



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

(21) 97000444

(22) 19950817

(85) 19970221

(46) 20060602, бюл. № 41

(31) 08/292,345, 08/347,563, 08/438,431, 08/483,211

(32) 17.08.1994, 30.11.1994, 10.05.1995, 07.06.1995

(33) US, US, US, US

(86) PCT/US1995/010479, 17.08.1995

(71) ДЗЕ РОКЕФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) ФРИДМЕН, Джеффри М. (US); ЗЕНГ, Ийинг (US); ПРОИНКА, Рикардо (US); МЕФФЕЙ, Маргерита (US); ХАЛЕС, Джеффри (US); ГЕЙДЖВЕЛА, Китен (US); БЭРЛЕЙ, Стифен, К. (US)

(73) ДЗЕ РОКЕФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ (US)

(54) МОДУЛЯТОРЫ ВЕСА ТЕЛА, СООТВЕТСТВУЮЩИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ПРОТЕИНЫ, А ТАКЖЕ ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

(57) Настоящее изобретение в целом относится к контролю массы тела животных, включая млекопитающих и человека, а именно к материалам, идентифицированным в настоящем описании в качестве модуляторов веса, и к диагностическим и терапевтическим применениям, в которые могут быть введены такие модуляторы. В своем самом широком аспекте настоящее изобретение относится к выявлению и открытию нуклеотидных последовательностей и белков, предположительно экспрессируемых такими нуклеотидами или их дегенерации, которые демонстрируют способность участвовать в контроле массы тела млекопитающего. Нуклеотидные последовательности в объекте представляют гены, соответствующие гену мышей ОВ мыши и человека, которые были постулированы для того, чтобы играть критическую роль в регуляции массы тела и ожирения. Предварительные данные, представленные в настоящем документе, показывают, что полипептидный продукт рассматриваемого гена функционирует как гормон. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот для применения в качестве молекулярных зондов или в качестве праймеров для амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР), те синтетических или природных олигонуклеотидов. В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает клонирующий вектор, который содержит нуклеиновые кислоты по изобретению; и экспрессирующий вектор бактерий, насекомых или млекопитающих, который содержит молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, функционально связанные с последовательностью контроля экспрессии. Соответственно, изобретение дополнительно относится к клетке бактерии или млекопитающего, трансфицированной или трансформированной соответствующим вектором экспрессии, и, соответственно, к применению указанных конструкций при получении модуляторов по изобретению. Также предложены анти-тела к полипептиду ОВ. Кроме того, предложен способ модулирования массы тела млекопита-

ющего. В конкретных примерах представлены гены, кодирующие две изоформы обоих полипептидов ОВ мыши и человека.

Настоящее изобретение относится к генетическому контролю массы тела млекопитающих, включая животных и людей, и, более конкретно, к материалам, идентифицированным в настоящем документе как модуляторы веса, и к диагностическим и терапевтическим применениям, к которым могут быть введены такие модуляторы.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ожирение, определенное как избыток жира тела относительно массы обедненного тела, ассоциируется с важными психологическими и медицинскими морбидиями, которые включают гипертензию, повышенные липиды крови и тип II или инсулинозависимый сахарный диабет (NIDDM). Существует 6-10 миллионов индивидуумов с NIDDM в США, включая 18% популяции в возрасте 65 лет [Harris et al. *Int. J. Obes.*, 11: 275-283(1987)]. Приблизительно 45% самцов и 70% самок с NIDDM являются ожирением, и их диабет по существу улучшен или устранен посредством снижения веса [Harris, *Diabetes Care*, 14 (3): 639-648 (1991)]. Как описано ниже, как ожирение, так и NIDDM сильно живутся, хотя предрасполагающие гены не были идентифицированы. Молекулярно-генетическая основа этих метаболически связанных нарушений является важной, плохо понятой проблемой.

Ассимиляция, хранение и использование питательной энергии составляют комплексную гомеостатическую систему, центральную по отношению к выживаемости метаданных. Среди млекопитающих, обитающих сушь, хранение в жировой ткани больших количеств метаболического топлива в виде триглицеридов является критичным для выживших периодов лишения пищи. Необходимость поддержания фиксированного уровня накопителей энергии без непрерывных изменений размера и формы организма требует достижения баланса между потреблением энергии и расходом. Однако молекулярные механизмы, которые регулируют энергетический баланс, остаются выявленными. Выделение молекул, которые трансдуцируют питательную информацию и баланс энергии управления, будет критичным для понимания регулирования массы тела в здоровье и заболевании.

Уровень ожирения индивидууму в значительной степени генетически определен. Исследование нормотантных показателей массы тела и ожирения среди моно-и диктровых двойников или АДОН и их биологических родителей позволило предположить, что наследственность ожирения (0,4-0,8) превышает таковую у многих других признаков, обычно считающихся значительным генетическим компонентом, таким как шизофрения, алкоголизм и атеросклероз [Трюк et al. *N Engl. J. Med.*, 322: 1483-1487(1990)]. Также сообщалось о семейном сходстве скоростей энергозатрат [Bogardus et al. *Diabetes*, 35: 1-5 (1986)]. Генетический анализ в географически разграниченных популяциях предполагает, что относительно небольшое количество генов может учитывать 30 -50% дисперсии в композиции тела [Moll et al. *Am. J. Hum. Genet.*, 49: 1243-1255(1991)]. Однако ни один из генов, ответственных за ожирение в общей популяции, не был генетически отображен в определенное хромосомное место.

Модели ожирения грызунов включают семь, по-видимому, одногенных мутаций. Наиболее интенсивно исследованными мутациями с ожирением мыши являются ob (ожирение) и db

гены (диабет). При наличии на одном и том же генетическом штамме фон, ob и db приводят к неразличимым метаболическим и поведенческим фенотипам, что позволяет предположить, что эти гены могут функционировать в одном и том же физиологическом пути [Coleman et al. *Diabetologia*, 14: 141-148 (1978)]. Мыши, гомозиготные по мутации, представляют собой гиперфагическую и гипометаболическую, что приводит к фенотипу ожирения, который отличается в возрасте одного месяца. Вес этих животных имеет тенденцию

к стабилизации при 60-70 г (по сравнению с 30-35 г у контрольных мышей), животные ob и db проявляют множество других гормональных и метаболических изменений, которые затрудняют идентификацию первичного дефекта, связанного с мутацией [Bray et al. *Am. J Clin. Nutr.*, 50: 891-902(1989)].

Каждая из моделей ожирения грызунов сопровождается изменениями углеводного обмена, напоминающими сахарный диабет у человека. В некоторых случаях тяжесть диабета частично зависит от фонового штамма мыши [Leiter, *Endocrinology*, 124: 912-922 (1989)]. Для как ob, так и db у мышам линии C57BL/Ks у мышей линии C57BL/Ks развивается тяжелый диабет с предельным некрозом β -клеток и атрофией островков, что приводит к относительной инсулинотерапии. И наоборот, мышам линии C57BL/6J ob и db у мышей линии C57BL/6J развивается переходный инсулинрезистентный диабет, который в конечном итоге компенсируется гипертрофией β -клеток, сходной с диабетом II типа.

Фенотип мышей ob и db напоминает ожирение человека способами, отличными от развития диабета-мутантных мышей, есть больше и затрагивает меньше энергии, чем у бедных контролей (как у людей с ожирением). Этот фенотип также довольно похож на то, что наблюдается у животных с повреждениями вентримедиального гипоталамуса, что предполагает, что обе мутации могут мешать способности надлежащим образом интегрировать или реагировать на питательную информацию в центральной нервной системе. Поддержка этой гипотезы исходит из результатов экспериментов парабриоза [Coleman, *Diabetologia*, 9: 294-298 (1973)], что предполагает, что мышам не хватает циркулирующего фактора насыщения, и что мышей db устойчивы к эффектам фактора ob (возможно, из-за дефекта рецептора ob). Эти эксперименты привели к выводу о том, что ожирение у этих мутантных мышей может быть результатом различных дефектов в афферентной петле и/или интегративном центре открывающегося механизма обратной связи, который контролирует состав тела.

Используя молекулярные и классические генетические маркеры, гены ob и db картировались на проксимальную хромосому 6 и среднюю хромосому 4, соответственно [Bahary et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87: 8642-8646 (1990); Friedman et al. *Genomics*, 11: 1054-1062 (1991)]. В обоих случаях мутации отображаются в области генома мыши, которые являются синтенными у человека, что позволяет предположить, что, если имеются гомологи человека ob и db, они, вероятно, будут картироваться, соответственно, с хромосомами 7q и 1p человека. Дефекты в гене db могут привести к ожирению у других видов млекопитающих: при генетических скрещиваниях между крысами Zucker fa/fa и Brown Norway +/+ крыс, мутация/ α -мутация (крысиная хромосома 5) фланкируется теми же локусами, которые фланкируют db у мыши [Truett et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7806-7809 (1991)].

Из-за множества факторов, которые, по-видимому, влияют на массу тела, невозможно предсказать, какие факторы и, более конкретно, какие гомеостатические механизмы, главным образом, определяют массу тела. Таким образом, основная проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, состоит в обеспечении модуляторов массы тела, которые позволяют контролировать ожирение и содержание жира млекопитающих.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с настоящим изобретением проблема контроля ожирения и содержания жира животных, в частности млекопитающих, была решена посредством обеспечения полипептидов ожирения (ОВ) и молекул нуклеиновых кислот, кодирующих эти полипептиды, как описано в настоящем документе. Настоящее изобретение обеспечивает впервые выделенные полипептиды, полезные для модуляции, те контроля и регуляции, массы тела и ожирения, а также последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие такие полипептиды, которые не только позволяют рекомбинантному продуцированию полипептидов ОВ, но сами по себе полезны в модуляции массы тела.

Полипептиды ожирения (ОВ) по настоящему изобретению имеют от приблизительно 145 до приблизительно 167 аминокислот, способны модулировать массу тела животного, в частности млекопитающего, и включают аллельные варианты или аналоги, включая их

фрагменты, обладающие одинаковой биологической активностью. Полипептиды могут быть получены рекомбинантными или химическими способами синтеза. В настоящее время предпочтительные полипептиды ОВ включают те, которые имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4, 5 или 6, или аллельные варианты или аналоги, включая их фрагменты.

Иммуногенные фрагменты полипептидов ОВ по изобретению включают: 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); и Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys (SEQ ID NO: 21).

Аналоги полипептида ОВ человека включают те, которые имеют аминокислотные последовательности человека SEQ ID NO: 4 и 6, где одна или более аминокислот 53,56,71, 85,89,92, 95,98,110, 118,121,122, 126,127,128, 129,132,139, 157, 159, 163 и 166 (в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 4) замещены другой аминокислотой, такой как расходящаяся аминокислота полипептида ОВ мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, или аланином. Такие аналоги также включают те, в которых: (а) остаток серина в положении 53 замещен глицином, аланином, валином, цистеином, метионином или треонином; (b) остаток серина в положении 98 замещен глицином, аланином, валином, цистеином, метионином или треонином; и (с) остаток аргинина в положении 92 позиции замещен аспарагином, лизином, гистидином, глутамином, глутаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой, серином, треонином, метионином или цистеином. Аналог полипептида ОВ по изобретению предпочтительно имеет 83% или более гомологию аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью полипептида ОВ человека, установленной в SEQ ID NO: 2, 4, 5 или 6.

Дополнительные аналоги полипептида ОВ человека по изобретению имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и 6 и имеют: (а) один или несколько остатков аспарагиновой кислоты, замещенных глутаминовой кислотой; (b) один или более остатков изолейцина, замещенных лейцином; (с) один или более остатков глицина или валина, замещенных аланином; (d) один или более остатков аргинина, замещенных гистидином; (е) один или более остатков тирозина или фенилаланина, замещенных триптофаном; (f) один или более из остатков 121-128 (в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 4), замещенных глицином или аланином; и (g) один или более остатков в положениях 54-60 или 118-166 (в соответствии с числом SEQ ID NO: 4), замещенных лизином, глутаминовой кислотой, цистеином или пролином.

В настоящее время предпочтительные усеченные аналоги полипептида ОВ человека в соответствии с изобретением включают те, в которых (в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 4): (а) удаляют один или более остатков в положениях 121-128; (b) удаляют остатки 1-116; (с) удаляют остатки 1-21 и 54-167; (d) удаляют остатки 1-60 и 117-167; (е) удаляют остатки 1-60; (f) удаляют 1-53; и (g) аналог подчасти (а), в которой удаляют остатки 1-21. Полипептиды ОВ и аналоги полипептида по изобретению, у которых отсутствует последовательность сигнала "сигнал" 21 аминокислоты {е. г. аминокислоты с 1 по 21 SEQ ID NO: 4) может иметь N-концевую аминокислотную или аминокислотную последовательность, такую как (1) метионин, (2) последовательность глицин-серин-гистидин-метионин (SEQ ID NO: 38), (3) метионин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-серин-глицин-лейцин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-гистидин-метиониновая последовательность (SEQ ID NO: 98), (4) последовательность лейцин-глутаминовая кислота-лизин-аргинин-глутаминовая кислота-аланин-глутаминовая кислота-аланин (SEQ ID NO: 26), (5) последовательность глутаминовой кислоты-аланин-глутаминовой кислоты-аланина (SEQ ID NO: 27), (6) последовательность лейцин-глутаминовая кислота-лизин-аргинин (SEQ ID NO: 28); (7) последовательность мет-Вонин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-глицин-лейцин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-пролин (SEQ ID NO: 99) и (8) последовательность глицин-серин-пролин.

Производные полипептида ОВ в соответствии с изобретением имеют один или несколько химических фрагментов, присоединенных к нему, включая водорастворимые полимеры, такие как полиэтиленгликоль. Производные полиэтиленгликоля, дериватизированные производные, могут быть моно -, ди -, три-или тетрагидрированными, например, N-терминальными моноэтилированными. Предпочтительные N-концевые моногликозилированные производные полипептидов по изобретению включают полипептиды ОВ, содержащие аминокислотные остатки 22-167 SEQ ID NO: 4 или остатки с 22 по 166 SEQ ID NO: 6, необязательно имеющие (пегелированный) метионин в положении 21.

Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, представленная в настоящем изобретении, кодирует полипептид ОВ, аллельный вариант или аналог, включая фрагменты, как описано выше. В частности, представлены молекулы ДНК для применения в фиксации экспрессии полипептида ОВ, обладающего биологической активностью модулирующего веса тела у млекопитающего и выбранного из группы, состоящей из: (a) молекул ДНК, изложенных в SEQ ID NO: 1 и 3, или их фрагментов; (b) молекул ДНК, которые гибридизуются с молекулами ДНК, определенными в (a) или гибридизуемых фрагментах; и (c) молекул ДНК, которые кодируют экспрессию аминокислотной последовательности, кодируемой любой из вышеуказанных молекул ДНК. Примером таких молекул является молекула геномной ДНК человека SEQ ID NO: 22 и 24.

Предпочтительные молекулы ДНК согласно изобретению кодируют полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в: (a) SEQ ID NO: 2; (b) аминокислоты с 22 по 167 из SEQ ID NO: 2; (c) SEQ ID NO: 4; (d) аминокислоты с 22 по 167 из SEQ ID NO: 4; (e) SEQ ID NO: 5; (f) аминокислоты с 22 по 166 из SEQ ID NO: 5; и (g) SEQ ID NO: 6; и (h) аминокислоту с 22 по 166 из SEQ ID NO: 6, а также полипептиды, которые имеют N-концевую аминокислотную или аминокислотную последовательность, как отмечено ранее. Иллюстративно, предпочтительная молекула ДНК имеет последовательность, представленную в качестве кодирующей белок последовательности SEQ ID NO: 3, и, в частности, имеет последовательность, представленную в виде последовательности, кодирующей аминокислоты 22 -167.

Также предоставлены детектируемо меченые молекулы нуклеиновой кислоты, гибридизуемые с молекулой ДНК по изобретению, и включают молекулы нуклеиновой кислоты, гибридизуемые с некодирующей областью нуклеиновой кислоты ОВ, которая некодирующей областью выбрана из группы, состоящей из интрона, 5'- некодирующей области и 3'- некодирующей области. Настоящее изобретение также относится к олигонуклеотидным праймерам для амплификации геномной ДНК человека, кодирующей полипептид об, такой как олигонуклеотиды, представленные в SEQ ID NO: 29 -32.

Векторы, предлагаемые настоящим изобретением, содержат молекулу ДНК по изобретению, как описано выше, и предпочтительно имеют форму вектора экспрессии, который содержит молекулу ДНК, функционально связанную с последовательностью контроля экспрессии. Одноклеточные клетки-хозяева по изобретению трансформируют или трансфицируют с помощью молекул ДНК по изобретению или с помощью вектора, как описано выше. Предпочтительные клетки-хозяева включают бактерии, дрожжи, клетки млекопитающих, растительные клетки, клетки насекомых и человеческие клетки в культуре ткани. В качестве иллюстрации, такие клетки-хозяева выбирают из группы, состоящей из E coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, дрожжей, CHO, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, Bsc1, Bsc40, Bmt10 и Sf9 клеток. В настоящее время предпочтительные дрожжевые хозяева включают Saccharomyces, Pichia, Candida, Hansenula и Torulopsis. Также представлены клетки млекопитающих, содержащие полипептид об, кодирующий последовательность ДНК и модифицированные in vitro для обеспечения более высокой экспрессии полипептида посредством гомологичного рекомбинационного события, состоящего из вставки регуляторной последовательности экспрессии в функциональной близости к кодирующей последовательности полипептида. Регуляторная последовательность экспрессии может представлять собой экспрессию

полипептида или нет и может заменить мутантную полипептидную регуляторную последовательность в клетке.

В настоящем изобретении предложены способы получения полипептида об, включающие: (а) культивирование клетки, как описано выше, в условиях, которые обеспечивают экспрессию полипептида об; и (b) выделение экспрессированного полипептида. Эта процедура также может сопровождаться стадиями: (с) хроматографирования полипептида на Ni-хелатирующей колонке и (d) очистки полипептида гель-фильтрацией. В предпочтительном варианте осуществления после стадии (с) и перед стадией (d) способ включает хроматографирование полипептида на колонке с сильным катионитом.

Настоящее изобретение также обеспечивает меченые и немеченые моноклональные и поликлональные антитела, специфичные для полипептидов по изобретению и линий иммортальных клеток, которые продуцируют моноклональное антитело по изобретению. Препарат антитела по изобретению включает: (а) конъюгирование об-полипептида с белком-носителем; (b) иммунизацию животного-хозяина конъюгатом полипептида ОВ с белком-носителем на стадии (а), смешанным с адъювантом; и (с) получение антитела из иммунизированного животного-хозяина.

Изобретение относится к способам измерения присутствия полипептида ОВ в образце, включающему: (а) приведение в контакт образца, предположительно содержащего полипептид ОВ, с антителом (предпочтительно связанным с твердым носителем), которое специфически связывается с полипептидом ОВ в условиях, которые обеспечивают образование реакционных комплексов, содержащих антитело и полипептид ОВ; и (b) обнаружение образования реакционных комплексов, содержащих антитело и полипептид об в образце, причем обнаружение образования реакционных комплексов указывает на присутствие полипептида ОВ в образце. Соответственно, предложены способы *in vitro* для оценки уровня ОВ-полипептида в биологическом образце, включающие: (а) обнаружение образования реакционных комплексов в биологическом образце согласно указанному выше способу; и (b) оценку количества образующихся реакционных комплексов, количество которых соответствует уровню ОВ-полипептида в биологическом образце. При обнаружении или диагностике наличия заболевания, связанного с повышенными или пониженными уровнями полипептида ОВ в соответствии с изобретением, делается оценка, как указано выше, и уровень, обнаруженный, сравнивается с уровнем ОВ-полипептида, присутствующего у нормальных субъектов или у субъекта в более ранний момент времени. Увеличение уровня полипептида ОВ по сравнению с нормальными или предшествующими уровнями указывает на заболевание, связанное с повышенными уровнями полипептида ОВ, и сниженный уровень полипептида ОВ по сравнению с нормальными уровнями указывает на заболевание, связанное с пониженными уровнями полипептида ОВ. Соответственно, предложены способы *in vitro* для мониторинга терапевтического лечения заболевания, связанного с повышенными или пониженными уровнями полипептида ОВ у субъекта-млекопитающего, включающего оценку, как описано выше, уровней полипептида ОВ в серии биологических образцов, полученных в различные моменты времени от субъекта-млекопитающего, подвергающегося такому терапевтическому лечению.

Фармацевтические композиции по изобретению содержат полипептид ОВ, как описано выше, вместе с фармацевтически приемлемым носителем и полезны в терапевтических способах снижения массы тела животного. Дополнительные фармацевтические композиции по изобретению для применения в терапевтических способах увеличения массы тела животного включают антагонист полипептида ОВ, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из антитела, которое связывается и нейтрализует активность полипептида ОВ, фрагмента полипептида об, который связывается, но не активирует полипептидный рецептор ОВ, и низкомолекулярного антагониста полипептида ОВ. Настоящее изобретение также обеспечивает соответствующий внешний вид тела, улучшающий косметические композиции для уменьшения или увеличения массы тела индивидуума, причем эти композиции полезны в косметических

процессах для улучшения внешнего вида тела индивидуума. Такие косметические композиции вводят индивидууму в количестве, достаточном для модулирования массы тела человека до желаемого уровня.

Настоящее изобретение также относится к применению молей нуклеиновой кислоты по изобретению, а также молекул антисмысловых нуклеиновых кислот, гибридизуемых с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид ОВ по изобретению, для изготовления лекарственного средства для (например, генной терапии) модификации массы тела животного. Также предложено применение полипептида или антагониста ОВ в соответствии с изобретением для изготовления лекарственного средства для модификации массы тела животного. Лекарственные средства, разработанные таким образом, могут быть использованы для модификации массы тела млекопитающего при лечении расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, высокого кровяного давления и высокого холестерина, и как часть комбинационной терапии с лекарственным средством для лечения таких расстройств. Такие лекарственные средства могут быть использованы в терапевтических способах, включающих внутривенные, внутриартериальные, внутрибрюшинные, внутримышечные, подкожные, назальные, пероральные или легочные системы доставки.

