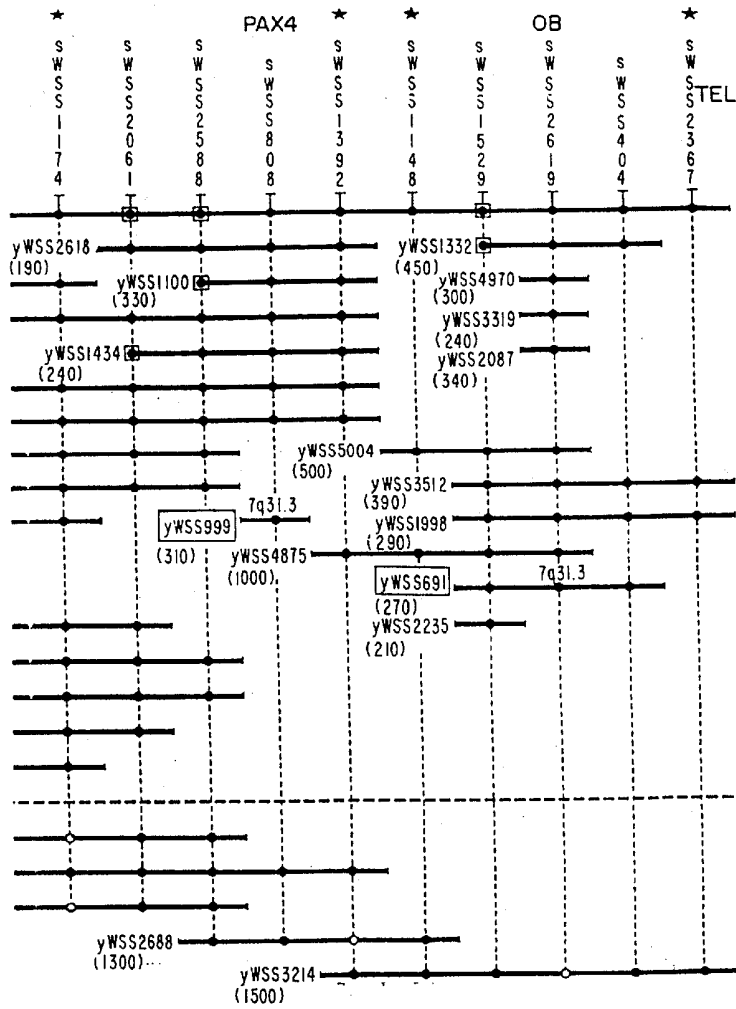


Fig. 35b

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 97-0100		(85) Data fazei naționale PCT: 1997.02.17
(22) Data depozit: 1995.08.17		(86) Cerere internațională PCT: PCT/US95/10479; 17.08.1995
<p>Prioritatea invocată :</p> <p>(31) nr.: 08/292,345; 08/347,563; 08/438,431; 08/483,211 32) data : 17.08.1994; 30.11.1994; 10.05.1995; 07.06.1995 33) țara :US</p> <p>(51)<sup>7</sup> : C 12 N 15/12; C 07 K 14/47; C 12 Q 1/68; C 12 N 5/10, 5/16; C 07 K 16/18; G 01 N 33/53; A 61 K 38/17, 7/00</p> <p>Alți indici de clasificare:</p> <p><b>Titlul</b> : Polipeptide de obezitate, fragment imunogen, analog, analog uman și analog uman redus, moleculă de acid nucleic izolată, moleculă de ADN, moleculă de acid nucleic marcată detectabil, vectori coținând molecula ADN, anticorp monoclonal, anticorp policlonal și compoziție farmaceutică pentru reducerea greutateii corporale a animalelor</p> <p>(71) Solicitantul : THE ROCKEFELLER UNIVERSITY, US</p> <p>Termeni caracteristici: Polipeptide de obezitate, fragment imunogen, analog, analog uman și analog uman redus, moleculă de acid nucleic izolată, moleculă de ADN, moleculă de acid nucleic marcată detectabil, vectori coținând molecula ADN, anticorp monoclonal, anticorp policlonal</p>		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
Int. Cl. <sup>7</sup> C 12 N 15/12; C 07 K 14/47; C 12 Q 1/68; C 12 N 5/10, 5/16; C 07 K 16/18; G 01 N 33/53; A 61 K 38/17, 7/00 (MD) 1993-2002 (EA) 1996-2002 SU (fond BRIT)		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A A	EP 0 566 410 A2 WO 9400558 A	
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
<b>* categoriile speciale ale documentelor consultate:</b>		<b>P</b> - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
<b>A</b> - document care definește statutul general al tehnicii		<b>T</b> - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
<b>E</b> - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		<b>X</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
<b>L</b> - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres ( se va indica motivul)		<b>Y</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
<b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		<b>&amp;</b> - document care face parte din aceeași familie de documente
Data efectuării de documentare: 2003.08.25		

Examinatorul

Bantaş Valentina

736 / FC / 05.0 / A / 3 / 1 /