Представленные в настоящем документе данные показывают, что полипептиды ОВ по изобретению в их форме секретируются главным образом из адипоцитов млекопитающих и что полипептиды функционируют как гормоны.

Примеры в настоящем документе демонстрируют, что полипептид ОВ, альтернативно называемый в настоящем документе "лептином", циркулирует у мыши, крысы и плазмы человека. Лептин отсутствует в плазме у мышей ob/ob и присутствует в десятикратных более высоких концентрациях в плазме у мышей db/db и в двадцать раз более высоких концентраций у крыс fa/fa. Наиболее значимо, ежедневные инъекции рекомбинантного лептина резко снижают массу тела мышей ob/ob, значительно влияют на массу тела мышей дикого типа и не оказывают влияния на мышей db/db.

В дополнительном аспекте, полипептид ob из одного вида является биологически активным в других видах. В частности, полипептид ОВ человека активен у мышей.

В первом случае модуляторы по настоящему изобретению содержат молекулы нуклеиновых кислот, включая рекомбинантные молекулы ДНК (е. г. кДНК или вектор, содержащий кДНК или выделенную геномную ДНК) или клонированные гены (те выделенную геномную ДНК), или их вырожденные варианты, которые кодируют сами полипептиды, служащие модуляторами весового контроля, как определено ниже, или консервативные варианты или их фрагменты, в частности такие фрагменты, лишенные сигнального пептида (альтернативно упоминаемого в настоящем документе как зрелый полипептид ОВ), которые обладают аминокислотными последовательностями, такими как сформулированные на фиг. 1А-Е (SEQ ID NO: 2), фиг. 3 (SEQ ID NO: 4), фиг. 5 (SEQ ID NO: 5) и фиг. 6 (SEQ ID NO: 6). В конкретных вариантах осуществления представлены аминокислотные последовательности для двух вариантов полипептидов мыши и человека. Оба полипептида обнаружены в форме с делецией глутамина 49, что может быть результатом аномалии сплайсинга мРНК. Полипептиды ОВ из различных видов могут быть высокоомологичными; как показано на фиг. 4, полипептиды ОВ мыши и человека являются более чем на 80% гомологичными.

Молекулы нуклеиновой кислоты, рекомбинантные молекулы ДНК или клонированные гены могут иметь нуклеотидные последовательности или могут быть комплементарными последовательностям кодирования ДНК, показанным на фиг. 1А-Е (SEQ ID NO: 1) и фиг. 2А и В (SEQ ID NO: 3). В частности, такие молекулы ДНК могут представлять собой кДНК или геномную ДНК, выделенную из хромосомы. Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению также могут соответствовать 5'- и 3'- фланкирующим последовательностям последовательностей ДНК и интронной ДНК. Соответственно, настоящее изобретение также относится к идентификации нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей по фиг. 1А-Е (SEQ ID NO: 1) и фиг.

2A и B (SEQ ID NO: 3) в данном документе, и дегенерации вариантов, аллельных вариаций и подобных родственных молекул.

Молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может представлять собой ДНК или РНК, включая ее синтетические варианты, имеющие аналог фосфата или фосфата, например тиофосфат, связи. В настоящем документе предусмотрены как одноцепочечные, так и двухцепочечные последовательности.

Настоящее изобретение дополнительно относится к молекулам нуклеиновых кислот для применения в качестве молекулярных зондов или в качестве праймеров для амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР), т.е., синтетические или природные олигонуклеотиды, имеющие последовательность, соответствующую части последовательностей, показанных на фиг. 1 A-E (SEQ ID NO: 1), фиг. 2A и B (SEQ ID NO: 3) и фиг. 20A-C (SEQ ID NO: 22 и 24); или 5'- и 3'- фланкирующие последовательности кодирующих последовательностей; или интронные последовательности геномной ДНК. В частности, изобретение рассматривает молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере приблизительно 10 нуклеотидов, где последовательность молекулы нуклеиновой кислоты соответствует нуклеотидной последовательности одинакового количества нуклеотидов в нуклеотидных последовательностях по фиг. 1 A-E (SEQ ID NO: 1), фиг. 2A и B (SEQ ID NO: 3) и фиг. 20A-C (SEQ ID NO: 22) или последовательность, комплементарную ей. Более предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты молекулы имеет по меньшей мере 15 нуклеотидов. Наиболее предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 20 нуклеотидов. В варианте осуществления изобретения, в котором олигонуклеотид представляет собой зонд, олигонуклеотид детектируемо маркируется, например, с помощью радионуклида (такого как Р) или фермента.³²

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает клонирующий вектор, который содержит нуклеиновые кислоты по изобретению, которые кодируют полипептид об; и вектор экспрессии бактерий, насекомых или млекопитающих, который содержит молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующие полипептид об, функционально связанный с последовательностью контроля экспрессии. Соответственно, изобретение дополнительно относится к клетке-хозяину, такой как бактериальная клетка, дрожжевая клетка, клетка насекомых или клетка млекопитающего, трансфицированных или трансформированных соответствующим вектором экспрессии, и, соответственно, к применению вышеупомянутых конструкций при получении модуляторов по настоящему изобретению.

В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с полипептидом об. Такие антитела могут быть получены против полноразмерного полипептида или его антигенных фрагментов. В одном аспекте такие антитела ингибируют функциональную (т.е. модулирующую массу тела и жировую композицию) активность полипептида об. В другом аспекте антитела могут быть использованы для определения уровня циркулирующего полипептида в плазме или сыворотке. В еще одном дополнительном аспекте специфические для региона антитела, в частности моноклональные антитела, могут быть использованы в качестве зондов полипептидной структуры ОБ.

Все вышеупомянутые материалы следует рассматривать в настоящем документе как модуляторы массы тела и жировой композиции, и, таким образом, могут быть использованы в различных контекстах.

В частности, изобретение предполагает как диагностические, так и терапевтические применения, а также определенные сельскохозяйственные применения, которые зависят от применения модуляторов, определенных в данном документе, включая как молекулы нуклеиновой кислоты, так и пептиды.

Более того, модуляция массы тела несет специфические терапевтические последствия и выгоды, в том смысле, в которых либо ожирение, либо, наоборот, кахексия представляют собой

нежелательные телесные условия, могут быть устранены введением одного или более модуляторов по настоящему изобретению.

Таким образом, предложен способ модулирования массы тела млекопитающего, который включает контроль экспрессии белка, кодируемого нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательности по фиг. 1A-E (SEQ ID NO: 1), последовательности по фиг. 2 A и B (SEQ ID NO: 3) и ее дегенерации и аллельных вариантов. Такой контроль может быть осуществлен путем введения рассматриваемых нуклеотидов путем генной терапии в жировые клетки пациента или хозяина для контроля или уменьшения ожирения. Наоборот, препарат и введение антагонистов в нуклеотиды, такие как антисмысловые молекулы, будут указаны и осуществлены в случае, когда присутствуют и находятся условия, включающие чрезмерную потерю массы, такие как нервная анорексия, рак или СПИД. Такие конструкции будут введены аналогичным образом в нуклеотиды, непосредственно в жировые клетки для осуществления таких изменений.

Соответственно, белки, определенные на фиг. 1 A-E, 3, 5 и 6 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6), консервативные варианты, их активные фрагменты и конъюгированные малые молекулы могут быть составлены для прямого введения в терапевтических целях, для снижения или контроля избыточной жировой массы тела или увеличения массы тела. Соответственно, антитела и другие антагонисты к указанным белковым материалам, таким как их фрагменты, могут быть получены и аналогичным образом введены для достижения эффекта преобразования. Соответственно, изобретение преимущественно направлено на фармацевтическую композицию, содержащую полипептид ОВ по изобретению или, альтернативно, его антагонист, в смеси с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом.

Кроме того, полипептид ОВ по изобретению можно вводить для его косметических эффектов, например, для улучшения внешнего вида тела путем уменьшения жировых отложений. Полипептид ОВ может быть использован независимо или в сочетании с другими косметическими стратегиями, например, хирургическим вмешательством, для его косметических эффектов.

Диагностическое применение настоящих нуклеотидов и соответствующих пептидов распространяется на применение нуклеиновых кислот для идентификации дополнительных мутаций его аллельных вариаций, с тем чтобы разработать репертуар активных нуклеотидных материалов, пригодных как в диагностических, так и в терапевтических применениях. В частности, можно идентифицировать как гомозиготные, так и гетерозиготные мутации нуклеотидов, которые можно было бы постулировать для более точного количественного определения состояния пациентов, для определения потенциала риска индивидуумов в отношении ожирения. В частности, гетерозиготные мутации в настоящее время рассматриваются как связанные с ожирением от легкой до умеренной, в то время как гомозиготные мутации будут связаны с более выраженным и тяжелым состоянием ожирения. Затем можно провести соответствующее тестирование ДНК, используя вышеупомянутые выявленные материалы в качестве реперов, чтобы облегчить точный долгосрочный прогноз для конкретных тенденций, с тем чтобы быть способным предписывать изменения в диетических или других персональных привычках, или непосредственное терапевтическое вмешательство, чтобы предотвратить такие условия.

Диагностическая полезность настоящего изобретения распространяется на способы измерения присутствия и протяженности модуляторов по изобретению в клеточных образцах или биологических экстрактах (или образцах), взятых у испытуемых, так что могут быть установлены и нуклеиновые кислоты (геномная ДНК или мРНК) и/или уровни белка в таких тестовых образцах. Учитывая, что повышенная активность нуклеотида и присутствие результирующего белка отражают способность субъекта ингибировать ожирение, врач при просмотре таких результатов у субъекта с ожирением определит, что фактор, отличный от дисфункции в отношении присутствия и активности нуклеотидов настоящего изобретения,

является причиной состояния ожирения. Наоборот, пониженные уровни нуклеотида и/или экспрессированного белка позволили бы предположить, что такие уровни должны быть увеличены для лечения такого состояния ожирения, и затем может быть реализован соответствующий терапевтический режим.

Кроме того, нуклеотиды, обнаруженные и представленные на фиг. 1А-Е и 2А и В, представляют кДНК, которая, как указано кратко выше, полезна при измерении соответствующей РНК. Аналогично, рекомбинантный белковый материал, соответствующий полипептидам по фиг. 1А-Е и 3, можно получать и соответствующим образом маркировать для применения, например, в радиоиммуноанализе, например, с целью измерения уровней жира и/или плазмы белка ОВ или для обнаружения присутствия и уровня рецептора для ОВ на тканях, таких как гипоталамус.

Кроме того, настоящее изобретение предполагает не только идентификацию нуклеотидов и соответствующих белков, представленных в настоящем документе, но выяснение рецептора к таким материалам. В таком контексте полипептиды по фиг. 1 А-Е, 3, 5 и/или 6 могут быть получены и использованы для скрининга соответствующей библиотеки экспрессии для выделения активных рецепторов. После этого рецептор может быть клонирован, а сам рецептор или в сочетании с лигандом можно затем использовать для скрининга небольших молекул, которые могут обладать подобной активностью в модуляторах в настоящем документе.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые включают некоторые из модуляторов согласно настоящему изобретению, предпочтительно полипептиды, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, их антитела, соответствующие низкомолекулярные агонисты или их антагонисты, или активные фрагменты, полученные в составах для множества режимов введения, где такая терапия является подходящей. Такие составы могут включать фармацевтически приемлемые носители или другие адъюванты, если это необходимо, и могут быть получены в эффективных диапазонах доз для определения врачом или врачом в каждом случае.

Соответственно, основной целью настоящего изобретения является обеспечение модуляторов массы тела, как определено в настоящем документе, в очищенной форме, которые проявляют определенные характеристики и активности, связанные с контролем и изменением ожирения и содержания жира у млекопитающих.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способов обнаружения и измерения модуляторов весового контроля, как указано в настоящем документе, в качестве средства эффективной диагностики и мониторинга патологических состояний, в которых изменение уровня таких модуляторов представляет собой или может быть отличительным признаком.

Еще одной целью настоящего изобретения является создание способа и связанной системы анализа для скрининга веществ, таких как лекарственные средства, агенты и тп, которые потенциально эффективны для имитации или ингибирования активности модуляторов по изобретению у млекопитающих.

Еще одной целью настоящего изобретения является создание способа лечения млекопитающих для контроля массы тела и содержания жира у млекопитающих и/или для лечения некоторых патологических состояний, при которых аномальное снижение или повышение веса тела является отличительным признаком.

Еще одной целью настоящего изобретения является получение генетических конструкций для применения в генетических терапевтических протоколах и/или фармацевтических композициях для сопоставимых терапевтических способов, которые содержат или основаны на одном или нескольких модуляторах, партнерах по связыванию или агентах, которые могут контролировать их продуцирование, или которые могут имитировать или антагонизировать их активности.

Другие цели и преимущества станут очевидными для специалистов в данной области техники из обзора последующего описания, которое продолжается со ссылкой на следующие иллюстративные чертежи.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 (А-Е) показана последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 1) и выведенная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 2), полученная для кДНК ОВ мыши. За лидером 5'пары оснований 39'следовала предсказанная рамка считывания с открытой аминокислотой и нетранслируемая последовательность размером приблизительно 3,7 кб. (В ранее поданной заявке № 08/347,563, поданной 30 ноября 1994 г. и под номером 08/438,431, поданной 10 мая 1995 г. была определена дополнительная не кодирующая последовательность 58-основа 5, которая является артефактом клонирования. Этот артефакт не имеет подшипника на кодирующей области, некодирующей области 39 основания 5, в настоящее время показанной на фиг. 1, или 3'некодирующей области гена.) А в общей сложности около 2500 пар оснований 3'нетранслируемой последовательности. Анализ прогнозируемой последовательности белка путем наблюдения и использования компьютерной программы Sigseq указывает на присутствие сигнальной последовательности (подчеркнутой). Микронеоднородность кДНК была отмечена тем, что приблизительно 70% кДНК имели глютаминовый кодон в кодоне 49 и 30% (см. фиг. 5 и 6, ниже). Эта аминокислота подчеркнута, как и кодон аргинина, который мутирован у мышей C57BL/6J ob/ob (мышей 1J).

На фигуре 2 (А и В) представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 3), полученная для кДНК ОВ человека. Нуклеотиды пронумерованы от 1 до 701 с начальным сайтом в нуклеотиде 46 и завершением в нуклеотиде 550.

На фиг. 3 показана полностью выведенная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 4), полученная для гена ОВ человека, соответствующая последовательности нуклеиновой кислоты по фиг. 2А и В. Аминокислоты пронумерованы от 1 до 167. Сайт расщепления сигнальной последовательности расположен после аминокислоты 21 (Ala) так, что зрелый белок проходит от аминокислоты 22 (Val) до аминокислоты 167 (Cys).

На фиг. 4 показано сравнение полученных аминокислотных последовательностей мыши (SEQ ID NO: 2) и человека (SEQ ID NO: 4). Последовательность выведенной на человека последовательности аминокислот человека была в высокой степени гомологична таковой у мыши. Консервативные изменения отмечены пунктиром, и неконсервативные изменения звездочкой. Вариабельный кодон глутамин подчеркнут, как и положение бессмысленной мутации у мышей C57BL/6J ob/ob (1J). В целом, на уровне аминокислоты имеется 83% идентичность, хотя между валином в кодоне 22 (непосредственно ниже по ходу последовательности сигналов) и цистеином в положении 117 было обнаружено только восемь замен.

На фиг. 5 показана полноразмерная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 5), полученная для гена ОВ мыши, как показано на фиг. 3, но не содержащая глутамин в положении 49. Аминокислоты пронумерованы от 1 до 166. Сайт расщепления сигнальной последовательности расположен после аминокислоты 21 (Ala) (и, таким образом, до делеции глутамин 49), так что зрелый белок проходит от аминокислоты 22 (Val) до аминокислоты 166 (Cys).

На фиг. 6 показана полностью выведенная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 6), полученная для гена ОВ человека, как показано на фиг. 4, но не содержащая глутамин в положении 49. Аминокислоты пронумерованы от 1 до 166. Сайт расщепления сигнальной последовательности расположен после аминокислоты 21 (Ala) (и, таким образом, до делеции глутамин 49), так что зрелый белок проходит от аминокислоты 22 (Val) до аминокислоты 166 (Cys).

Фиг. 7. (А) Физическая карта расположения об в мышинной хромосоме и карты клонирования YAC и P1. "М и N" соответствует сайтам рестрикции Mull и Nøtl. Числа

соответствуют отдельным животным, которые были рекомбинантными в области ов 1606 мейоз, которые были оценены. Met, Pax 4, D6reck39, D6rck13 и Spa относятся к местоположениям в области ов, которые связываются с зондами DNA. YAC выделяли с использованием D6rck13 и Pax-4 в качестве зондов, и концы извлекали с использованием векториальной ПЦР и/или спасения плазмидного конца и использовали, в свою очередь, для выделения новых YAC. (B) полученный контиг YAC. Один из YAC в этом контиге, Y902a0925, был химерным. Каждый из зондов, используемых для генотипирования рекомбинантных животных, указан в скобках. (6) соответствует YAC 107; (5) соответствует M16 (+) (или M16 (pLUS)); (4) соответствует adu (+); (3) соответствует aad (pICL); (2) соответствует 53 (pICL); и (1) соответствует 53 (+). (C) P1 контиг бактериофагов P1 клонов, выделенных с выбранными концевыми зондами YAC. Ген ob был выделен в клоне P1, выделенном с использованием дистального конца YAC Yb6s2f12 (конец (4)) (альтернативно называемый в настоящем документе adu (+)).

На фиг. 8 представлена фотография пятна бромид этидия 192 независимых изолятов четвертого эксперимента по улавливанию экзона, которые были амплифицированы и охарактеризованы с помощью ПЦР.

Фигура 9 представляет собой фотографию пятна бромид этидия для клонов, амплифицированных с помощью ПЦР с подозрением на проведение ов. Каждый из 7 клонов, которые не переносят артефакт, повторно амплифицировали с помощью ПЦР и электрофоретировали на 1% агарозном геле в TBE и окрашивали бромидом этидия. Маркеры размера (дальняя левая непрономерованная полоса движения) являются коммерчески доступными "1kV лестницей". 1-клон 1D12 полосы движения, содержащий последовательность НТВ. " Дорожка 2-клон IF1, новый клон за пределами области об. Дорожка 3-клон 1H3. Дорожка 4-клон 2B2, которая является идентичной IF1. Дорожка 5-клон 2G7, которая содержит экзон. Дорожка 6-клон 2G11, которая идентична IF1. Дорожка 7-клон 2H1, которая не содержит вставку.

На фиг. 10 представлена последовательность клона 2G7 (SEQ ID NO: 7), которая включает экзон, кодирующий часть гена ОБ. Последовательности праймеров, используемые для амплификации этого экзона, находятся в боксе на фигуре (SEQ ID NO: 8 и 9).

Фиг. 11 (A) Анализ с обратной транскрипцией-ПЦР мРНК из различных тканей одной и той же мыши с праймерами 2G7 и актиновыми праймерами. Реакции ОТ-ПЦР проводили с использованием 100 нг общей РНК, обратной транскрибируемой с олиго dT в качестве праймера для синтеза кДНК первой цепи. ПЦР-амплификацию проводили в течение 35 циклов с денатурацией 94° в течение 1'; 55° гибридизация в течение 1'; и 72° С расширений в течение 2'с 1'- секундным аутопродолжением за цикл. Продукты ОТ-ПЦР разделяли в 2% агарозном геле с низкой температурой плавления в 1x TBE буфере. (B) Нозерн-блоттинг мРНК из различных органов мыши с использованием ПЦР, меченной 2G7 в качестве зонда. Десять мкг общей РНК из каждой из тканей подвергали электрофорезу на агарозном геле с формальдегидом. Зонд гибридизовали при 65° С в Rapid Hybe (Amersham). Авторадиографические сигналы были очевидны после 1 часа воздействия; показанный эксперимент был результатом 24-часового воздействия.

Фиг. 12 (A) Пятно бромистого этидия от реакции ОТ-ПЦР на РНК жировой клетчатки (белой жировой ткани) от каждого из перечисленных штаммов мыши. Общую РНК (100 нг) для каждого образца подвергали обратной транскрипции с использованием олиго dT и обратной транскриптазы, и полученная одноцепочечная кДНК была амплифицирована ПЦР с праймерами 2G7 (нижними полосами) или актиновыми праймерами (верхними полосами). Оба праймера 2G7 и актина включали в одну и ту же реакцию ПЦР. Продукты проводили на 1% агарозном геле TBE. (B) Северный анализ, соответствующий (A). Десять мкг РНК жировой клетчатки (белой жировой ткани) из каждого из указанных штаммов провели и зондировали с помощью зонда, меченного ПЦР, 2G7, как на фиг. 1B, выше. Приблизительно 20-кратное увеличение уровня мРНК 2G7 было очевидным в белково-жировой РНК из штамма C57BL/6J

ob/ob (1J) по сравнению с бедными литниками. В обоих экспериментах ОТ-ПЦР и в Северных экспериментах не было детектируемого сигнала в РНК 2G7 из мышей SM/Ckcm-+ Дассоб/ob (2J) даже после 2-недельного воздействия. Показано 24-часовое автордиографическое воздействие. Тот же фильтр гибридизовали с активным зондом (нижняя часть панели).2121

Фиг. 13 представляет собой Северный анализ дополнительных 2J животных и контрольных животных, который подтверждает отсутствие мРНК ОБ от 2J животных. Северный анализ проводили, как на фиг. 11 и 12. В этом случае контрольная РНК представляла собой ар2, специфический для жира транскрипт. Значимость различной плотности полос ар2 отсутствует.

На фиг. 14 сравнивается последовательность ДНК мышей C57BLJ/6J (нормальная) и мышей C57BL/6J ob/ob (1J) в области точечной мутации, что приводит к введению преждевременной стоп-кодона (нонсенс мутация) в кДНК мутантного штамма. Мыши ob/ob имели мутацию С → Т, которая изменила остаток аргинина в положении 105. Это базовое изменение показано в виде выхода из автоматизированного секвенатора ДНК. ОТ-ПЦР проводили с использованием РНК белого жира из обоих штаммов (+/+ и ob/ob) с использованием праймеров из 5'- и 3'- нетранслируемых областей. Продукты реакции ПЦР были очищены гелем и непосредственно секвенированы вручную и с использованием автоматизированного секвенатора Applied Biosystems, Inc. 373A с праймерами вдоль обеих цепей кодирующей последовательности.

ФИГУРА 15 (А) саузерн-блоттинг геномной ДНК из каждого из перечисленных штаммов мыши. Приблизительно 5 мкг ДНК (полученной из геномной ДНК, полученной из печени, почки или селезенки), расщепляли рестриктазой, указанной. Затем ДНК подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле ТВЕ и исследовали с помощью ПЦР, меченной 2G7. Расщепление рестрикции BglI I выявило увеличение размера приблизительно 9 кВ (наибольшего) фрагмента BGIII в ДНК SM/Ckc-+Dac ob/ob (2J). RFLP не были детектированы с помощью каких-либо других рестрикционных ферментов. Предварительное рестрикционное картирование геномной ДНК показало, что полиморфный сайт BglI I составляет примерно 7 кВ выше по потоку от сайта начала транскрипции. Ни один из других тестируемых ферментов не проходит мимо сайта начала мРНК. (В) Сегрегация полиморфизма BglII в штамме SM/Ckc-+Dac ob/ob. От того же поколения коизогенного потомства SM/Ckc-+Dac ob/ob (2J) генотипировали шесть потомков с ожирением и пятью из одного и того же поколения колонии коизогенных SM/Ckc-+Dac ob/ob (2J) путем оценки полиморфизма BglII, как показано в (А). Все фенотипические животные с ожирением были гомозиготными по большему аллелю полиморфного фрагмента BglII. ДНК в "контрольной" дорожке получали из несвязанной SM/Ckc-+Dac +/+ мыши, разведенной отдельно от SM/Ckc-+Dac ob/ob колонии.21212121212121

Фиг. 16 представляет собой саузерн-блоттинг. Расщепленную ECORI геномную ДНК из перечисленных видов с использованием кДНК ОБ в качестве зонда (те зоо-блоттинга). Сигналы гибридизации были обнаружены в каждом образце позвоночного даже после гибридизации умеренной жесткости.

ДНК кошки в этом эксперименте слегка ухудшилась. Ограниченную ДНК проводили на 1% агарозном геле ТВЕ и переносили в мембрану для зондирования для зондирования. Фильтр гибридизовали при 65° С и промывали 2X SSC/0,2% SDS при 65° С дважды в течение двадцати минут и подвергали воздействию в течение 3 дней с использованием пленки Kodak (Rochester, NY) X-OMAT.

На Фигуре 17 представлена область клонирования экспрессии вектора pET-15 b (Novagen) (SEQ ID NO: 11 и 12).

На фиг. 18 представлен анализ элюата из колонки His-связывающей смолы (Ni) для рекомбинантного зрелого мышинового об слияния с His-tag (А) и зрелого слияния ОБ человека с His-tag (В). Бактерии трансформировали векторами pETM9 и pETH14, соответственно. При

индукции с 1 mM IPTG в оптимальных условиях трансформированные бактерии способны продуцировать 100-300 мкг/мл слитого белка ОВ, главным образом, в тельцах включения. Тельца включения солубилизировали с помощью 6M гуанидин-HCl или мочевины, и слитый белок (присутствующий в супернатанте лизиса) загружали на колонку His-связывающей смолы (Ni) в 10 мл 1x связывающего буфера с мочевиной. Колонку элюировали поэтапно 5 мл аликвотами 20 мМ, 60 мМ и 300 мМ имидазола и, наконец, буфером для полоски. Аликвоты анализировали на присутствие слитого полипептида ОВ на 15% акриламидном геле. Каждая полоса движения содержит эквивалент 100 мкл бактериального экстракта.

Фиг. 19 (А) трансляция *in vitro* ОВ РНК. кДНК человека ОВ субклонировали в вектор PGEM. Плазмиду линейаризовали и синтезировали плюсовую РНК с использованием полимеразы Sp6. Синтезированную *in vitro* РНК транслировали в присутствии или в отсутствие микросомальных мембран собачьих поджелудочной железы. После трансляции *in vitro* наблюдался приблизительно 18 кДа основного продукта трансляции. Добавление микросомальных мембран к реакции привело к появлению второго продукта трансляции примерно на 2 кДа меньше, чем у первичного продукта трансляции. Размер продукта трансляции РНК интерлейкина -1 α , в котором отсутствует кодированная сигнальная последовательность, не изменялся при добавлении микросомальных мембран. Эти данные указывали на присутствие функциональной сигнальной последовательности. (В) Трансляция *in vitro* в присутствии или отсутствии протеиназы К. Обработка протеазой приводила к полному протеолизу продукта первичной трансляции 18 кДа, в то время как обработанная 16 кДа форма не затрагивалась. Пермеабилзация микросомы с 0,1% TRITON-X100 визуализировала чувствительную к протеазе обработанную форму. Эти результаты указывают на то, что продукт переместился в просвет микрочасти.

Фиг. 20 (А-Е) Последовательность гена ОВ человека (SEQ ID NO: 22 и 24). (F) А принципиальная схема гена ОВ мыши. (G) А принципиальная схема гена ОВ человека. Как (F), так и (G) стартовый и стоп-кодены подчеркнуты. Не существует доказательства первого интрона, гомологичного первому интрону мыши в гене человека, но его существование не может быть исключено.

На фигуре 21 представлен схематический чертеж одной из стратегий клонирования, применяемых для достижения рекомбинантной экспрессии ОВ в дрожжах *Pichia*. (А) Вектор экспрессии ОВ с последовательностью сигналов фактора α -сопряжения. (В) Схематическое изображение структуры рекомбинантного слитого белка, включая аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 26), показывающую сайт XhoI и предполагаемые сайты расщепления KEX-2 и STE -13, и N-концевые избыточные аминокислоты, присутствующие после расщепления KEX-2 (SEQ ID NO: 27). (С) Альтернативная стратегия получения зрелых ОВ включает получение конструкции с аминокислотной последовательностью, соответствующей сайту расщепления XhoI и сайту расщепления KEX-2 непосредственно перед зрелой последовательностью полипептида (SEQ ID NO: 28).

Фиг. 22-альтернативная стратегия экспрессии в *Pichia*. (А) Вектор экспрессии ОВ-слияния с His-меткой, принятой из системы экспрессии pET под контролем сигнальной последовательности фактора α -сопряжения (SEQ ID NO: 33). (В) Схематическое изображение структуры рекомбинантного ОВ слитого белка, содержащего His-метку, которая включает сигнальную последовательность α -сопряженного фактора, предполагаемые сайты расщепления KEX-2 и STE -13, His-tag и сайт расщепления тромбина, который будет давать ОВ с тремя избыточными аминокислотными остатками.

Фигура 23 (А) PAGE анализ экспрессии мышинных ОВ (как микрогетерогенных форм, те содержащих и отсутствующих Gln 49) в трансформированных *Pichia* дрожжах. Ожидаемая полоса приблизительно 16 кДа видна в трансформированной дрожжевой культуральной жидкости (вторая и третья полосы), но не в культуральной жидкости из нетрансформированных дрожжей (первая полоса движения). (В) Анализ PAGE частично очищенного рекомбинантного

полипептида ОВ на карбоксиметилцеллюлозе, слабых катионообменнике. Полоса около 16 кДа очень видна в фракциях 3 и 4 из колонки, которую элюировали 250 mM NaCl. Дорожка 1-загруженный образец; дорожка 2-поток через; дорожки 3-5-фракции, элюированные 250 mM NaCl.

На фигуре 24 показано, что белок ОВ циркулирует в плазме мыши. (А) Иммунопреципитации из крови мыши. 0,5 мл плазмы мыши предварительно осветляли неконъюгированной сефарозой и инкубировали в течение ночи с иммунофицированными анти-ОВ антителами, конъюгированными с гранулами сефарозы 4В. Иммунопреципитат отделяли на 15% SDS-PAGE геле, переносили и вестерн-блоттировали с антителом к ОВ. Белок мигрировал с молекулярной массой приблизительно 16 кДа, в то же положение, что и зрелая мышь со белком, экспрессируемым в дрожжах. Белок отсутствовал в плазме у мышей C57BL/6J ob/ob и увеличивался в десять раз в плазме от мышей C57BLB/Ks db/db по сравнению с мышами дикого типа, мышам с db были предложены сверхпродуцирующие белок ОВ, вторичные по отношению к его эффектам. (В) Повышенные уровни ОВ у жирных крыс. Жирная крыса ожидает в результате рецессивной мутации на хромосоме крысы 5. Генетические данные предлагают дефект в том же гене, мутированном у мышей db. Плазму из жирных крыс и тощих литоматов подвергали иммунопреципитации и проводили на вестерн-блотах. Двадцать кратное увеличение циркулирующего уровня ОВ наблюдается у мутантных животных. (С) Количественное определение белка ОВ в плазме мыши. Увеличивающиеся количества рекомбинантного мышинового белка добавляли к 100 λ плазмы от ob мышей и иммунопреципитировали. Интенсивность сигнала на вестерн-блотах сравнивали с интенсивностью сигнала от 100 λ плазмы мышей дикого типа. Линейное увеличение интенсивности сигнала наблюдали при увеличении количеств рекомбинантного белка, демонстрируя, что иммунопреципитации проводились в условиях избытка антитела. Аналогичные сигналы наблюдались в образце плазмы дикого типа, и образец с 2 нг рекомбинантного белка, указывающий на циркулирующий уровень в плазме мыши, составляет приблизительно 20 нг/мл. (D) ОВ белок в экстрактах жировой ткани. Цитоплазматические экстракты жировой ткани мыши получали из db и мышей дикого типа. Вестерн-блоты показали повышенные уровни белка 16 кДа в экстрактах, полученных из мышей db.

На фиг. 25 показано, что белок ОВ циркулирует с переменными уровнями в плазме человека. (А) Вестерн-блоты плазмы человека. Образцы плазмы получали от шести добровольцев-добровольцев. Иммунопреципитация и вестерн-блоттинг выявили присутствие иммунореактивного белка массой 16 кДа, идентичного по размеру рекомбинантному белку 146 аминокислот, экспрессируемому в дрожжах. Вариабельные уровни белка наблюдали в каждом из шести образцов. (В) Анализ ELISA (иммуноферментный анализ) для человека. Планшеты для микротитрования покрывали иммунофицированными антителами против ОВ человека. К пластинам добавляли известные количества рекомбинантного белка и детектировали с использованием иммунофицированных биотинилированных анти-ob антител. Поглощение при 414 нм наносили на график против известных концентраций ОВ для получения стандартной кривой. Полученная стандартная кривая показала, что анализ был способен обнаруживать 1 нг/мл или более белка ОВ человека. (С) Количественное определение белка ОВ в плазме человека. Иммуноферментный анализ проводили с использованием 100 λ плазмы из шести бедных добровольцев и стандартов, используемых в панели В. Уровни белка ОВ в диапазоне от 2 нг/мл в НР от 1 до 15 нг/мл в НР6 были видны. Эти данные коррелируют с данными вестерн-блоттинга в панели А.

Фигура 26 показывает, что белок ОВ образует межмолекулярные дисульфидные связи. (А) Вестерн-блоты в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Вестерн-блоты мыши и плазмы человека повторяли с добавлением восстанавливающих агентов и без добавления восстанавливающих агентов в буфер образца. Когда β -меркаптоэтанол исключен из буфера для образца, иммунопреципитаты из db плазмы мигрируют с кажущейся молекулярной массой 16 кДа и 32 кДа. Добавление β -меркаптоэтанола в буфер приводит к исчезновению фрагмента

массой 32 кДа (см. фиг. 24). Этот результат перечисляется, когда мышинный белок экспрессируется в дрожжах, *Pichia pastoris*. В этом случае белок ОВ мыши мигрирует в положение димера. В восстановительных условиях очищенный рекомбинантный белок мыши мигрирует с кажущейся молекулярной массой 16 кДа, что указывает на то, что молекулярная форма 32 кДа является результатом одной или двух межмолекулярных дисульфидных связей. Человеческий белок, экспрессируемый *in vivo* и в *Pichia pastoris*, мигрирует с молекулярной массой 16 кДа в обоих восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (данные не показаны). (В) Белок человека, экспрессируемый в дрожжах, содержит внутримолекулярную дисульфидную связь. Секретируемые белки, как правило, предполагают их правильную конформацию при экспрессии в системе экспрессии *Pichia pastoris*. Зрелый человеческий белок 146 аминокислот экспрессировали в *Pichia pastoris* и очищали из дрожжевой среды с помощью двухстадийного протокола очистки, включающего ИМАС и гель-фильтрацию. Очищенный рекомбинантный белок подвергали масс-спектрометрии до и после расщепления цианобромида. Цианоген бромид расщепляется на карбоксильном конце остатков метионина. Молекулярная масса рекомбинантного дрожжевого белка составляла 16024 ± 3 Да (рассчитанная молекулярная масса = 16024 Да). Цианоген бромид расщепляется после трех метионинов в последовательности белка на аминокислотах 75, 89 и 157. Фрагмент бромид цианогена с измеренной массой 8435,6 Да соответствует аминокислотам 90-157 и 158-167, соединенным дисульфидной связью между cys-117 и cys-167 (рассчитанная молекулярная масса = 8434,5 Да). Выявленная нота.

На фиг. 27 показано получение биоактивного рекомбинантного белка. Нуклеотидную последовательность, соответствующую 145 аминокислотному зрелому белку ОВ мыши, клонировали в вектор экспрессии pET 15b. Этот вектор pET вставляет полигистидиновый тракт (His-tag) выше по потоку от клонированной последовательности, что позволяет эффективно очищать с использованием аффинной хроматографии с иммобилизованными металлами (ИМАС). Рекомбинантный бактериальный белок первоначально разделяется в нерастворимой мембранной фракции после бактериального лизиса. Мембранную фракцию сольubilизировали с использованием гидрохлорида гуанидиона и загружали в колонку ИМАС. Белок элюировали ступенчато с увеличением концентраций имидазола, как показано. Элюированный белок повторно сгибали и обрабатывали тромбином для удаления His-метки, как описано ниже. Конечный выход растворимого белка составил 45 нг/мл бактериальной культуры.

На фиг. 28 показаны биологические эффекты белка ОВ. Временной курс приема пищи (панели А-С) и масса тела (панели D-F). Группы из десяти животных получали ежедневные внутрибрюшинные инъекции белка ОВ в дозе 5 мг/кг/сутки (твердые квадраты), ежедневные инъекции PBS (сплошные круги) или без лечения (твердые треугольники). Группы лечения включали мышей C57b1/6J ob/ob (панели А и D), мышей C57b1/Ks db/db (панели В и Е) и мышей CBA/J +/+ (панели С и F). Потребление пищи мышами измеряли ежедневно, и массу тела регистрировали в три-четыре дня, как указано. (Шкала массы тела в граммах отличается для мышей дикого типа в сравнении с мышами ob и db. Прием пищи у мышей ob, получающих белок, после первой инъекции снижали и стабилизировали через четвертый день на уровне приблизительно 40% от уровня, наблюдаемого в группе, введенной в штрэм ($p < .001$). Масса тела этих животных уменьшилась в среднем 1,3 г/день и стабилизировалась через три недели до уровня приблизительно 60% от исходного веса ($p < 0001$). Никакого эффекта белка наглядно проявлялось у мышей db. Небольшие, но значимые эффекты на массу тела наблюдали у мышей линии CBA/J в два ранних момента времени ($p < .02$). Стандартная ошибка каждой меры представлена столбиком, и статистическая значимость этих результатов показана в таблице 1.

На фиг. 29 показаны результаты парковой кормления мышей ob. (А) Группа из четырех мышей C57b1/6J ob/ob подавали количество пищи, равное количеству пищи, потребляемому группой мышей ob, получавших рекомбинантный белок. Потерю массы для обеих групп рассчитывали через пять, восемь и двенадцать дней. Мышей, ограниченных пищевыми продуктами, потеряли (заштрихованный столбик) меньше массы, чем у мышей ob, получавших

белок (сплошная полоса) ($p < .02$). Этот результат указывает на то, что эффект снижения веса белка ОВ является результатом воздействия как на потребление пищи, так и на расход энергии. (В) Фотография обработанной об мыши. Показаны две мыши C57b1/6J ob/ob. Мышь слева получила PBS и отвечивала 65 грамм, что являлось исходной массой. Мышь справа получала ежедневные инъекции рекомбинантного белка ОВ. Исходная масса этого животного также составляла 65 г, а вес после трех недель обработки белка составлял 38 г. (С) Liver от обработанных и необработанных об мышей. Показаны ливеры от обработанных и необработанных C57b1/6J ob/ob мышей. Печень от мышинного, принимающего PBS, имела брутто внешний вид жировой печени и отвечивала 5,04 грамма. Печень от мыши, получавшей рекомбинантный об белок, имел нормальный внешний вид и взвешивали 2,23 грамма.

На фиг. 30 показана гибридизация *in situ* ов к жировой ткани. Смысловую и антисмысловую об РНК метили *in vitro* с использованием полимеразы Sp6 и T7 и дигоксигенина. Меченые РНК гибридизовали с парафиновыми внедренными участками жировой ткани из эпидидимальных жировых подушечек мышей C57b1/Ks в возрасте восьми недель (меченых мышей дикого типа) и мышей C57b1/Ks db/db (меченые db). На фигуре липидные капли выглядят как неокрашенные вакуоли внутри клеток. Цитоплазма представляет собой тонкий ободок на периферии клеток и неотличима от клеточной мембраны. Гибридизацию со всеми адипоцитами в поле детектировали в секциях дикого типа только с использованием антисмыслового зонда и значительно увеличенные уровни наблюдали в секциях ткани от животных db/db.

На фигуре 31 показано, что РНК ОВ экспрессируется в адипоцитах *in vivo* и *in vitro*. Общую РНК (10 мкг) из нескольких различных источников подвергали избирательной реакции на блоттинг и гибридизовали с об-зондом. Во-первых, для очистки адипоцитов использовали различия в плавучести клеток после расщепления коллагеназы. РНК ОВ присутствовала только в фракции адипоцитов. Дорожка S обозначает стромоваскулярную фракцию, а А обозначает фракцию адипоцитов. Кроме того, РНК ОВ не экспрессируется в недифференцированных клетках преадипоцитов 3T3 -442, где дифференцированные адипоциты из этих клеточных линий экспрессировали четко обнаруживаемые уровни мРНК ОВ (дорожка D).

Фиг. 32 показывает, что РНК ОВ экспрессируется во всех депо жировой ткани. Все тестируемые депо жировой ткани экспрессировали В-РНК. Паховая жировая прокладка экспрессировала несколько более низких уровней РНК, хотя в различных экспериментах была вариабельность уровня сигналов. (Фиг. 31 А) Дорожки (1) эпидидимальная (2) паховая (3) абдоминальная (4) параметризованная жировая подушечка. Коричневый жир также экспрессирует низкий уровень РНК ОВ. (Фиг. 31В) Уровень экспрессии ОВ в коричневом жире не изменялся у животных, размещенных при 4° С в течение одной недели, в то время как распространенность коричневой жироспецифической UCP РНК, известная как индуцируемая холодом, увеличивалась в пять раз.

Фигура 33 показывает экспрессию ОВ РНК в db/db и мышях, обработанных тиоглюкозой золота. Общую РНК из параметризованных жировых подушечек золотых тиоглюкозы (GTG) и мышей, обработанных db/db, подвергали электрофоретическому и северному блоттингу. Известно, что GTG, вводимая в виде разовой дозы, вызывает ожирение посредством индукции специфических гипоталамических поражений. (А) Самкам-женщинам СВА в возрасте одного месяца обрабатывали GTG (2 мг/г), с результирующим увеличением > 20 г у обработанных животных по сравнению с контрольными животными (< 5 г). (В) Гибридизация ОВ-зонда с РНК из мышей, обработанных db/db и GTG, показала двадцатикратное увеличение представленности ОВ-РНК относительно контрольной РНК (актин или GAPDH).

ФИГУРА 34 представляет собой нозерн-блот-анализ РНК человека. Нозерн-блоты, содержащие 10 мг общей РНК из жировой ткани человека (FAT, панель А) и 2 мг поли А + РНК из других тканей человека (панель В), гибридизировали с человеческими b-актиновыми зондами, как указано. Интенсивный сигнал приблизительно 4,5 кб наблюдался с тотальной РНК

жировой ткани. Гибридизация с поли А + РНК выявила обнаруживаемые сигналы в сердце (HE) и плаценте (PL), тогда как РНК ОВ не была обнаружена в мозге (BR), легких (LU), печени (LI), скелетных мышцах (SM), почках (KI) и поджелудочной железе (PA). В каждом случае показана длина авторадиграфического воздействия. Следует отметить, что генез нижних молекулярных полос, наблюдаемых в плацентарной РНК (например, альтернативный сплайсинг, деградация РНК), не известен.

На фиг. 35 представлен контиг YAC, содержащий ген ОВ человека и 8 маркеров микросателлитов. Показана карта содержания STS, основанная на YAC, области хромосомы 7, содержащей ген ОВ человека, на основе Seegmapnersion 3.29 [Green et al. PCR Methods Applicic. , 1:77-90 (1991)]. 19 однозначно упорядоченных STS (см. таблицу 3) перечислены вдоль верха. STS с 8 микроспутниками обозначены звездочками (см. Таблицу 4). Также указаны STS, соответствующие генам Рах4 и ОВ, а также прогнозируемые положения центромеры (CEN) и 7q теломер (TEL) относительно контига. Каждый из 43 клонов YAC изображен горизонтальной перекладиной, при этом ее название давало левому и расчетному размеру YAC (в kb, измеренное методом гель-электрофореза в импульсном поле), обеспечиваемое в скобках. Присутствие STS в YAC обозначено темной окружностью в соответствующем положении. Когда STS соответствует концу вставки YAC, вокруг соответствующей окружности размещают квадрат как вдоль верха (вблизи имени STS), так и в конце YAC, из которого он был получен. Для 5 YAC в нижней части (ниже горизонтальной пунктирной линии), 1 или более STS, ожидаемых, которые должны присутствовать (на основе установленного порядка STS), не были обнаружены (как оценены посредством тестирования отдельных YAC с помощью соответствующего S-специфичного (ых) анализа (ов) ПЦР по меньшей мере дважды), и они изображены в виде незамкнутых кругов в соответствующих положениях. Большинство YAC выделяли из библиотеки, полученной из гибридных клеток человека-хомяка [Green et al. Genomics, 25: 170-183 (1995)], с их исходными названиями, как указано. Оставшиеся YAC выделяли из общих геномных библиотек человека, и их исходные положения библиотеки представлены в Таблице 3. Боксы размещены вокруг имен 3 YAC (yWSS691, yWSS999 и yWSS2935), которые были обнаружены с помощью анализа FISH для отображения на 7q313, контиг отображается в его "невывчисленной" форме, где размеры YAC не используются для оценки перекрытия клонов или разнесения STS, и все STS, таким образом, расположены на одинаковом расстоянии друг от друга. В "вывчисленной" форме, где YAC-размеры используются для оценки относительного расстояния, разделяющего каждую пару соседних STS, а также степень перекрытия клонов, общий контиг YAC появляется в диапазоне чуть более 2 Мб.

ДЕТАЛИЗАЦИЯ СВЕТОДИОДОВ

Настоящее изобретение относится к выявлению и открытию белка, называемого в настоящем документе полипептидом или лептином, нуклеиновым кислотам, кодирующим белок, включая их вырожденные изменения, например которые включают оптимальные кодоны для экспрессии в конкретной системе экспрессии, которая демонстрирует способность участвовать в контроле массы тела млекопитающего. Нуклеиновые кислоты в объекте представляют кодирующие последовательности, соответствующие полипептиду ОВ мыши и человека, который постулируется, чтобы играть важную роль в регуляции массы тела и ожирения. Представленные в настоящем документе данные указывают на то, что полипептидный продукт нуклеиновой кислоты по изобретению секретируется клетками, которые экспрессируют его, и что полипептид функционирует как гормон. Дополнительные экспериментальные данные демонстрируют, что полипептид ОВ является очень эффективным при лечении ожирения у мышей, несущих мутацию гена об. Кроме того, высокие болюсные дозы или умеренные непрерывные дозы полипептида ОВ снижают вес у нормальных мышей (дикого типа).

Кроме того, примеры в настоящем документе демонстрируют, что полипептид ОВ, альтернативно называемый в настоящем документе "лептином", циркулирует у мыши, крысы и плазмы человека. Лептин отсутствует в плазме у мышей ob/ob и присутствует в десятикратных более высоких концентрациях в плазме у мышей db/db и в двадцать раз более высоких концентраций у крыс fa/fa. Наиболее значимо, ежедневные инъекции рекомбинантного лептина резко снижают массу тела мышей ob/ob, значительно влияют на массу тела мышей дикого типа и не оказывают влияния на мышей db/db.

В дополнительном аспекте полипептид ОВ из одного вида биологически активен в других видах. В частности, полипептид ОВ человека активен у мышей.

В своем первичном аспекте настоящее изобретение направлено на идентификацию материалов, которые функционируют как модуляторы массы тела млекопитающего. В частности, изобретение относится к выделению, очистке и секвенированию определенных нуклеиновых кислот, которые соответствуют гену ОВ или его кодирующей области как у мышей, так и у людей, а также к соответствующим полипептидам, экспрессируемым этими нуклеиновыми кислотами. Таким образом, изобретение включает обнаружение нуклеиновых кислот, имеющих нуклеотидные последовательности, представленные на фиг. 1A-E (SEQ ID NO: 1) и фиг. 2 A и B (SEQ ID NO: 3), и вырожденные варианты, аллели и их фрагменты, все из которых обладают активностью модуляции массы тела и ожирения. Соответствие настоящих нуклеиновых кислот по отношению к гену ОВ проявляет значительное влияние на такие состояния, как ожирение, а также другие нарушения и дисфункции, где аномалии в массе тела являются сопутствующим фактором. Изобретение распространяется на белки, экспрессируемые нуклеиновыми кислотами по изобретению, и, в частности, к белкам, представленным на фиг. 1A-E (SEQ ID NO: 2), фиг. 3 (SEQ ID NO: 4), фиг. 5 (SEQ ID NO: 5) и фиг. 6 (SEQ ID NO: 6), а также к консервативным вариантам, активным фрагментам и конъюнктивным малым молекулам.

Как обсуждалось ранее, пептиды-модуляторы контроля веса или их связывающие партнеры или другие лиганды или агенты, проявляющие либо мимикрию, либо антагонизм к ним, или контроль их продукции, могут быть получены в фармацевтических композициях, с подходящим носителем и с прочностью, эффективной для введения различными способами пациенту, испытывающему аномальные колебания массы тела или ожирения, либо сами по себе, либо как часть неблагоприятного медицинского состояния, такого как рак или СПИД, для их лечения. Могут быть использованы различные способы введения, в том числе пероральное введение, назальные и другие формы трансмукозального введения, парентеральные методы, такие как подкожные, внутривенные и внутривенные инъекции, катетеризации и тп. Средние количества факторов распознавания или их субъединиц могут варьироваться и, в частности, должны быть основаны на рекомендациях и назначении квалифицированного врача или ветеринара.

В соответствии с вышеизложенным, может быть получена аналитическая система для скрининга потенциальных лекарственных средств, эффективных для имитации или антагонизирования активности модулятора веса. Модулятор веса может быть введен в тест-систему, и предполагаемое лекарственное средство также может быть введено в полученную культуру клеток, и после этого культуру исследовали, чтобы наблюдать любые изменения активности клеток, обусловленные добавлением только предполагаемого лекарственного средства, или из-за влияния добавленных количеств известного весового модулятора.

Как указано выше, молекулярное клонирование гена ОВ, описанного в настоящем документе, привело к идентификации класса материалов, которые функционируют на молекулярном уровне, чтобы модулировать массу тела млекопитающего. Открытие модуляторов по изобретению имеет важные последствия для диагностики и лечения нарушений питания, включая, но не ограничиваясь ими, ожирение, потерю веса, связанную с раком, и лечение заболеваний, связанных с ожирением, таких как гипертензия, болезнь сердца и Betes I

типа. Кроме того, существуют потенциальные сельскохозяйственные применения для генного продукта в случаях, когда может пожелать модулировать массу тела домашних животных. Наконец, в той степени, в которой один или более модуляторов по изобретению являются секретлируемыми молекулами, они могут быть использованы биохимически для выделения их рецептора с использованием технологии клонирования экспрессии. Обсуждение, которое следует с конкретной ссылкой на ген ОВ, несет общую применимость к классу модуляторов, которые содержат часть настоящего изобретения, и поэтому должно соответствовать такой широте и объему интеллекта.

Как отмечено выше, функциональная активность полипептида ОВ может быть оценена трансгенно. В этом отношении можно использовать модель трансгенной мыши. Ген *ob* может быть использован в дополнении к исследованиям с использованием трансгенных мышей. Трансгенные векторы, включая вирусные векторы или космидные клоны (или фаговые клоны), соответствующие локусу дикого типа гена-кандидата, могут быть сконструированы с использованием выделенного гена *ob*. Космиды могут быть введены в трансгенные мыши с использованием опубликованных процедур [Jaenisch, Science, 240: 1468-1474 (1988)]. Конструкции вводят в оплодотворенные яйца, полученные из межперекрестного скрещивания между потомством F1 линии C57BL/6J *ob/ob* X DBA. Эти скрещивания требуют использования трансплантатов линии C57BL/6J *ob/ob* яичника для получения F1 животных. Мышей DBA/2J используют в качестве контрастного штамма, поскольку они имеют нормальный цвет покрытия, что важно при использовании трансплантатов яичника. Генотип в отношении локусов в космидных трансгенных животных можно определить путем типирования животных с плотно сцепленными RFLP или микроспутниками, которые фланкируют мутацию и которые являются полиморфными между штаммами-предшественниками. Комплементация будет продемонстрирована, когда конкретная конструкция делает генетически обследуемым животному F2 (как оценивали с помощью анализа RFLP) обедненным и недиабетическим. В этих обстоятельствах окончательное доказательство комплементации будет требовать, чтобы животное *ob/ob* или *db/db*, переносящее трансген, было сопряжено с трансплантатами яичника *ob/ob* или *db/db*. При этом все N2 животных, которые не несут трансген, будут ожирением и резистентным к инсулину/диабетом, тогда как те, которые несут трансген, будут обеднены и имеют нормальную концентрацию глюкозы и инсулина в плазме. В генетическом смысле трансген действует как супрессорная мутация.

Альтернативно, гены ОВ могут быть протестированы путем исследования их фенотипических эффектов при экспрессии в антисмысловой ориентации у животных дикого типа. При таком подходе экспрессия аллеля дикого типа подавляется, что приводит к мутантному фенотипу. РНК-РНК дуплексное образование (антисмысловой-смысловой) предотвращает нормальную обработку мРНК, что приводит к частичному или полному устранению эффекта гена дикого типа. Этот метод использовали для ингибирования синтеза ТК в культуре ткани и получения фенотипов мутации Krupel в *Drosophila*, и мутации Shiverer у мышей Izant et al. Cell, 36: 1007-1015 (1984); Green et al. , Annu. Rev. Biochem. 55: 569-597 (1986); Katsuki et al. Science, 241: 593-595 (1988). Важным преимуществом этого подхода является то, что только небольшая часть гена должна быть экспрессирована для эффективного ингибирования экспрессии всей конъюгтной мРНК. Антисмысловой трансген будет размещен под контролем своего собственного промотора или другого промотора, экспрессируемого в правильном типе клеток, и размещен выше по потоку от сайта Sv40 polyA. Этот трансген будет использоваться для получения трансгенных мышей. Трансгенные мыши также будут сопряженными трансплантатами яичников для тестирования, являются ли гетерозиготы более чувствительными к эффектам антисмысловой конструкции.

В течение длительного времени выяснение биохимической функции продукта гена ОВ (полипептида или белка ОВ) полезно для идентификации низкомолекулярных агонистов и антагонистов, которые влияют на его активность.

Различные термины, используемые в настоящем описании, должны иметь определения, приведенные в настоящем документе, например, ниже.

Термин "модулятор массы тела", "модулятор", "модуляторы" и любые варианты, конкретно не перечисленные, могут быть использованы в настоящем документе взаимозаменяемо, и как используется в настоящей заявке и формуле изобретения, относится в одном случае к обоим нуклеотидам и к белковому материалу, причем последний включает как один, так и множество белков. Более конкретно, вышеупомянутые термины распространяются на нуклеотиды и ДНК, имеющие последовательности, описанные в настоящем документе и представленные на фиг. 1A-E (SEQ ID NO: 1), и фиг. 2A и B (SEQ ID NO: 3). Аналогично, белки, имеющие данные аминокислотной последовательности, описанные в настоящем документе и представленные на фиг. 1A-E (SEQ ID NO: 2), и фиг. 3 (SEQ ID NO: 4), также рассматриваются, как и профиль действий, изложенных в отношении всех материалов, как в настоящем описании, так и в формуле изобретения. Соответственно, нуклеотиды, демонстрирующие, по существу, эквивалентную или измененную активность, также рассматриваются, включая, по существу, гомологичные аналоги и аллельные вариации. Аналогично, белки, демонстрирующие, по существу, эквивалентную или измененную активность, включая белки, специально модифицированные, как, например, сайт-направленным мутагенезом, или случайным образом через мутации в хозяевах, которые продуцируют модуляторы, также предполагаются.

Композиция, содержащая "А" (где "А" представляет собой единственный белок, молекула ДНК, вектор, рекомбинантная клетка-хозяин и тд) по существу не содержит "В" (где "В" содержит один или более загрязняющих белков, молекул ДНК, векторов и тд, но исключая рацемические формы А), когда по меньшей мере примерно 75% по массе белков, ДНК, векторов (в зависимости от категории видов, к которым принадлежат А и В) в композиции, является "А". Предпочтительно "А" содержит по меньшей мере примерно 90% по массе видов А + В в композиции, наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 99% по массе. Также предпочтительно, чтобы композиция, которая по существу не содержала загрязнения, содержала только один вид молекулярной массы, обладающий активностью или характеристикой представляющего интерес вида.

Полипептиды ОВ

Термины "белок", который относится к встречающемуся в природе полипептиду, и "полипептид" используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к продукту гена ов и его вариантам. Термин "зрелый белок" или "зрелый полипептид", в частности, относится к продукту гена ОВ с удаленной сигнальной последовательностью (или партнером слитого белка).

Как отмечено выше, в конкретных вариантах осуществления полипептиды по изобретению включают те, которые имеют аминокислотные последовательности, изложенные в настоящем документе, например SEQ ID NO: 2,4,5, 6 и тд, включая полипептид ов, модифицированный консервативными аминокислотными заменами, а также биологически активные фрагменты, аналоги и их производные. Термин "биологически активный" используется в настоящем документе для обозначения специфического эффекта полипептида, включая, без ограничений, специфическое связывание, например -к рецептору, антителу или другой распознающей молекуле; активации путей сигнальной трансдукции на молекулярном уровне; и/или индукции (или ингибированию антагонистами) физиологических эффектов, опосредованных нативным ов-полипептидом *in vivo*. Полипептиды ОВ, включая фрагменты, аналоги и производные, могут быть получены синтетически, например, с использованием хорошо известных методик твердофазного или твердофазного синтеза пептидов. Предпочтительно используют методы твердофазного синтеза. Альтернативно, полипептиды ОВ по изобретению могут быть получены с использованием хорошо известных методов генной инженерии, как описано ниже. В еще одном варианте осуществления полипептид ОВ может быть очищен, например, с помощью иммуноаффинной очистки, из биологической жидкости,

такой как, без ограничений, плазма, сыворотка или моча, предпочтительно человеческая плазма, сыворотка или моча, и более предпочтительно от субъекта, который сверхэкспрессирует полипептид, такой как ожирение человека, страдающего мутацией в ОВ-рецепторе, или от ожирения, связанного с мутацией, соответствующей "жирному жиру". "

Фрагменты полипептида ОВ

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предполагает, что встречающиеся в природе фрагменты полипептида ОВ могут быть важными. Пептидная последовательность включает ряд сайтов, которые часто являются мишенью для протеолитического расщепления, например, остатки аргинина. Возможно, что полноразмерный полипептид может быть расщеплен на одном или нескольких таких участках с образованием биологически активных фрагментов. Такие биологически активные фрагменты могут либо противодействовать, либо противодействовать функциональной активности полипептида ОВ для снижения массы тела.

Аналоги полипептида ОВ

Настоящее изобретение, в частности, предполагает получение аналогов пептида ОВ, которые характеризуются способностью к биологической активности полипептида ОВ, например связывание с конкретным связывающим партнером об пептида, таким как ОВ рецептор. В одном варианте осуществления аналог детектирует активность ОВ, те он функционирует аналогично оксиду об. Предпочтительно, агонист ОВ является более эффективным, чем нативный белок. Например, аналог агониста ОВ может связываться с рецептором ОВ с более высокой аффинностью или демонстрировать более длительный период полужизни *in vivo*, или и то, и другое. Тем не менее, также предполагаются аналоги-агонисты ОВ-пептида, которые являются менее эффективными, чем нативный белок. В другом варианте осуществления аналог антагонизирует активность ОВ. Например, аналог ОВ, который связывается с рецептором ОВ, но не индуцирует трансдукцию сигнала, может конкурентно ингибировать связывание нативного ОВ с рецептором, таким образом снижая активность ОВ *in vivo*. Такой аналог антагониста ОВ также может демонстрировать различные свойства из об пептида, например, более длительный (или более короткий) период полувыведения *in vivo*, большую (или меньшую) аффинность связывания для ОВ рецептора, или и то, и другое.

В одном варианте осуществления аналог ОВ-пептида представляет собой ОВ-пептид, модифицированный замещением аминокислот в положениях на полипептиде, которые не являются существенными для структуры или функции. Например, поскольку известно, что пептид ОВ человека является биологически активным у мыши, замена расходящихся аминокислотных остатков в человеческой последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью мыши, вероятно, будет давать полезные аналоги ОВ пептида. Например, остаток серина в положении 53 или положении 98 или оба (в необработанной пептидной последовательности, изображенной на фиг. 4) от человека могут быть заменены, например, с глицином, аланином, валином, цистеином, метионином или треонином. Аналогичным образом, остаток аргинина в положении 92 (фиг. 4) может быть замещен, например, аспарагином, лизином, гистидином, глутамином, глутаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой, серином, треонином, метионином или цистеином. Как показано на фиг. 4, другие аминокислоты в человеческом ОВ-пептиде, которые, по-видимому, являются способными к замене, представляют собой гистидин в положении 118, триптофан в положении 121, аланин в положении 122, глутаминовую кислоту в положении 126, треонин в положении 127, лейцин в положении 128, глицин в положении 132, глицин в положении 139, триптофан в положении 159 и глицин в положении 166. В другом варианте осуществления можно заменить один или более из остатков 121 на 128 (как показано на фиг. 4), например, глицином или аланинами, или замещением некоторых из остатков исключениями серина в качестве положения 123 или лейцина в положении 125.

В другом варианте осуществления аналог полипептида ОВ, предпочтительно полипептид ОВ человека, представляет собой усеченную форму полипептида. Например, уже было

продемонстрировано, что глутамин в остатке 49 не является существенным и может быть удален из пептида. Аналогично, можно удалить некоторые или все расходящиеся аминокислотные остатки в положениях 121 -128. Кроме того, изобретение предусматривает обеспечение аналога ОВ, имеющего минимальную аминокислотную последовательность, необходимую для биологической активности. Это может быть легко определено, например, путем тестирования активности фрагментов ОВ на способность связываться с ОВ-специфическими антителами, ингибирования активности нативного полипептида ОВ или агонизирования активности нативного пептида ОВ. В одном варианте осуществления изобретение относится к усеченному полипептиду ОВ, состоящему из петлевой структуры, образованной дисульфидной связью, которая образуется между цистеиновыми остатками 117 и 167 (как показано на фиг. 4). В другом варианте осуществления усеченный аналог соответствует аминокислотам из остатка 22 (который следует предполагаемому сайту расщепления пептидного пептида) до 53 (аминокислотный остаток, непосредственно предшествующий гибкому участку петли, обнаруженному при ограниченном протеолизе, с последующим масс-спектрометрическим анализом полипептида ОВ; см. Cohen et al. Protein Science, 4: 1088 (1995)). В другом варианте осуществления усеченный аналог соответствует аминокислотам из остатка 61 (остаток, непосредственно следующий за областью гибкой петли, как определено с помощью ограниченного протея/масс-спецификации, анализа полипептида ОВ) на аминокислотный остаток 116 (остаток, непосредственно предшествующий первому остатку цистеина). В еще одном варианте осуществления усеченный аналог соответствует аминокислотам от остатка 61 до аминокислотного остатка 167.

Кроме того, один или более остатков предполагаемой гибкой петли в количестве остатков от 54 до 60 являются замещенными. Например, один или более остатков могут быть заменены лизином, глутаминовой кислотой или цистеином (предпочтительно лизином) для сшивания, например, с полимером, поскольку гибкие петлевые структуры являются предпочтительными сайтами для дериватизации белка. Альтернативно, остатки в положениях гибких петель могут быть заменены аминокислотными остатками, которые являются более устойчивыми к протеолизу, но которые сохраняют гибкую структуру, например, одну или более пролиний. В еще одном варианте осуществления предусматриваются замены аминокислотными остатками, которые могут быть дополнительно дериватизированы, чтобы сделать их более устойчивыми к деградации, например протеолизу.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что вышеупомянутые размеры фрагментов являются приблизительными, и что от одной до приблизительно пяти аминокислот могут быть включены или удалены из каждого или обоих концов, или из внутренней части полипептида или его фрагментов, указанных усеченных аналогов, за исключением того, что в дисульфидных связных аналогах должны поддерживаться остатки цистеина.

Было обнаружено, что мышинный ОВ пептид содержит 50% α -спирального содержания, и что полипептид ОВ человека содержит приблизительно 60% α -винтового содержания, как обнаружено посредством кругового дихроизма рекомбинантных пептидов при почти физиологических условиях. Соответственно, в другом варианте осуществления аминокислотные остатки могут быть заменены на остатки с образованием аналогов полипептида ОВ, которые демонстрируют повышенную склонность к образованию или которые образуют более стабильные α -спиральные структуры. Например, структура α -спирали может быть предпочтительной, если Glu, Ala, Leu, His, Trp вводятся в качестве заменителей аминокислотных остатков, обнаруженных в нативном полипептиде ОВ. Предпочтительно используют консервативные аминокислотные замены, например -замена аспарагиновой кислоты на остаток (- ы) 29,30,44, 61, 76, 100 и/или 106 (как показано на фиг. 4) на глутаминовую кислоту (- ы) (Glu);-замену изолейцина (изолейцина) на лейцин; замену глицина или валина или любой расходящейся аминокислоты на аланин (е. г. серин в положении 53 полипептида ОВ человека с аланином), замену аргинина или лизина на гистидин и замену тирозина и/или фенилаланина триптофаном. Увеличение степени или, что более важно,

стабильность структуры α -спирали может давать аналог ОВ с большей активностью, повышенной аффинностью связывания или более длительным периодом полувыведения. В конкретном варианте осуществления увеличивается потенциал образования спирали части ОВ-пептида, соответствующего аминокислотным остаткам 22 -53. В другом варианте осуществления потенциал образования спирали или стабильность аминокислотных остатков 61-116 увеличивается. В еще одном варианте осуществления увеличивается потенциал образования спирали дисульфидной петлевой структуры, соответствующей аминокислотам 117-167. Также предусмотрены аналоги ОВ, содержащие повышенный α -спиральный потенциал или стабильность в более чем одном из вышеуказанных доменов. В дополнительном варианте осуществления, образуются укороченные аналоги полипептида ОВ, которые включают структурообразование, например, геликообразование, аминокислотные остатки для компенсации большей склонности фрагментов полипептида к отсутствию стабильной структуры.

Аналоги, такие как фрагменты, могут быть получены, например, путем расщепления пепсином пептидного материала модулятора веса. Другие аналоги, такие как мутеины, могут быть получены стандартным сайт-направленным мутагенезом пептидных кодирующих последовательностей модулятора веса. Аналоги, проявляющие "активность модулятора веса", такие как малые молекулы, функционирующие в качестве промоторов или ингибиторов, могут быть идентифицированы с помощью анализов *in vivo* и/или *in vitro*.

Аналоги малых молекул и пептидомиметики полипептида ОВ

Структура полипептида об, предпочтительно полипептида ОВ человека, может быть проанализирована различными способами, известными в данной области техники. Белковая последовательность может быть охарактеризована анализом гидрофильности [например, Norrr et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 3824 (1981)]. Профиль гидрофильности может быть использован для идентификации гидрофобных и гидрофильных областей полипептида ОВ, которые могут указывать области, утопленные во внутренней части сложенного полипептида, и области, доступные на внешней стороне полипептида. Кроме того, можно также проводить вторичный структурный анализ [например, Chou et al, Biochem. 13: 222 (1974)], чтобы идентифицировать области полипептида ОВ, которые предполагают специфические вторичные структуры. Манипулирование прогнозируемой или определенной структурой, включая прогнозирование вторичной структуры, может быть выполнено с использованием компьютерных программ, доступных в данной области техники.

Путем обеспечения обильного источника рекомбинантного полипептида ОВ настоящее изобретение позволяет количественно определять структурное определение полипептида. В частности, достаточно материала для ядерного магнитного резонанса (ЯМР), инфракрасного (ИК), рамановского и ультрафиолетового (УФ), особенно кругового дихроизма (CD), спектроскопического анализа. В частности, ЯМР обеспечивает очень мощный структурный анализ молекул в растворе, что более близко аппроксимирует их нативную среду [Marion et al. Biochim. Biophys. Res. Comm. , 113: 967-974 (1983); Bar et al. J Magn. Кремен. , 65: 355-360 (1985); Kimura et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 1681-1685 (1980)]. Также могут быть использованы другие способы структурного анализа. Они включают, без ограничений, рентгеновскую кристаллографию [Engstrom, Biochem. Exp. Biol, 11: 7-13 (1974)].

В еще одном дополнительном варианте осуществления аналог полипептида ОВ может быть протестирован для определения, реагирует ли он с антителом, специфичным для нативного полипептида ОВ, или его специфическими фрагментами. Степень перекрестной реактивности обеспечивает информацию о структурной гомологии или сходстве белков или о доступности областей, соответствующих частям полипептида, которые использовали для получения специфических для фрагментов антител.

Скрининг на аналоги ОВ

В данной области известны различные методы скрининга для скрининга аналогов полипептидов. Доступны различные библиотеки химических веществ. Соответственно,

настоящее изобретение предполагает скрининг таких библиотек, например библиотек синтетических соединений, полученных в течение многих лет исследований, библиотек природных соединений и комбинаторных библиотек, как более подробно описано ниже, для аналогов полипептида ОВ. В одном варианте осуществления изобретение предусматривает скрининг таких библиотек для соединений, которые связываются с антителами против ОВ полипептида, предпочтительно антитела к полипептиду человека об. В другом аспекте после идентификации рецептора ОВ (см. ниже) любой способ скрининга, известный в данной области техники, может быть использован для скрининга агонистов или антагонистов ОВ рецепторов. Настоящее изобретение относится к экранам для низкомолекулярных лигандов или аналогов и миметиков лигандов, а также к экранам для природных лигандов, которые связываются с и агонизируют или антагонизм активируют ОВ рецептор *in vivo*.

Знание первичной последовательности рецептора и сходство этой последовательности с белками известной функции может обеспечить первоначальную комку в отношении агонистов или антагонистов белка. Идентификация и скрининг антагонистов дополнительно облегчается путем определения структурных признаков белка, например, с использованием рентгеновской кристаллографии, нейтронной дифракции, ядерной магнитно-резонансной спектроскопии и других методик определения структуры. Эти методы обеспечивают рациональную конструкцию или идентификацию агонистов и антагонистов.

Другой подход использует рекомбинантный бактериофаг для получения больших библиотек. Используя "фаговый метод" [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)], можно сконструировать очень большие библиотеки (10⁸-10⁹ химических объектов). Второй подход использует в основном химические способы, из которых способ Geysen [Geysen et al, *Molecular Immunology*, 23: 709-715 (1986); Geysen et al. *J Immunologic Method*, 102: 259-274 (1987)] и недавний способ Fodor et al. *Science*, 251: 767-773 (1991) являются примерами. 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 (патент США № 4,631,211, выданный December 1986); и Rutter et al. (патент США № 5010175, выданный 23 апреля 1991) описывают способы получения смеси пептидов, которые могут быть протестированы в качестве агонистов или антагонистов.⁶⁸

В другом аспекте синтетические библиотеки [Needels et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10700-10704 (1993); Lam et al. *International Patent Publication No. WO 92/00252*, каждый из которых в полном объеме присутствует в данном документе по ссылке], и тп могут быть использованы для скрининга лигандов ОВ-рецепторов в соответствии с настоящим изобретением. С такими библиотеками антагонисты рецепторов могут быть обнаружены с использованием клеток, которые экспрессируют рецептор без фактического клонирования ОВ-рецептора.

Альтернативно, можно проводить анализы связывания растворимого лиганда с клетками, которые экспрессируют рекомбинантные формы связывающего домена лиганда ОВ. Растворимые лиганды легко могут быть предоставлены в виде рекомбинантного или синтетического полипептида ОВ.

Скрининг может быть выполнен с рекомбинантными клетками, которые экспрессируют ОВ рецептор, или, альтернативно, с использованием очищенного рецепторного белка, например, полученного рекомбинантным способом, как описано выше. Например, способность меченого, растворимого или солюбилизованного ОВ-рецептора, которая включает лиганд-связывающую часть молекулы, для связывания лиганда может быть использована для скрининга библиотек, как описано в приведенных выше ссылках.

Производные ОВ полипептидов

Как правило, настоящий белок (в настоящем документе термин "белок" используется для включения "полипептида", если не указано иное), может быть дериватизировано путем присоединения одного или нескольких химических фрагментов к фрагменту белка. Химически

модифицированные производные могут быть дополнительно составлены для внутриартериального, внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутривенного, перорального, назального, ректального, понижающего, подъязычного, легочного, местного, трансдермального или других путей введения. Было обнаружено, что химическая модификация биологически активных белков обеспечивает дополнительные преимущества при определенных обстоятельствах, таких как повышение стабильности и времени циркуляции терапевтического белка и снижение иммуногенности. См. патент США № 4,179,337, Davis и др. выданный 18 декабря 1979г. Для обзора см. Abuschowski et al. "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", in *Enzymes as Drugs*, pp. 367 -383, Holcenberg and Roberts, eds. , Wiley-Interscience, New York, NY, (1981). Обзорным изданием, описывающим модификацию белка и слитые белки, является Francis, *Focus on Growth Factors*, 3: 4-10 (1992).

Химические фрагменты для дериватизации

Химические фрагменты, подходящие для дериватизации, могут быть выбраны из водорастворимых полимеров. Выбранный полимер должен быть водорастворимым, так что белок, к которому он присоединен, не осаждается в водной среде, такой как физиологическая среда. Предпочтительно для терапевтического применения препарата конечного продукта полимер будет фармацевтически приемлемым. Специалист в данной области техники сможет выбрать желаемый полимер на основе таких соображений, как то, будет ли использован конъюгат полимер/белок терапевтически, и если да, желаемая дозировка, время циркуляции, устойчивость к протеолизу и другие соображения. Для настоящих белков и пептидов они могут быть выявлены с использованием анализов, представленных в настоящем документе.

Полимерные молекулы

Водорастворимый полимер может быть выбран из группы, состоящей из, например, полиэтиленгликоля, сополимеров этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозы, декстрана, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, поли -1, 3-диоксолана, поли -1,3,6-триоксана, сополимера этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислот (либо гомополимеров, либо статистических сополимеров), и декстрана или поли (н-винилпирролидона) полиэтиленгликоля, гомополимеров пропропиленгликолей, сополимеров полипропилена и оксида этилена, полиоксиэтилированных полиолов и поливинилового спирта. Polyethylene glycol propionaldehyde может обеспечить преимущества в производстве из-за его стабильности вводе.

Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Для полиэтиленгликоля предпочтительная молекулярная масса составляет от около 2 кДа до около 100 кДа (термин "около" указывает на то, что в препаратах полиэтиленгликоля некоторые молекулы будут весить больше, несколько меньше, чем указанная молекулярная масса) для облегчения обращения и производства. Могут быть использованы другие размеры, в зависимости от желаемого терапевтического профиля (например, от продолжительности желаемого продолжительного высвобождения, эффекты, если они имеются на биологической активности, легкость в обращении, степень или отсутствие антигенности и другие известные эффекты полиэтиленгликоля на терапевтический белок или аналог).

Соотношение полимер/белок

Количество прикрепленных таким образом полимерных молекул может варьироваться, и специалист в данной области сможет определить влияние на функцию. Можно получить моно-дериватизацию или можно обеспечить ди -, три -, тетра-или некоторую комбинацию дериватизации с одинаковыми или различными химическими группами (например, полимерами, такими как различные массы полиэтиленгликолей). Доля молекул полимера к молекулам белка (или пептида) будет варьироваться, как и их концентрации в реакционной смеси. В общем, оптимальное соотношение (с точки зрения эффективности реакции в том, что отсутствует избыток непрореагировавшего белка или полимера) будет определяться такими факторами, как желаемая степень дериватизации (например, моно, ди -, три-и тд), молекулярная

масса выбранного полимера, является ли полимер разветвленным или неразветвленным, и условия реакции.

Присоединение химического фрагмента к белку

Молекулы полиэтиленгликоля (или другие химические фрагменты) должны быть присоединены к белку с учетом влияния на функциональные или антигенные домены белка. Существует ряд способов прикрепления, доступных для специалистов в данной области техники, например, EP 0_401_384, включенный в настоящий документ путем ссылки (связывание PEG с G-CSF). См. также Malik et al. *Exp. Hematol*, 20: 1028-1035 (1992) (отчетное пегилирование GM-CSF с использованием трезилхлорида). Например, полиэтиленгликоль может быть ковалентно связан через аминокислотные остатки через реакционноспособную группу, такую как свободная амино-или карбоксильная группа. Реакционноспособные группы представляют собой те, с которыми может быть связана активированная молекула полиэтиленгликоля. Аминокислотные остатки, имеющие свободную аминогруппу, могут включать остатки лизина и N-концевые аминокислотные остатки, те аминокислотные остатки, имеющие свободную карбоксильную группу, могут включать остатки глутаминовой кислоты из остатков аспарагиновой кислоты и C-концевой аминокислотный остаток. Сульфгидрильные группы также могут быть использованы в качестве реакционноспособной группы для присоединения молекулы (молекул) полиэтиленгликоля. Предпочтительными для терапевтических целей является присоединение к аминогруппе, такой как присоединение на N-конце или лизиновой группе. Присоединение к остаткам, важным для связывания рецептора, следует избегать, если требуется связывание рецептора.

N-терминально химически модифицированные белки.

В частности, может потребоваться N-терминально химически модифицированный белок. С использованием полиэтиленгликоля в качестве иллюстрации настоящих композиций можно выбрать из множества молекул полиэтиленгликоля (по молекулярной массе, разветвлению и тд) долю молекул полиэтиленгликоля к молекулам белка (или пептида) в реакционной смеси, тип реакции пегилирования, подлежащей выполнению, и способ получения выбранного N-терминально пегилированного белка. Способ получения N-терминально пегилированного препарата (i. e. отделение этого фрагмента от других монопегилированных фрагментов, если это необходимо), может быть осуществлено путем очистки N-терминально пегилированного материала из популяции пегилированных белковых молекул. Селективная N-терминальная химическая модификация может быть осуществлена восстановительным алкилированием, которое использует дифференциальную реактивность различных типов первичных аминогрупп (лизин по сравнению с N-концом), доступных для дериватизации в конкретном белке. В соответствующих условиях реакции достигается практически селективная дериватизация белка на N-конце с полимером, содержащим карбонильную группу. Например, можно селективно N-терминально пегилат белка путем проведения реакции при pH, что позволяет получить преимущество рК. Различия между ε-аминогруппами остатков лизина и α-аминогруппой N-концевого остатка белка. Посредством такого селективного дериватационного присоединения водорастворимого полимера к белку контролируется: конъюгация с полимером происходит преимущественно на N-конце белка, и не происходит значительной модификации других реакционноспособных групп, таких как аминогруппы боковой цепи лизина. Используя восстановительное алкилирование, водорастворимый полимер может иметь тип, описанный выше, и должен иметь один реакционноспособный альдегид для соединения с белком. Может быть использован пропиональдегид полиэтиленгликоля, содержащий один реакционноспособный альдегид.

Нуклеиновые кислоты, ассоциированные с полипептидом ОВ

Как отмечено выше, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим полипептиды, а также к связанным геномным некодирующим последовательностям 5', 3' и интрону к гену ОВ. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы традиционные методы молекулярной биологии,

микробиологии и рекомбинантной ДНК в компетенции специалиста в данной области техники. Такие методы объяснены полностью в литературе. См. например, 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*, Volumes I and II, IRL Press, Ltd. Oxford, UK (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)]; иммобилизованных клеток и ферментов, IRL Press (1986)]; Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning*, Wiley, New York (1984). Особенно релевантными для настоящего изобретения являются стратегии выделения, клонирования, секвенирования, анализа и характеристики гена или нуклеиновой кислоты на основе хорошо известных методов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

"Репликон" представляет собой любой генетический элемент (например, плазида, хромосома, вирус), который функционирует как автономный блок репликации ДНК *in vivo*, те способный к репликации под собственным контролем.

"Вектор" представляет собой репликон, такой как плазида, фаг или космида, к которому может быть присоединен другой сегмент ДНК для того, чтобы привести к репликации прикрепленного сегмента.

"Кассета" относится к сегменту ДНК, который может быть вставлен в вектор в определенных сайтах рестрикции. Сегмент ДНК кодирует представляющий интерес полипептид, и кассета и сайты рестрикции предназначены для обеспечения вставки кассеты в соответствующую рамку считывания для транскрипции и трансляции.

"Гетерологичная" ДНК относится к ДНК, естественным образом расположенной в клетке, или в хромосомном сайте клетки. Предпочтительно гетерологичная ДНК включает ген, чужеродный для клетки.

Клетка была "трансфицирована" экзогенной или гетерологичной ДНК, когда такая ДНК введена внутрь клетки. Клетка была "трансформирована" экзогенной или гетерологичной ДНК, когда трансфицированная ДНК влияет на фенотипическое изменение. Предпочтительно трансформирующая ДНК должна быть интегрирована (ковалентно связана) в хромосомную ДНК, образующую геном клетки.

"Клон" представляет собой популяцию клеток, полученных из одной клетки или общего предка митозом.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты" относится к фосфатной сложноэфирной полимерной форме рибонуклеозидов (аденозин, гуанозин, уридин или цитидин; "молекулы РНК") или дезоксирибонуклеозидам (дезоксаденозин, дезоксигуанозин, дезокситимидин или дезоксицитидин; "молекулы ДНК") либо в одноцепочечной форме, либо в двухцепочечной спирали. Возможны двухцепочечные ДНК-ДНК, ДНК-РНК и РНК-РНК-спирали. Термин молекула нуклеиновой кислоты, и, в частности, молекула ДНК или РНК, относится только к первичной и вторичной структуре молекулы и не ограничивает его каким-либо конкретным третичным или четвертичным формами. Таким образом, этот термин включает двухцепочечную ДНК, найденную, среди прочего, в линейных или круглых молекулах ДНК (например, рестрикционных фрагментах), плазмидах и хромосомах. При обсуждении структуры конкретных двухцепочечных молекул ДНК последовательности могут быть описаны в настоящем документе в соответствии с нормальным соглашением только последовательности в направлении от 5' до 3' вдоль нетранскрибируемой цепи ДНК (те цепи, имеющей последовательность, гомологичную мРНК). "Рекомбинантная молекула ДНК" представляет собой молекулу ДНК, которая подверглась молекулярно-биологической манипуляции.

Молекула нуклеиновой кислоты "гибридуется" с другой молекулой нуклеиновой кислоты, такой как кДНК, геномная ДНК или РНК, когда одноцепочечная форма молекулы нуклеиновой кислоты может отжигаться с другой молекулой нуклеиновой кислоты при соответствующих условиях температуры и ионной силы раствора (см. Sambrook et al. 1989,

выше). Условия температуры и ионной силы определяют "жесткость" гибридизации. Для предварительного скрининга гомологичных нуклеиновых кислот можно использовать условия гибридизации низкой жесткости, соответствующие T_m 55° C, например, 5x SSC, 0,1% SDS, 0,25% молока и без формамида; или 30% формамида, 5x SSC, 0,5% SDS). Условия гибридизации умеренной жесткости соответствуют более высокой T_m , например, 40% формамида, с 5x или 6x SSC. Условия гибридизации высокой жесткости соответствуют самой высокой T_m , например, 50% формамида, 5x или 6x SSC. Гибридизация требует, чтобы две нуклеиновые кислоты содержали комплементарные последовательности, хотя в зависимости от жесткости гибридизации возможны несовпадения между основаниями. Подходящая жесткость для гибридизации нуклеиновых кислот зависит от длины нуклеиновых кислот и степени комплементации, переменных, хорошо известных в данной области. Чем больше степень схожести или гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями, тем больше значение T_m для гибридов нуклеиновых кислот, имеющих те последовательности. Относительная стабильность (соответствующая более высокой T_m гибридизации нуклеиновых кислот уменьшается в следующем порядке: РНК: РНК, ДНК: РНК, ДНК: ДНК. Для гибридов более 100 нуклеотидов в длину были получены уравнения для расчета T_m (см. Sambrook et al. 1989, supra, 9.50 -0.51). Для гибридизации с более короткими нуклеиновыми кислотами, те олигонуклеотидами, положение рассогласований становится более важным, и длина олигонуклеотида определяет его специфичность (см. Sambrook et al. 1989, выше, 11,7 -11,8). Предпочтительно минимальная длина гибридизуемой нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере приблизительно 10 нуклеотидов; более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 15 нуклеотидов; наиболее предпочтительно длина составляет по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов.

"Гомологичная рекомбинация" относится к введению чужеродной последовательности ДНК вектора в хромосоме. Предпочтительно вектор нацелен на конкретный хромосомный сайт для гомологичной рекомбинации. Для специфической гомологичной рекомбинации вектор будет содержать достаточно длинные области гомологии с последовательностями хромосомы для обеспечения комплементарного связывания и включения вектора в хромосому. Более длинные области гомологии и более высокие степени сходства последовательностей могут повышать эффективность гомологичной рекомбинации.

ДНК "кодирующая последовательность" представляет собой двухцепочечную последовательность ДНК, которая транскрибируется и транслируется в полипептид в клетке *in vitro* или *in vivo* при размещении под контролем соответствующих регуляторных последовательностей. Границы кодирующей последовательности определяются стартовым кодоном на 5' (амино)-конце и стоп-кодоном трансляции на 3' (карбоксильном) конце. Кодированная последовательность может включать, без ограничений, прокариотические последовательности, кДНК из эукариотической мРНК, последовательности геномной ДНК из эукариотических (например, млекопитающих) ДНК и даже синтетические последовательности ДНК. Если кодирующая последовательность предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно будут расположены 3'к кодирующей последовательности.

Выделение ОБ-кодирующих и фланкирующих последовательностей

Нуклеиновые кислоты, рассматриваемые настоящим изобретением, продолжают, как указано, на другие нуклеиновые кислоты, которые кодируют экспрессию пептидов, таких как те, которые представлены на фиг. 1A-D (SEQ ID NO: 2), фиг. 3 (SEQ ID NO: 4), фиг. 5 (SEQ ID NO: 5) и фиг. 6 (SEQ ID NO: 6) в данном документе. Соответственно, хотя специфическая ДНК была выделена и секвенирована в отношении гена *ob*, любая клетка животного потенциально может служить в качестве источника нуклеиновой кислоты для молекулярного клонирования гена, кодирующего пептиды по изобретению. ДНК может быть получена стандартными процедурами, известными в данной области техники из клонированной ДНК (например, библиотеки ДНК), химическим синтезом, клонированием кДНК или клонированием геномной

ДНК или ее фрагментов, очищенной от желаемой клетки (см. например, Sambrook et al, 1989, supra; Glover, 1985, выше). Клоны, полученные из геномной ДНК, могут содержать регуляторные и интронные участки ДНК в дополнение к кодирующим областям; клоны, полученные из кДНК, не будут содержать интронные последовательности. Независимо от источника, ген должен быть молекулярно клонирован в подходящий вектор для распространения гена.

При молекулярном клонировании гена из геномной ДНК геномную ДНК можно амплифицировать с использованием праймеров, выбранных из последовательностей кДНК. Альтернативно, образуются фрагменты ДНК, некоторые из которых будут кодировать желаемый ген. ДНК может расщепляться в определенных сайтах с использованием различных рестрикционных ферментов. Можно также использовать Днказу в присутствии марганца для фрагментации ДНК, или ДНК можно физически срезать, например, обработкой ультразвуком. Линейные фрагменты ДНК затем могут быть разделены в соответствии с размером стандартными методами, включая, но не ограничиваясь ими, электрофорез в агарозе и полиакриламидном геле и колоночную хроматографию.

После получения фрагментов ДНК идентификация конкретного фрагмента ДНК, содержащего желаемый *ob* или *ob*-подобный ген, может быть осуществлена несколькими способами. Например, если количество части *ob* или *ob*-подобного гена или его специфической РНК, или его фрагмента, доступно и может быть очищено и помечено, сгенерированные фрагменты ДНК могут быть подвергнуты скринингу посредством гибридизации нуклеиновой кислоты с меченым зондом [Benton et al, Science, 196: 180 (1977); Grunstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 72: 3961 (1975)]. Настоящее изобретение относится к таким зондам нуклеиновых кислот, которые могут быть удобно получены из конкретных последовательностей, описанных в настоящем документе, например гибридизуемый зонд, имеющий нуклеотидную последовательность, соответствующую по меньшей мере 10, и предпочтительно 15, нуклеотидный фрагмент последовательностей, изображенный на фиг. 1A-E (SEQ ID NO: 1 или фиг. 2A и B (SEQ ID NO: 3). Предпочтительно выбирают фрагмент, который является высокоуникальным для модуляторных пептидов по изобретению. Эти фрагменты ДНК со значительной гомологией с зондом будут гибридизоваться. Как отмечено выше, чем больше степень гомологии, тем более строгие условия гибридизации, которые могут быть использованы. В одном варианте осуществления условия гибридизации с низкой строгостью используются для идентификации гомологичного модулятора пептида. Однако в предпочтительном аспекте, и как продемонстрировано экспериментально в настоящем документе, нуклеиновая кислота, кодирующая модуляторный пептид по изобретению, будет гибридизоваться с нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, такую как изображенная на фиг. 1A-E (SEQ ID NO: 1) или фиг. 2 A и B (SEQ ID NO: 3), или ее гибридизованный фрагмент, в умеренно жестких условиях; более предпочтительно, она будет гибридизоваться в условиях высокой жесткости.

Альтернативно, присутствие гена может быть обнаружено с помощью анализов на основе физических, химических или иммунологических свойств его экспрессируемого продукта. Например, могут быть выбраны клоны кДНК или клоны ДНК, гибридные-выбранные надлежащие мРНК, которые продуцируют белок, который, например, обладает сходной или идентичной электрофоретической миграцией, изоэлектрическим фокусирующим поведением, картами протеолитического расщепления, активностью тирозинфосфатазы или антигенными свойствами, известными для настоящих модуляторных пептидов. Например, антитела по настоящему изобретению можно удобно использовать для скрининга гомологов модуляторных пептидов из других источников.

Ген, кодирующий модуляторный пептид по изобретению, также может быть идентифицирован путем селекции мРНК, те путем гибридизации нуклеиновых кислот с последующим трансляцией *in vitro*. В этой процедуре фрагменты используют для выделения

комплементарных мРНК путем гибридизации. Такие фрагменты ДНК могут представлять собой доступную очищенную ДНК модулятора. Иммунорецепторный анализ или функциональные анализы (например, активность тирозинфосфатазы) продуктов трансляции *in vitro* продуктов выделенных мРНК определяет мРНК и, следовательно, комплементарные фрагменты ДНК, которые содержат желаемые последовательности. Кроме того, специфические мРНК могут быть выбраны путем адсорбции полисом, выделенных из клеток, на иммобилизованные антитела, специфически направленные против модулятора.

кДНК меченного радиоактивным изотопом модулятора может быть синтезирована с использованием выбранной мРНК (из адсорбированных полисом) в качестве матрицы. Меченную радиоактивным изотопом мРНК или кДНК можно затем использовать в качестве зонда для идентификации гомологичных фрагментов ДНК модулятора из числа других фрагментов геномной ДНК.

Как упомянуто выше, последовательность ДНК, кодирующая пептиды модулятора веса, как описано в настоящем документе, может быть получена синтетически, а не клонирована. Последовательность ДНК может быть сконструирована с соответствующими кодонами для аминокислотных последовательностей пептида модулятора веса. В целом, можно выбрать предпочтительные кодоны для предполагаемого хозяина, если последовательность будет использована для экспрессии. Полную последовательность собирают из перекрывающихся олигонуклеотидов, полученных стандартными способами и собранных в полную кодирующую последовательность. См. например, Edge, *Nature*, 292: 756 (1981); Nambair et al, *Science*, 223: 1299 (1984); Jay et al, *J Biol Chem.* 259: 6311 (1984).

Синтетические последовательности ДНК позволяют удобно конструировать гены, которые будут экспрессировать аналоги модулятора веса, как описано выше. Альтернативно, аналоги ДНК, кодирующие аналоги, могут быть получены сайт-направленным мутагенезом нативных генов ОВ или кДНК, и аналоги могут быть получены непосредственно с использованием обычного полипептидного синтеза.

Общий способ сайт-специфического встраивания неприродных аминокислот в белки описан в Noren et al, *Science*, 244: 182-188 (1989). Этот способ может быть использован для создания аналогов полипептида со неприродными аминокислотами.

Некодирующие нуклеиновые кислоты

Настоящее изобретение распространяется на получение антисмысловых нуклеотидов и рибозимов, которые могут быть использованы для создания помех экспрессии белков модулятора веса на уровне трансляции. Этот подход использует антисмысловую нуклеиновую кислоту и рибозимы, чтобы блокировать трансляцию специфической мРНК, либо маскируя эту мРНК антисмысловой нуклеиновой кислотой или расщепляя ее рибозимом.

Антисмысловые нуклеиновые кислоты представляют собой молекулы ДНК или РНК, которые комплементарны по меньшей мере части специфической молекулы мРНК [см. Weintrub, *Sci. Am.* 262: 40-46 (1990); Marceus-Sekura, *Anal. Biochem.* 172: 289-295 (1988)]. В клетке они гибридизуются с этой мРНК, образуя двухцепочечную молекулу. Клетка не транслирует мРНК в комплексе в этой двухцепочечной форме. Таким образом, антисмысловые нуклеиновые кислоты интерферируют с экспрессией мРНК в белок. Олигомеры из приблизительно пятнадцати нуклеотидов и молекул, которые гибридизуются с иницирующим кодоном AUG, будут особенно эффективными, поскольку они легко синтезировать и, вероятно, будут представлять меньше проблем, чем большие молекулы при введении их в клетки, продуцирующие пептид-модулятор. Антисмысловые способы использовали для ингибирования экспрессии многих генов *in vitro* [Marceus-Sekura, 1988 выше; Hambor et al, *J Exp. Med.* , 168: 1237-1245(1988)].

Рибозимы представляют собой молекулы РНК, обладающие способностью специфически расщеплять другие одноцепочечные молекулы РНК способом, несколько аналогичным эндонуклеазам рестрикции ДНК. Рибозимы были обнаружены из наблюдения, что определенные мРНК обладают способностью иссечь свои собственные интроны. Путем

модификации нуклеотидной последовательности этих РНК исследователи способны конструировать молекулы, которые распознают специфические нуклеотидные последовательности в молекуле РНК и расщепляют ее [Cech, J Am. Med. Assoc, 260: 3030-3034 (1988)]. Поскольку они являются специфичными для последовательности, инактивируют только мРНК с конкретными последовательностями.

Исследователи идентифицировали два типа рибозимов, тип Tetrahymena и тип "hammerhead". Рибозимы типа Tetrahymena распознают четырехосновные последовательности, в то время как тип "hammerhead" распознает от одиннадцати до восемнадцати последовательностей оснований. Чем длиннее последовательность распознавания, тем более вероятно, что она встречается исключительно в целевых видах мРНК. Следовательно, рибозимы типа hammerhead предпочтительны для рибозимов типа Tetrahymena для инактивации специфичных видов мРНК, и восемнадцать последовательностей распознавания оснований являются предпочтительными для более коротких последовательностей распознавания.

Таким образом, последовательности ДНК, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для получения антисмысловых молекул против и рибозимов, которые расщепляют мРНК для белков-модуляторов веса и их лигандов, таким образом ингибируя экспрессию гена ob, и приводя к увеличению прироста массы и ожирения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены короткие олигонуклеотиды, комплементарные кодирующему и комплементарному жилам нуклеиновой кислоты ОВ, или к некодирующим областям гена ОВ 5', 3'или внутреннего (интронного) к кодирующей области. Такие нуклеиновые кислоты полезны в качестве зондов, либо в виде напрямую меченых олигонуклеотидных зондов, либо в качестве праймеров для полимеразной цепной реакции, для оценки наличия мутаций в гене ob или уровня экспрессии мРНК ОВ. Предпочтительно, некодирующие нуклеиновые кислоты по изобретению относятся к гену ОВ человека.

В конкретном варианте осуществления некодирующие нуклеиновые кислоты обеспечивают гомологичную рекомбинацию для интеграции амплифицируемого гена и/или других регуляторных последовательностей вблизи гена ОВ, например, для обеспечения более высоких уровней экспрессии полипептида ОВ, или для преодоления мутации в регуляторных последовательностях ob, которые предотвращают надлежащие уровни экспрессии полипептида ОВ (см. международную патентную публикацию WO 91/06666, опубликованную 16 мая 1991 г. Skoultchi; Международная патентная публикация № WO 91/09955, опубликованная 11 июля 1991, Chappel; см. также международную патентную публикацию № WO 90/14092, опубликованную 29 ноября 1990 г. Kucherlaati и Campbell).

Получение полипептида ОВ: Экспрессия и синтез

Последовательности контроля транскрипции и трансляции представляют собой регуляторные последовательности ДНК, такие как промоторы, энхансеры, терминаторы и тп, которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. В эукариотических клетках сигналы полиаденилирования представляют собой контрольные последовательности.

Кодирующая последовательность "под контролем" транскрипционных и трансляционных управляющих последовательностей в клетке, когда РНК-полимераза транскрибирует кодирующую последовательность в мРНК, которая затем транс-РНК сращивается и транслируется в белок, кодируемый кодирующей последовательностью.

"Сигнальная последовательность" включена в начале кодирующей последовательности белка, подлежащего экспрессии на поверхности клетки. Эта последовательность кодирует сигнальный пептид, Nтерминал-зрелый полипептид, который направляет клетку-хозяина для транслокации полипептида. Термин "последовательность транслокационного сигнала" также используется в настоящем документе для обозначения этого вида сигнальной последовательности. Можно найти последовательности сигналов транслокации, связанные с

различными белками, нативными для эукариот и прокариот, и часто являются функциональными в обоих типах организмов.

Последовательность ДНК "функционально связана" с последовательностью контроля экспрессии, когда последовательность контроля экспрессии контролирует и регулирует транскрипцию и трансляцию этой последовательности ДНК. Термин "функционально связанный" включает в себя соответствующий стартовый сигнал (например, ATG) перед последовательностью ДНК, подлежащей экспрессии, и поддержание правильной рамки считывания для обеспечения экспрессии последовательности ДНК под контролем последовательности контроля экспрессии и получения желаемого продукта, кодируемого последовательностью ДНК. Если ген, который желает ввести в молекулу рекомбинантной ДНК, не содержит соответствующего сигнала запуска, такой сигнал запуска может быть вставлен выше по потоку (5') и в рамку считывания с геном.

"Промоторная последовательность" представляет собой регуляторную область ДНК, способную связывать РНК-полимеразу в клетке и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности ниже по потоку (3'). Для целей определения настоящего изобретения промоторная последовательность ограничена на ее 3'- конце сайтом инициации транскрипции и проходит вверх по потоку (5'- направление) для включения минимального количества оснований или элементов, необходимых для инициации транскрипции на уровнях, обнаруживаемых над фоном. В промоторной последовательности будет найден сайт инициации транскрипции (обычно определенный, например, путем картирования с нуклеазой SI), а также белковые связывающие домены (консенсусные последовательности), ответственные за связывание РНК-полимеразы.

Другим признаком настоящего изобретения является экспрессия последовательностей ДНК, раскрытых в настоящем документе. Как хорошо известно в данной области техники, последовательности ДНК могут быть экспрессированы путем функционального связывания их с последовательностью контроля экспрессии в соответствующем векторе экспрессии и применения этого вектора экспрессии для трансформации соответствующего одноклеточного хозяина.

Такое оперативное связывание последовательности ДНК по настоящему изобретению с последовательностью контроля экспрессии, конечно, включает, если не часть последовательности ДНК, обеспечение иницирующего кодона, ATG, в правильной рамке считывания выше по потоку от последовательности ДНК.

Для экспрессии последовательностей ДНК в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы самые разнообразные комбинации векторов хозяина/экспрессии. Полезные векторы экспрессии, например, могут состоять из сегментов хромосомных, нехромосомных и синтетических последовательностей ДНК. Подходящие векторы включают производные Sv40 и известные бактериальные плазмиды, например плазмиды E.coli Col, pCR1, pBR322, pMB9, pUC или pUC плазмидные производные, например, векторы PGEX, векторы pET, pmal-c, pFLAG и тд, и их производные, плазмиды, такие как RP4; фаговые ДНК, например, многочисленные производные фага λ , например, Nm989, и другую фаговую ДНК, например, M13 и филаментную одноцепочечную фаговую ДНК; дрожжевые плазмиды, такие как плаزمида 2 μ или их производные; векторы, полезные в эукариотических клетках, такие как векторы, полезные в клетках насекомых или млекопитающих; векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, таких как плазмиды, которые были модифицированы для применения фаговой ДНК или других управляющих последовательностей экспрессии; и тому подобное. В предпочтительном варианте осуществления экспрессия ов достигается в метилотрофных дрожжах, например, дрожжей *Pichia pastoris* (см. например, международную патентную публикацию № WO 90/03431, опубликованную 5 апреля 1990 г. Brierley et al. International Patent Publication No. WO 90/10697, опубликованной 20 сентября 1990 г. Siegel et al.). В конкретном варианте осуществления ниже вектор экспрессии сконструирован для экспрессии ов под контролем последовательности сигналов фактора α -сопряжения.

В этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК по настоящему изобретению можно использовать любую из широкого разнообразия последовательностей-последовательностей контроля экспрессии, которые контролируют экспрессию последовательности ДНК, функционально связанной с ним-*in situ*. Такие полезные последовательности контроля экспрессии включают, например, ранние или поздние промоторы Sv40, CMV, осповакцины, полиомы или аденовируса, *lac*-систему, систему *trp*, TAC-систему, TRC-систему, LTR-систему, главный оператор и промоторные области фага λ , контрольные области белка fd-покрытия, промотор для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы (например, *Pho5*), промотор AOX 1 метилотрофных дрожжей, промоторы α -факторов сопряжения дрожжей и другие последовательности, известные для контроля экспрессии генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, и различные их комбинации.

Широкое разнообразие одноклеточных клеток-хозяев также полезно для экспрессии последовательностей ДНК по настоящему изобретению. Эти хозяева могут включать хорошо известные эукариотические и прокариотические хозяева, такие как штаммы *E.coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*; грибы, такие как дрожжи (*Saccharomyces*, и метилотрофные дрожжи, такие как *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* и *Torulopsis*); и клетки животных, такие как клетки CHO, R1.1, B-W и LM, клетки почки африканской зеленой мартышки (например, COS 1, COS 7, Bsc1, Bsc40 и Bmt10), клетки насекомых (например, Sf9) и клетки человека и растительные клетки в культуре ткани.

Следует понимать, что не все векторы, контролирующие экспрессию последовательности и хозяева функционируют одинаково хорошо для экспрессии последовательностей ДНК по настоящему изобретению. Все хозяева функционируют одинаково хорошо с одной и той же системой экспрессии. Однако специалист в данной области техники сможет выбрать надлежащие векторы, последовательности контроля экспрессии и хозяева без излишнего экспериментирования для достижения желаемой экспрессии без отступления от объема настоящего изобретения. Например, при выборе вектора необходимо учитывать хозяина, поскольку вектор должен функционировать в нем. Также следует учитывать число копий вектора, возможность контроля этого числа копий и экспрессию любых других белков, кодируемых вектором, таким как маркеры антибиотиков.

При выборе последовательности контроля экспрессии обычно будут рассмотрены различные факторы. Они включают, например, относительную прочность системы, ее управляемость и ее совместимость с конкретной последовательностью ДНК или геном, подлежащим экспрессии, в частности, в отношении потенциальных вторичных структур. Подходящие одноклеточные хозяева будут выбраны с учетом, например, их совместимости с выбранным вектором, характеристик их секреции, их способности к правильному складыванию белков и их требований к ферментации, а также токсичности для хозяина продукта, кодируемого последовательностями ДНК, подлежащими экспрессии, и легкости очистки продуктов экспрессии.

Принимая во внимание эти и другие факторы, специалист в данной области техники сможет конструировать разнообразные комбинации векторов/управляющих последовательностей/хозяев, которые будут экспрессировать последовательности ДНК по данному изобретению при ферментации или в крупномасштабной культуре животных.

В конкретном варианте осуществления можно экспрессировать слитый белок ОБ. ОБ слитый белок содержит по меньшей мере функционально активную часть белка, не содержащего ОБ, соединенного посредством пептидной связи с по меньшей мере функционально активной частью полипептида ОБ. Последовательности, отличные от об, могут быть amino-или карбокси-терминалами для последовательностей ОБ. Более предпочтительно, для стабильной экспрессии протеолитически неактивного слитого белка ОБ, часть белка слияния, не содержащего ОБ, соединена посредством пептидной связи с аминоконцом белка ОБ. Рекомбинантная молекула ДНК, кодирующая такой слитый белок, содержит

последовательность, кодирующую по меньшей мере функционально активную часть белка, не содержащего ОВ, соединенную в кадре с кодирующей последовательностью ОВ, и предпочтительно кодирует сайт расщепления для специфической протеазы, например, тромбина или фактора Ха, предпочтительно в месте соединения ОВ-не-ОВ. В конкретном варианте осуществления слитый белок экспрессируется в *Escherichia coli* или в *P. pastoris*.

В конкретном варианте осуществления были подготовлены векторы для экспрессии генов об мыши и человека, с кодоном и без кодона для *gln* -49, в системах экспрессии бактерий и в системах экспрессии дрожжей (*Pichia*) в качестве слитых белков. Ген об получают с помощью сайта расщепления эндонуклеазой, например, с использованием ПЦР и новых праймеров. Желательно подтвердить последовательности, полученные с помощью ПЦР, так как вероятность включения точечной мутации больше с помощью этой методики. Используется плазида, содержащая гистидиновую метку (*His-tag*) и сайт протеолитического расщепления. Присутствие гистидина делает возможным селективное выделение рекомбинантных белков на Ni-хелатирующей колонке или аффинной очисткой. Сайт протеолитического расщепления в конкретном варианте осуществления ниже сайта расщепления тромбина сконструирован так, что обработка протеазой, например тромбином, будет высвобождать полноразмерный зрелый (те лишенный сигнальной последовательности) ОВ полипептид.

В другом аспекте может быть использован вектор *pgeX* [Smith et al. *Gene* 67: 31-40 (1988)]. Этот вектор сплавляет кДНК глутатионина S-трансферазы *japonicum Japonicum* с последовательностью, представляющей интерес. Бактериальные белки собирают, и рекомбинантные белки можно быстро очистить на восстановленной аффинной колонке глутатиона. Затем носитель GST может быть отщеплен от слитых белков путем расщепления сайт-специфическими протеазами. После расщепления носитель и нелишенный слитый белок можно удалить путем абсорбции в агарозе глутатиона. Трудность с системой иногда возникает, когда закодированный белок нерастворим в водных растворах.

Экспрессия рекомбинантных белков в бактериальных системах может привести к неправильному складыванию экспрессируемого белка, требующему рефолдинга. Рекомбинантный белок может быть повторно сложен до или после расщепления с образованием функционально активного полипептида ОВ. Полипептид ОВ может быть повторно сложен стадиями (i) инкубирования белка в денатурирующем буфере, который содержит восстанавливающий агент, и затем (ii) инкубирования белка в буфере, который содержит окислитель, и предпочтительно также содержит стабилизирующий белок агент или хаотропный агент, или и то, и другое. Подходящие пары окислительно-восстановительных (восстанавливающих/окисляющих) агентов включают, но не ограничиваются ими, восстановленный глутатион/глутатион дисульфид, цистин/цистеин, цистамин/цистеамин и 2-меркаптоэтанол/2-гидроксиэтилдисульфид. В конкретном аспекте слитый белок может быть солубилизован в денатурирующем средстве, таком как мочевины, перед обменом в восстанавливающий буфер. В предпочтительном варианте осуществления белок также очищают, например, с помощью ионообменной или Ni-хелатной хроматографии, перед обменом в восстанавливающий буфер. Денатурирующие агенты включают, но не ограничиваются ими, мочевины и гуанидин-HCl. Затем рекомбинантный белок разбавляют по меньшей мере примерно в 10 раз, более предпочтительно примерно в 100 раз, в окисляющий буфер, который содержит окислитель, такой как, без ограничений, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА, 0,15 M NaCl, 0,3 M окисленный глутатион. Белок fu затем инкубируют в течение от около 1 до около 24 часов, предпочтительно от около 2 до около 16 часов, при комнатной температуре в окисляющем буфере. Окисляющий буфер может содержать стабилизирующий белок агент, например, сахар, спирт или сульфат аммония. Окисляющий буфер может дополнительно содержать хаотропный агент при низкой концентрации, чтобы дестабилизировать неправильные межмолекулярные взаимодействия и, таким образом, способствовать надлежащему складыванию. Подходящие хаотропные средства включают без ограничения моющее средство, полиол, L-аргинин, гуанидин-HCl и полиэтиленгликоль (PEG).

Важно использовать достаточно низкую концентрацию хаотропного агента, чтобы избежать денатурации белка. Повторно сложенный белок может быть сконцентрирован по меньшей мере приблизительно в 10 раз, более предпочтительно в количестве, в котором он был разбавлен в окисляющий буфер.

Процессы бактериальной ферментации также могут приводить к получению рекомбинантного белка, который содержит неприемлемые уровни эндотоксинов. Таким образом, изобретение предусматривает удаление таких эндотоксинов, например, с использованием специфических для эндотоксинов антител или других молекул-связывающих эндотоксинов. Присутствие эндотоксинов можно определить стандартными методами, такими как использование E-TOXATE реагентов (Sigma, St. Louis, Missouri) или с биоанализами.

В дополнение к конкретному примеру, авторы настоящего изобретения предусматривают использование систем экспрессии бакуловирусов, млекопитающих и дрожжей для экспрессии белка об. Например, в бакуловирусных экспрессионных системах оба не слитых вектора переноса, такие как, без ограничений, pVL941 (сайт клонирования BAMHI; Summers), pVL1393 (Bamhi, SmaI, XbaI, EcoRI, NotI, Xma III, BglI I, and PstI cloning site; Invitrogen), pVL1392 (BglI I, PstI, NotI, Xma III, ECORI, XbaI, SmaI и сайт клонирования BAMHI; Сумматоры и Invitrogen) и pBlueBacIII (BAMHI, BglI I, PstI, NcoI и HindIII сайт клонирования, с возможным синим/белым рекомбинантным скринингом; Invitrogen) и векторы переноса слияния, такие как, но не ограничиваясь этим, pAc700 (BAMHI и сайт клонирования KpnI, в котором сайт распознавания BAMHI начинается с иницирующего кодона; Сумматоры), pAc701 и pAc702 (такие же, как pAc700, с различными кадрами считывания), pAc360 (сайт 36 клонирования BAMHI 36 ниже по потоку от иницирующего кодона полиэдрина; Invitrogen (195)) и pBlueBacHisA, B, C (три различных считывающих кадра, с BAMHI, BglI I, PstI, NcoI и Hind III сайт клонирования, N-концевой пептид для очистки Probond, и синий/белый рекомбинантный скрининг бляшек; Invitrogen (220)).

Векторы экспрессии млекопитающих, предполагаемые для применения в настоящем изобретении, включают векторы с индуцибельными промоторами, такими как промотор дигидрофолатредуктазы (DHFR), например любой вектор экспрессии с вектором экспрессии DHFR, или вектор коусиления DHFR/метотрексата, такой как pED (PstI, SalI, SalI, SmaI и ECORI клонирующий сайт, с вектором, экспрессирующим как клонированный ген, так и DHFR; см. Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16. 12 (1991). Альтернативно, вектор на основе глутаминсинтетазы/метионина сульфоксимида, такой как сайт клонирования pEE14 (Hind III, XbaI, SmaI, SalI, EcoRI и bclII, в котором вектор экспрессирует глутаминсинтазу и клонированный ген; Celltech). В другом варианте осуществления может быть использован вектор, который направляет эпизомальную экспрессию под контролем вируса Эпштейна Барр (EBV), такого как pREP4 (BAMHI, SmaI, XbaI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII и сайт клонирования KpnI, конститутивный промотор RSV-LTR, селективный маркер гигромицина; Invitrogen), pCEP4 (Bamhi, SmaI, XbaI, NotI, NheI, Hind III, NHEI PvuII, and KPN I сайт клонирования, конститутивный ранний ген hCMV, селективный маркер гигромицина; Invitrogen), Pmp4 (KpnI, PvuI, NheI, Hind III, NotI, XbaI, SmaI, BAMHI сайт клонирования, индуцибельный промотор гена металлотронеина Па, селективный маркер гигромицина; Invitrogen), pREP8 (BAMHI, XbaI, NotI, HINDIII, NheI и сайт клонирования KpnI, промотор RSV-LTR, маркер, выбираемый гистидином; Invitrogen), pREP9 (KpnI, NheI, HindIII, NheI, XbaI, SmaI, and BAMHI сайт клонирования, RSV-LTR промотор, G418 селективный маркер; Invitrogen) и pEBVHis (промотор RSV-LTR, селективный маркер гигромицина, N-концевой пептид, направляемый через смолу Probond и расщепленный энтерокиназой; Invitrogen). Выбираемые векторы экспрессии млекопитающих для применения в настоящем изобретении включают pRc/CMV (Hind III, BstXI, NotI, SmaI, and ApaI cloning site, G418 selection; Invitrogen), pRc/RSV (HindIII, SpeI, BstXI, NotI, XbaI cloning site, G418 selection; Invitrogen) и другие. Векторы экспрессии вируса осповакцины (см. Kaufman, 1991, выше) для применения в соответствии с изобретением включают, но не ограничиваются ими, pSC11 (сайт клонирования

Smal, селекция ТК-и β -gal), pMJ601 (Sail, Smal, AflI, NarI, BSPMII, BAMHI, ApaI, NheI, SACL, KpnI и сайт клонирования HINDIII; Выбор ТК-и β -gal) и pTKgptF1S (ecoBI, PstI, Sail, Accl, HINDII, Sal, BAMHI и сайт клонирования Hpa, ТК или XPRT-выбор).

В соответствии с изобретением также могут быть использованы системы экспрессии дрожжей для экспрессии полипептида ОВ. Например, не слитый вектор pYES2 (XbaI, SphI, Shol, NotI, GstxI, EcoBI, BstxI, BamHI, SacI, KpnI, and HindIII cloning sit; Invitrogen) или слияние pYESHisA, B, C (XbaI, SphI, Shol, NotI, BstxI, EcoRI, BAMHI, SacI, KpnI и сайт клонирования HindIII, N-концевой пептид, очищенный смолой Probond и расщепленный энтерокиназой; Invitrogen), следует упомянуть только два, можно использовать в соответствии с изобретением.

Кроме того, предполагается, что аналоги пептида модулятора веса тела могут быть получены из нуклеотидных последовательностей, полученных в рамках объема настоящего изобретения.

В дополнение к рекомбинантной экспрессии полипептида ОВ, настоящее изобретение предусматривает и полностью обеспечивает получение полипептида ОВ или его фрагментов с использованием хорошо известных и высоко разработанных методов твердофазного пептидного синтеза. Изобретение предусматривает использование как популярных Boc, так и Fmoc, а также других стратегий защитных групп для получения полипептида или его фрагментов. Различные способы рефолдинга и окисления цистеиновых боковых цепей с образованием дисульфидной связи также хорошо известны в данной области.

Антитела к полипептиду ОВ

Согласно изобретению полипептид ОВ, полученный рекомбинантным путем или путем химического синтеза, и его фрагменты или другие производные или аналоги, включая слитые белки, можно использовать в качестве иммуногена для получения антител, которые распознают полипептид ОВ. Такие антитела включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, химерные, одноцепочечные, Fab-фрагменты и Fab-экспрессионную библиотеку.

Молекула является "антигенной", когда она способна специфически взаимодействовать с молекулой распознавания антигена иммунной системы, такой как иммуноглобулин (антитело) или Т-клеточный антигенный рецептор. Антигенный полипептид содержит по меньшей мере приблизительно 5 и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10 аминокислот. Антигенная часть молекулы может представлять собой ту часть, которая является иммунодоминантной для распознавания антитела или Т-клеточного рецептора, или она может представлять собой часть, используемую для получения антитела к молекуле путем конъюгации антигенной части с молекулой-носителем для иммунизации. Молекула, которая является антигенной, не обязательно сама по себе является иммуногенной, те способна вызывать иммунный ответ без носителя.

"Антитело" представляет собой любой иммуноглобулин, включая антитела и их фрагменты, которые связывают специфический эпитоп. Термин охватывает поликлональные, моноклональные и химерные антитела, последние описаны более подробно в патентах США № 4816397 и 4816567, а также антигенсвязывающие части антител, включая Fab, F (ab')₂ и F (v) (включая одноцепочечные антитела). Соответственно, фраза "молекула антитела" в ее различных грамматических формах, как используется в настоящем документе, предполагает как интактную молекулу иммуноглобулина, так и иммунологически активную часть молекулы иммуноглобулина, содержащую сайт объединения антител. "Сайт комбинирования антитела" заключается в том, что структурная часть молекулы антитела содержит переменную и гиперпеременную области тяжелой и легкой цепи, которые специфически связывают антиген.

Примеры молекул антител представляют собой интактные молекулы иммуноглобулина, по существу интактные молекулы иммуноглобулина и те части молекулы иммуноглобулина, которая содержит паратоп, включая те части, которые известны в данной области как Fab, Fab', F (ab')₂ и F (v), которые являются предпочтительными для применения в терапевтических способах, описанных в настоящем документе.

Фрагменты Fab и F (ab')₂ молекул антител получают протеолитической реакцией папаина и пепсина соответственно на по существу интактные молекулы антител способами, которые хорошо известны. См. например, патент США № 4,342,566, выданный Theofilopoulos et al. Fab'-молекулы антитела, также хорошо известны и получены из частей F (ab')₂ с последующим восстановлением дисульфидных связей, связывающих две части тяжелой цепи с меркаптоэтанолом, с последующим алкилированием полученного белкового меркаптана реагентом, таким как йодацетамид. В настоящем документе предпочтительным является антитело, содержащее интактные молекулы антител.

Фраза "моноклональное антитело" в его различных грамматических формах относится к антителу, имеющему только один вид сайта комбинирования антитела, способного к иммунореакциям с конкретным антигеном. Таким образом, моноклональное антитело обычно демонстрирует однократную аффинность связывания с любым антигеном, с которым он иммунореактивен. Таким образом, моноклональное антитело может содержать молекулу антитела, имеющую множество сайтов объединения антител, каждая из которых иммуноспецифична для другого антигена; например, биспецифическое (химерное) моноклональное антитело.

Термин "адъювант" относится к соединению или смеси, которое усиливает иммунный ответ на антиген. Адъювант может служить в качестве тканевого депо, который медленно высвобождает антиген, а также как активатор лимфоидной системы, который неспецифично усиливает иммунный ответ [Капот и др. в *Immunology*, p. 384, Second Ed. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California (1984)]. Часто первичная проблема с одним антигеном, в отсутствие адъюванта, не будет вызывать гуморальный или клеточный иммунный ответ. Адъюванты включают, но не ограничиваются ими, полный адъювант Фрейнда, неполный адъювант Фрейнда, сапонин, минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плуровые полиолы, полианионы, пептиды, масляные или углеводородные эмульсии, гемоцианины лимфы улитки, динитрофенол и потенциально полезные адъюванты человека, такие как БЦЖ (*bacille Calmetteguerin*) и *Corynebacterium parvum*. Предпочтительно адъювант является фармацевтически приемлемым.

Различные процедуры, известные в данной области техники, могут быть использованы для получения поликлональных антител к полипептиду ОВ или его фрагменту, производному или аналогу. Для получения антитела различные животные-хозяева могут быть иммунизированы путем инъекции полипептидом ОВ или его производным (например, фрагментом или слитым белком), включая, но не ограничиваясь ими, кролики, мыши, крысы, овцы, козы и т.д. В одном варианте осуществления полипептид ОВ или его фрагмент можно конъюгировать с иммуногенным носителем, например, бычьим сывороточным альбумином (BSA) или гемоцианином лимфы улитки (KLH). Различные адъюванты могут быть использованы для увеличения иммунологического ответа в зависимости от вида хозяина, включая, но не ограничиваясь этим, Фрейнда (полный и неполный), минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плуровые полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианины лимфы улитки, динитрофенол и потенциально полезные адъюванты человека, такие как БЦЖ (*bacille Calmetteguerin*) и *Corynebacterium parvum*.

Для получения моноклональных антител, направленных к полипептиду ОВ, или его фрагменту, аналогу или производному, может быть использован любой метод, который обеспечивает получение молекул антител непрерывными клеточными линиями в культуре. Они включают, но не ограничиваются ими, гибридную методику, первоначально разработанную Kohler et al. *Nature*, 256: 495-497 (1975), а также методику триомы, технологию гибридомы В-клеток человека [Kozbor et al. *Immunology Today*, 4: 72 (1983)], и технологию EBV-гибридомы для получения человеческих моноклональных антител [Cole et al, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77 -96, Alan R Liss, Inc. (1985)]. Имортальные, продуцирующие антитела линии клеток могут быть созданы способами, отличными от слияния, такими как прямое

преобразование В-лимфоцитов с онкогенной ДНК или трансфекция вирусом Эпштейна-Барр. См. например, M Schreier et al. "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al. "Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas" (1981); Kennett et al. "Monoclonal Antibodies" (1980); см. также патенты США № 4,341,761; 4,399,121; 4,47,783; 4,444,887; 4,451, 570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; и 4,493,890.

В дополнительном варианте осуществления изобретения моноклональные антитела могут быть получены у бесзародышевых животных с использованием недавней технологии (PCT/US90/02545). Согласно изобретению можно использовать человеческие антитела и можно получить с использованием гибридом человека [Cote et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026-2030 (1983)] или путем трансформации клеток В человека вирусом EBV in vitro (Cole et al. 1985, выше). Фактически, согласно изобретению, методы, разработанные для получения "химерных антител" [Morrison et al. J Bacteriol, 159-870 (1984); Neuberger et al. Nature, 312: 604-608 (1984); Takeda et al, Nature, 314: 452-454 (1985)], путем сплайсинга генов из молекулы антитела мыши, специфичной для полипептида об, вместе с генами молекулы антитела человека соответствующей биологической активности, могут быть использованы; такие антитела входят в объем настоящего изобретения. Такие человеческие или гуманизированные химерные антитела являются предпочтительными для применения в терапии заболеваний или расстройств человека (описанных ниже), поскольку человеческие или гуманизированные антитела гораздо менее вероятно, чем ксеногенные антитела, чтобы индуцировать иммунный ответ, в частности, аллергический ответ.

Согласно изобретению способы, описанные для получения одноцепочечных антител (патент США № 4946778), могут быть адаптированы для получения специфических к полипептиду ОБ одноцепочечных антител. Дополнительный вариант осуществления изобретения использует методики, описанные для конструирования библиотек экспрессии Fab [Huse et al, Science, 246: 1275-1281 (1989)], чтобы обеспечить быструю и легкую идентификацию моноклональных Fab-фрагментов с желаемой специфичностью для полипептида об или его производных или аналогов.

Фрагменты антител, которые содержат идиотип молекулы антитела, могут быть получены известными методами. Например, такие фрагменты включают, но не ограничиваются ими: фрагмент F (ab')₂, который может быть получен путем расщепления молекулы антитела пепсином; фрагменты Fab', которые могут быть получены путем восстановления дисульфидных мостиков фрагмента F (ab')₂, и Fab-фрагменты, которые могут быть получены путем обработки молекулы антитела папаином и восстанавливающим агентом.

В производстве антител скрининг желаемого антитела может быть осуществлен с помощью методик, известных в данной области техники, например, радиоиммуноанализ, ELISA (иммуноферментный анализ), "сэндвич"-иммуноанализы, иммунорадиометрические анализы, гель-диффузный преципитат в реакциях, иммунодиффузионные анализы, in situ иммуноанализы (с использованием коллоидного золота, фермента или радиоизотопных меток, например), вестерн-блоты, реакции осаждения, анализы агглютинации (e). г. анализы агглютинации геля, анализы гемагглютинации), анализы фиксации комплемента, анализы иммунофлюоресценции, анализы белка А и анализы иммуноэлектрофореза и т.д. В одном варианте осуществления связывание антитела обнаруживается посредством обнаружения метки на первичном антителе. В другом варианте осуществления первичное антитело обнаруживают путем обнаружения связывания вторичного антитела или реагента с первичным антителем. В дополнительном варианте осуществления вторичное антитело является меченым. Многие средства известны в данной области техники для обнаружения связывания в иммуноанализе и входят в объем настоящего изобретения. Например, для отбора антител, которые распознают специфический эпитоп полипептида ОБ, можно анализировать сгенерированные гибридомы для продукта, который связывается с фрагментом полипептида ОБ, содержащим такой эпитоп. Для отбора антитела, специфичного к полипептиду ОБ из конкретного вида животного, можно

выбрать на основе положительного связывания с полипептидом ОВ, экспрессируемым или выделенным из клеток этого вида животного.

Вышеуказанные антитела могут быть использованы в способах, известных в данной области техники, связанных с локализацией и активностью полипептида ОВ, например, для вестерн-блоттинга, визуализации полипептида ОВ *in situ*, измерения его уровней в соответствующих физиологических образцах и тд

В конкретном варианте осуществления могут быть получены антитела, которые агонисты или антагонизируют активность полипептида ОВ. Такие антитела могут быть протестированы с использованием анализов, описанных ниже для идентификации лигандов.

В конкретном варианте осуществления антитела разрабатываются путем иммунизации кроликов синтетическими пептидами, предсказанными белковой последовательностью, или рекомбинантными белками, полученными с использованием бактериальных векторов экспрессии. Выбор синтетических пептидов проводят после тщательного анализа прогнозируемой белковой структуры, как описано выше. В частности, выбирают пептидные последовательности между предполагаемыми сайтами расщепления. Синтетические пептиды конъюгируют с носителем, таким как гемоцианин KLH или BSA, с использованием карбодиимида и используют в адъюванте Freund's для иммунизации кроликов. Для получения рекомбинантного белка вектор pgeX может быть использован для экспрессии полипептида (Smith et al. 1988, выше). Альтернативно, можно использовать только гидрофильные домены для получения слитого белка. Экспрессируемый белок будет получен в количестве и использован для иммунизации кроликов в адъюванте Freund's.

В другом конкретном варианте осуществления рекомбинантный полипептид ОВ используют для иммунизации цыплят, и антитела к ОВ цыпленка извлекают из яичного желтка, например, путем аффинной очистки на ОВ-колонке. Предпочтительно, куры, используемые при иммунизации, поддерживают при конкретных условиях, свободных от патогенов (SPF).

В другом варианте осуществления антитела против лептина образуются у мышей ob/ob, в которых отсутствует циркулирующий ОВ-белок, и, таким образом, ожидается, что они способны генерировать ответный antOV-полипептид, поскольку они не будут толированы с полипептидом и мышами дикого типа. Клетки селезенки из обеих групп мышей могут быть слиты с клетками миеломы для получения гибридом для моноклональных антител.

В еще одном варианте осуществления рекомбинантный полипептид ОВ используют для иммунизации кроликов, и поликлональные антитела перед дальнейшим использованием иммунизируют. Очищенные антитела особенно полезны для полуколичественных анализов, в частности, для обнаружения присутствия циркулирующего полипептида ОВ в сыворотке или плазме.

Панели моноклональных антител, продуцируемых против модуляторных пептидов, могут быть подвергнуты скринингу на различные свойства; те изотип, эпитоп, аффинность и тд. Особый интерес представляют собой моноклональные антитела, нейтрализующие активность модуляторных пептидов. Такие monoclonals могут быть легко идентифицированы в анализах активности для модуляторов веса. Высокоаффинные антитела также полезны, когда возможна иммуноаффинная очистка нативного или рекомбинантного модулятора.

Предпочтительно, антимодуляторное антитело, используемое в диагностических и терапевтических способах настоящего изобретения, представляет собой поликлональное антитело, очищенное от аффинности. Более предпочтительно антитело представляет собой моноклональное антитело (mAb). Кроме того, предпочтительно, чтобы молекулы антитела против модулятора, используемые в данном документе, были в форме Fab, Fab', F(ab')₂ или F(v) частей молекул цельного антитела.

Диагностические последствия

Настоящее изобретение также относится к различным диагностическим применениям, включая способы обнаружения наличия состояний и/или стимулов, которые влияют на аномалии в массе тела или ожирения, путем ссылки на их способность вызывать активности,

которые опосредуются настоящими модуляторами веса. Как упоминалось ранее, пептиды-модуляторы могут быть использованы для получения антител к самим себе различными известными методами, и такие антитела могут быть затем выделены и использованы в качестве тестов на наличие конкретной транскрипционной активности в подозрительных клетках-мишенях, альтернативно, нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть использованы в диагностике.

Диагностика на основе антител

Как было предложено ранее, способ диагностики, применимый в настоящем изобретении, включает исследование клеточного образца или среды с помощью анализа, включающего эффективное количество антагониста белка модулятора, такого как антимодуляционное антитело, предпочтительно очищенное от аффинности поликлональное антитело, и более предпочтительно mAb. Кроме того, предпочтительно, чтобы молекулы антитела против модулятора, используемые в данном документе, были в форме частей Fab, Fab', F (ab')_j или F (v) или целых молекул антител. Как обсуждалось ранее, пациенты, способные пользоваться от этого способа, включают пациенты, страдающие раком, СПИД, ожирением или другими условиями, в которых аномальная масса тела является характеристикой или фактором. Все способы выделения модулятора и индуцирования антимодуляторных антител и для определения и оптимизации способности антимодуляторных антител способствовать исследованию клеток-мишеней хорошо известны в данной области.

Кроме того, антитела, включающие как поликлональные, так и моноклональные антитела, и лекарственные средства, которые модулируют продуцирование или активность модуляторов регулирования веса и другие факторы распознавания и/или их субъединицы, могут обладать определенными диагностическими применениями и, например, могут использоваться для целей обнаружения и/или измерения условий, где аномалии в массе тела являются или могут вероятно развиваться. Например, модуляторные пептиды или их активные фрагменты могут быть использованы для получения как поликлональных, так и моноклональных антител к самим себе во множестве клеточных сред известными методами, такими как гибридная технология, использующая, например, слитые лимфоциты селезенки мыши и клетки миеломы. Эти методики подробно описаны ниже. Аналогично, малые молекулы, которые имитируют или антагонизируют активность (ы) факторов распознавания рецепторов по изобретению, могут быть обнаружены или синтезированы, и могут быть использованы в диагностических и/или терапевтических протоколах.

Присутствие модуляторов веса в клетках может быть установлено обычными иммунологическими процедурами, применимыми к таким определениям. Известен ряд полезных процедур. Три таких процедуры, которые особенно полезны, используют либо фактор распознавания рецептора, обозначенный детектируемой меткой, антитело Ab, меченое детектируемой меткой, либо антитело Ab₂, меченное детектируемой меткой. Процедуры можно суммировать с помощью следующих уравнений, в которых звездочка указывает на то, что частица помечена, и "WM" обозначает весовой модулятор:

$$A \text{ WM}^* + Ab1 \text{ WM}^* \rightarrow Ab1$$

$$B \text{ WM} + Ab^* \rightarrow 1 \text{ WAb},^*$$

$$C \text{ WM} + Ab1 + Ab2^* \rightarrow Ab1 \text{ w} \text{ mAb}2^*$$

The procedures and their application все знакомы специалистам в данной области техники и, соответственно, могут быть использованы в пределах объема настоящего изобретения. Процедура А "конкурентная" процедура описана в патентах США № № 3654090 и 3850752. Процедура В представляет хорошо известные методы конкурентного анализа. Процедура С "сэндвич"-процедура описана в патентах США № RE 31006 и 4016043. Также известны другие процедуры, такие как процедура "двойного антитела" или "DASP".

В каждом случае весовые модуляторы образуют комплексы с одним или несколькими антителами или партнерами по связыванию, и один элемент комплекса помечен детектируемой

меткой. Тот факт, что образуется и, при желании, его количество, может быть определен известными способами, применимыми к обнаружению меток.

Из вышеизложенного видно, что характерное свойство Ab2 состоит в том, что он будет реагировать с Ab1. Это связано с тем, что Ab1, поднятый у одного вида млекопитающих, был использован в других видах в качестве антигена для поднятия антитела, Ab2. Например, Ab2 может быть поднят у коз с использованием антител кролика в качестве антигенов. Таким образом, Ab2 будет анти-кроличьим антителом, приподнятым в коз. Для целей настоящего описания и формулы изобретения Ab1 будет называться первичным или противовесовым модуляторным антителом, и Ab2 будет называться вторичным или анти-Ab1 антителом.

Этикетки, наиболее часто используемые для этих исследований, представляют собой радиоактивные элементы, ферменты, химические вещества, флуоресцирующие при воздействии ультрафиолетового света, и другие.

Ряд флуоресцентных материалов известен и может быть использован в качестве меток. Они включают, например, флуоресцеин, родамин и аурамин. Конкретным детектирующим материалом является антикроличье антитело, полученное в коз и конъюгированное с флуоресцеином через изотиоцианат.

Модуляторы веса или их связывающие партнеры также могут быть помечены радиоактивным элементом или ферментом. Радиоактивная метка может быть обнаружена посредством любой из доступных в настоящее время процедур подсчета. Предпочтительный изотоп может быть выбран из H, C, P, S, Cl, Cr, Co, Co, Fe, Y, I, ³¹I и Re.3143235365157583990125186

Ферментные метки также полезны и могут быть обнаружены с помощью любой из используемых в настоящее время колориметрических, спектрофотометрических, фторспектрофотометрических, амперометрических или газометрических технологий. Фермент конъюгируют с выбранной частицей посредством реакции с мостиковыми молекулами, такими как карбодиимиды, диизоцианаты, глутаровый альдегид и тому подобное. Многие ферменты, которые могут быть использованы в этих процедурах, известны и могут быть использованы. Предпочтительными являются пероксидаза, β -глюкуронидаза, β -D-глюкозидаза, β -D-галактозидаза, уреазы, глюкозооксидаза плюс пероксидаза и щелочная фосфатаза. Патенты США № № 3,654,090; 3,850,752; и 4,016,043 упоминаются в качестве примера для их раскрытия альтернативного этикетировочного материала и способов.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения наборы для тестирования, подходящие для использования медицинским специалистом, могут быть подготовлены для определения присутствия или отсутствия предварительно определенной транскрипционной активности или заданной способности транскрипционной активности в подозреваемых клетках-мишенях. В соответствии с методиками тестирования, описанными выше, один класс таких наборов будет содержать, по меньшей мере, меченый модулятор веса или его партнер по связыванию, например, антитело, специфичное к нему, и направления, конечно, в зависимости от выбранного способа, например, "конкурентного", "сэндвича", "DASP" и т.п. Наборы также могут содержать периферические реагенты, такие как буферы, стабилизаторы и т.д.

Соответственно, тестовый набор может быть подготовлен для демонстрации присутствия или способности клеток для заданной транскрипционной активности, содержащий:

(a) заданное количество по меньшей мере одного меченого иммунохимически активного компонента, полученного прямым или косвенным прикреплением настоящего весового модулятора или специфического связывающего партнера к нему, к детектируемой метке;

(b) другие реагенты; и

(c) направления для использования указанного набора.

Более конкретно, диагностический тест-набор может содержать:

(a) известное количество модулятора веса, как описано выше (или партнера по связыванию), обычно связанное с твердой фазой с образованием иммуносорбента, или, в

качестве альтернативы, связанное с подходящей меткой, или множественное число таких конечных продуктов и тд (или их партнеров по связыванию) по одному из каждого;

(b) при необходимости другие реагенты; и

(c) направления для использования указанного тестового набора.

В дополнительном варианте тест-набор может быть получен и использован в целях, указанных выше, который работает в соответствии с заданным протоколом (например, "конкурентным", "сэндвич", "двойным антителом" и т. д.) и содержит:

(a) меченый компонент, полученный путем соединения весового модулятора с детектируемой меткой;

(b) один или несколько дополнительных иммунохимических реагентов, из которых по меньшей мере один реагент представляет собой лиганд или иммобилизованный лиганд, который выбран из группы, состоящей из:

(i) лиганд, способный связываться с меченым компонентом (a);

(ii) лиганд, способный связываться со связывающим партнером меченого компонента (a);

(iii) лиганд, способный связываться с по меньшей мере одним из компонента (ов), подлежащего определению; и

(iv) лиганд, способный связываться с по меньшей мере одним из партнеров по связыванию по меньшей мере одного из компонентов, подлежащих определению; и

(c) направления для выполнения протокола для обнаружения и/или определения одного или более компонентов иммунохимической реакции между весовым модулятором и специфическим связывающим партнером.

Диагностика на основе нуклеиновой кислоты

Как продемонстрировано в примерах ниже, нуклеиновые кислоты по изобретению можно использовать для выявления дефектов, связанных с дефектами в полипептиде ОВ, что приводит к фенотипам ожирения. Например, зонды нуклеиновой кислоты (например, в Северном анализе или RT-PCR-анализе) можно использовать для определения того, связан ли фенотип с ожирением с отсутствием экспрессии мРНК ОВ, или экспрессией нефункциональной мРНК ОВ, например, как у мышей db/db (где дефицит является результатом отсутствия ОВ-рецептора) или когда мутация дает нетранскрибированную мРНК. Кроме того, способы диагностики на основе нуклеиновой кислоты по изобретению могут быть использованы в сочетании с методами на основе антител для дальнейшего развития молекулярного понимания ожирения или аноксических фенотипов.

Недавно выделенные клоны кДНК человека секвенировали, как представлено в настоящем документе. Это облегчает определение полной последовательности гена человека (см. фиг. 20А-С; SEQ ID NO: 22). Были получены последовательности ДНК из интронов гена ОВ человека (Фигура 20), и они были использованы для получения ПЦР-праймеров для ПЦР-амплификации кодирующей последовательности гена ОВ из геномной ДНК человека таким образом, чтобы идентифицировать мутации или аллельные варианты гена ОВ, все в соответствии с протоколами, подробно описанными выше в настоящем документе. Специфические ПЦР-праймеры для амплификации геномных ОВ человека описаны в конкретном примере ниже.

Текущая гипотеза состоит в том, что гетерозиготные мутации в гене ob будут ассоциированы с умеренным/умеренным ожирением, в то время как гомозиготные мутации будут связаны с несколькими диагностическими тестами на основе последовательности ДНК для ожирения. Если это справедливо, это позволило бы людям с риском развития ожирения и сделать возможным применение медикаментозного лечения и/или изменения образа жизни до полной выработки увеличенной массы тела.

Альтернативно, наличие микроспутников, которые сегрегируют с мутантными формами человеческого ОВ, можно использовать для диагностики. В этом отношении можно использовать различные праймеры для ПЦР, включая те, которые основаны на нуклеотидной последовательности, представленной на фиг. 20 А-С.

Ген ОВ также может быть полезен диагностически для измерений его кодированной РНК и белка при питательных расстройствах. Важно знать, в конкретном питательном расстройстве, является ли ОВ-РНК и/или ее кодированным белком нерегулируемым или понижающимся. Таким образом, если человек с ожирением имеет повышенные уровни ОВ, то представляется, что проблема находится ниже по потоку от ОВ, в то время как, если ОВ уменьшается, очевидно, что несоответствующим образом низкие уровни ОВ могут быть причиной ожирения (независимо от того, находится или нет дефект в гене ОВ). И наоборот, если у пациента с раком или СПИД, у которого утраченный вес имел повышенные уровни ОВ, можно сделать вывод, что соответственно высокая экспрессия ОВ отвечает за потерю веса.

Клонированная кДНК человека будет использоваться для измерения уровней РНК ОВ человека. Кроме того, рекомбинантный белок человека будет получен и использован для разработки иммуноанализов для обеспечения возможности измерения содержания жира и, возможно, в плазме белка ОВ.

Терапевтические последствия

Полипептиды, нуклеиновые кислоты и антитела по изобретению имеют значительный терапевтический потенциал. Предпочтительно терапевтически эффективное количество такого агента вводят в фармацевтически приемлемом носителе, разбавителе или эксципиенте.

Фраза "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным объектам и композициям, которые являются физиологически переносимыми и, как правило, не вызывают аллергического или подобным образом не к реакции, такой как желудочный сбой, головокружение и тп, при введении человеку. Предпочтительно, как используется в настоящем документе, термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим ведомством федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей. Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или транспортному средству, с которым вводят соединение. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефти, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Водные или растворные солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина предпочтительно используют в качестве носителей, в частности для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические носители описаны в Martin, Remington 's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Publishing Co. Easton, PA, (1990).

Фраза "терапевтически эффективное количество" используется в настоящем документе для обозначения количества, достаточного для уменьшения по меньшей мере примерно на 15%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно предотвращать клинически значимый дефицит активности, функции и ответа хозяина. Альтернативно, терапевтически эффективное количество является достаточным для того, чтобы вызвать улучшение клинически значимого состояния у хозяина.

Введение рекомбинантного полипептида ОВ приводит к потере массы, в частности к уменьшению жировой ткани. Полипептид ОВ может быть получен с использованием стандартных векторов экспрессии бактерий и/или млекопитающих, синтетически или очищенных из плазмы или сыворотки, все как указано подробно ранее в настоящем документе. Альтернативно, повышенная экспрессия нативного полипептида ОВ может быть индуцирована методами гомологичной рекомбинации, как описано выше.

Снижение активности полипептида ОВ (путем разработки антагонистов, ингибиторов, применения нейтрализующих антител или антисмысловых молекул) должно приводить к увеличению веса, что может быть желательным для лечения потери веса, связанной с раком, СПИД или нервная анорексия. Модуляция активности ОВ может быть полезной для снижения массы тела (путем увеличения его активности) или увеличения массы тела (путем снижения его активности).

Терапевтическое лечение на основе полипептида

В простейшем анализе ген ОВ определяет массу тела у млекопитающих, в частности мышей и человека. Продукт гена ОВ и, соответственно, конъюгные молекулы, по-видимому, являются частью сигнального пути, с помощью которого жировая ткань общается с мозгом и другими органами. Считается, что полипептид ОВ сам по себе представляет собой сигнальную молекулу, т.е. гормон.

Полипептид ОВ или его функционально активный фрагмент или его антагонист можно вводить перорально или парентерально, предпочтительно парентерально. Поскольку метаболический гомеостаз является непрерывным процессом, предпочтительным является введение полипептида с контролируемым высвобождением. Например, полипептид можно вводить с использованием внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других режимов введения. В одном варианте осуществления можно использовать насос [Long et al. eds. , *Medical Applications of Controlled Release*, CRC Pres. , 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)]. В другом варианте осуществления могут быть использованы полимерные материалы [Langer, 1974, выше; Sefton, 1987, выше; Smoen 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); см. также Levy et al, *Science*, 228: 190 (1985); во время et al. *Ann. Neurol*, 25: 351 (1989); Howard et al. *J Neurosurg.* , 71: 105(1989)]. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена вблизи терапевтической мишени, т.е. головного мозга, таким образом, требуется только часть системной дозы [см. например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, pp. 115-138(1984)]. Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer, *Science*, 249: 1527-1533 (1990). В другом варианте осуществления терапевтическое соединение можно доставлять в везикулу, в частности липосому (см. Langer, 1990 выше); Treat et al. в липосомах в терапии инфекционного заболевания и рака, Lopez-Berestein и Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.* pp. 317 -327; см. в целом *ibid.*)

В дополнительном аспекте рекомбинантные клетки, которые были трансформированы геном ОВ и которые экспрессируют высокие уровни полипептида, могут быть трансплантированы субъекту, нуждающемуся в использовании полипептида. Предпочтительно, аутологичные клетки, трансформированные ОВ, трансплантируют во избежание отторжения; альтернативно, для защиты неаутологичных клеток, которые продуцируют растворимые факторы в полимерной матрице, которая предотвращает иммунное распознавание и отторжение, доступна технология.

Полипептид ОВ может быть доставлен внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным или подкожным путями введения. Альтернативно, полипептид ОВ, правильно составленный, можно вводить путем назального или перорального введения. Постоянная подача ОВ может быть обеспечена путем обеспечения терапевтически эффективной дозы (т.е. дозы, эффективной для индуцирования метаболических изменений у субъекта) в необходимых интервалах, например, ежедневно, каждые 12 часов и т.д. Эти параметры будут зависеть от тяжести состояния заболевания, подлежащего лечению, других действий, таких как модификация рациона, которые реализуются, веса, возраста и пола субъекта, и других критериев, которые могут быть легко определены в соответствии со стандартной хорошей медицинской практикой специалистами в данной области техники.

Фармацевтические композиции

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, описанные выше. Такие фармацевтические композиции могут быть предназначены для введения для введения или для перорального, легочного, назального или других форм введения. В целом, настоящее изобретение охватывает фармацевтические композиции, содержащие эффективные количества белка или производных продуктов по

изобретению вместе с фармацевтически приемлемыми разбавителями, консервантами, солюбилизаторами, эмульгаторами, адъювантами и/или носителями. Такие композиции включают разбавители различного буферного содержимого (например, Tris-HCl, ацетат, фосфат), pH и ионную силу; добавки, такие как детергенты и солюбилизующие агенты (например, Tween 80, полисорбат 80), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия), консерванты (например, тимерсол, бензиловый спирт) и объемообразующие вещества (например, лактозу, маннит); включение материала в препараты в форме панцита полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и тд, или в липосомы. Также может быть использована лауриновая кислота. Такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* настоящих белков и производных. См. например, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co. Easton, PA 18042) pages 1435 -1712, которые включены в настоящий документ путем ссылки. Композиции могут быть получены в жидкой форме или могут находиться в высушенном порошке, таком как лиофилизированная форма.

Пероральная доставка

В настоящем документе предусмотрены пероральные твердые лекарственные формы, которые описаны в целом в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990 Mack Publishing Co. Easton PA 18042) в главе 89, которая включена в настоящий документ путем ссылки. Твердые лекарственные формы включают таблетки, капсулы, пилюли, пастилки или пастилки, облатки или пеллеты. Также липосомальная или протеидная инкапсуляция может быть использована для формулирования настоящих композиций (как, например, белковые микросферы, представленные в патенте США № 4,925,673). Липосомальная инкапсуляция может быть использована, и липосомы могут быть дериватизированы с помощью различных полимеров (например, патент США № 5013556). Описание возможных твердых лекарственных форм для терапевтического лечения приведено в публикации Marshall, в Modern Pharmaceutics, Chapter 10, Banker and Rhodes ed. (1979), включенной в настоящий документ путем ссылки. В целом, состав будет включать белок (или химически модифицированный белок) и инертные ингредиенты, которые обеспечивают защиту от окружающей среды желудка и высвобождение биологически активного материала в кишечнике.

Также конкретно предусматриваются пероральные лекарственные формы указанных выше дериватизированных белков. Белок может быть химически модифицирован таким образом, что пероральная доставка производного является эффективной. Как правило, рассматриваемая химическая модификация представляет собой присоединение по меньшей мере одного фрагмента к самому белку (или пептиду), где указанный фрагмент позволяет (а) ингибировать протеолиз; и (b) поглощение в кровоток из желудка или кишечника. Также желательно повышение общей стабильности белка и увеличение времени циркуляции в организме. Примеры таких фрагментов включают: полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон и полипролин. Abuchwski et al, 1981, *supra*; Newmark et al. J Appl. Biochem. 4: 185-189 (1982). Другими полимерами, которые могут быть использованы, являются поли -1,3-диоксолан и поли -1,3,6-тиоксанан. Предпочтительными для фармацевтического применения, как указано выше, являются фрагменты полиэтиленгликоля.

Для белка (или производного) местоположение высвобождения может представлять собой желудок, тонкую кишку (двенадцатиперстную кишку, еюму или подвздошную кишку) или толстую кишку. Специалист в данной области техники имеет доступные составы, которые не будут растворяться в желудке, но при этом высвобождают материал в двенадцатиперстной кишке или где-либо еще в кишечнике. Предпочтительно, высвобождение предотвратит вредные эффекты окружающей среды желудка либо путем защиты белка (или производного), либо путем высвобождения биологически активного материала за пределы окружающей среды желудка, например, в кишечнике.

Для обеспечения полного желудочного сопротивления необходимо покрытие, непроницаемое по меньшей мере до pH 5,0. Примерами более распространенных инертных ингредиентов, которые используются в качестве энтеросолюбильных покрытий, являются тримеллитат ацетата целлюлозы (CAT), фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, поливинилацетатфталат (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ацетат фталат целлюлозы (CAP), Eudragit L, Eudragit S и Шеллак. Эти покрытия могут быть использованы в качестве смешанных пленок.

Покрытие или смесь покрытий также можно использовать на таблетках, которые не предназначены для защиты от желудка. Это может включать в себя сахарные покрытия или покрытия, которые облегчают проглатывание таблетки. Капсулы могут состоять из твердой оболочки (такой как желатин) для доставки сухого лекарственного средства, те порошка; для жидких форм может быть использована мягкая желатиновая оболочка. Материал оболочки sachets может представлять собой толстый крахмал или другую съедобную бумагу. Для таблеток, пастилок, формованных таблеток или таблетированных таблеток могут быть использованы влажные методики массирования.

Терапевтическое средство может быть включено в состав в виде мелких частиц в форме гранул или пеллет с размером частиц около 1 мм. Состав материала для введения капсул также может быть в виде порошка, слегка сжатых пробок или даже в виде таблеток. Терапевтическое средство может быть получено путем сжатия.

Могут быть включены красители и ароматизирующие вещества. Например, белок (или производное) может быть составлен (например, путем инкапсуляции липосомы или микросфер), а затем дополнительно содержится внутри съедобного продукта, такого как охлажденный напиток, содержащий красители и ароматизирующие вещества.

Можно разбавить или увеличить объем терапевтического средства инертным материалом. Эти разбавители могут включать углеводы, особенно маннит, α -лактозу, безводную лактозу, целлюлозу, сахарозу, модифицированные декстраны и крахмал. Некоторые неорганические соли также могут быть использованы в качестве наполнителей, включая трифосфат кальция, карбонат магния и хлорид натрия. Некоторые коммерчески доступные разбавители представляют собой Fast-Flo, Emdex, Starx 1500, Emcompss и Avicell.

Разрыхлители могут быть включены в состав терапевтического средства в твердую лекарственную форму. Материалы, используемые в качестве разрыхлителей, включают, но не ограничиваются ими, крахмал, включающий коммерческий дезинтегрант на основе крахмала, Exptab. Можно использовать гликолят крахмала натрия, Amberlite, карбоксиметилцеллюлозу натрия, ультраамилопектин, альгинат натрия, желатин, цедру апельсина, кислоту карбоксиметилцеллюлозу, природную губку и бентонит. Другой формой разрыхлителей являются нерастворимые катионообменные смолы. Порошкообразные камеди могут быть использованы в качестве разрыхлителей и в качестве связующих, и они могут включать порошкообразные камеди, такие как агар, Кагуа или трагакант. Альгиновая кислота и ее натриевая соль также полезны в качестве разрыхлителей.

Связующие можно использовать для удерживания терапевтического агента вместе с образованием твердой таблетки и включают материалы из натуральных продуктов, таких как аравийская камедь, трагакант, крахмал и желатин. Другие включают метилцеллюлозу (MC), этилцеллюлозу (EC) и карбоксиметилцеллюлозу (CMC). Поливинилпирролидон (PVP) и гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC) оба можно использовать в спиртовых растворах для гранулирования терапевтического средства.

Антифрикционный агент может быть включен в состав терапевтического средства для предотвращения прилипания во время процесса приготовления. Смазывающие вещества могут быть использованы в качестве слоя между терапевтической и штамповочной стенкой, и они могут включать, но не ограничиваются ими: стеариновую кислоту, включающую ее соли магния и кальция, политетрафторэтилен (PTFE), жидкий парафин, растительные масла и воски. Также могут быть использованы растворимые лубриканты, такие как лаурилсульфат натрия,

лаурилсульфат магния, полиэтиленгликоль с различными молекулярными массами и Carbowax 4000 и 6000.

Могут быть добавлены скользящие вещества, которые могут улучшать свойства потока лекарственного средства во время приготовления и способствовать перегруппировке во время сжатия. Скользящие вещества могут включать крахмал, тальк, пирогенный диоксид кремния и гидратированный силикоалюминат.

Для облегчения растворения терапевтического средства в водной среде в качестве смачивающего агента может быть добавлено поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества могут включать анионные детергенты, такие как лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты могут быть использованы и могут включать бензалкония хлорид или бензетониум хлорид. Список потенциальных неионных детергентов, которые могут быть включены в состав в качестве поверхностно-активных веществ, представляют собой лаурилмакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, полисорбат 40, 60, 65 и 80, сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Эти поверхностно-активные вещества могут присутствовать в составе белка или производного либо отдельно, либо в виде смеси в различных соотношениях.

Добавки, которые потенциально усиливают поглощение белка (или производного), представляют собой, например, олеиновую кислоту жирных кислот, линолевую кислоту и линоленовую кислоту.

Состав с контролируемым высвобождением может быть желательным. Лекарственное средство может быть включено в инертную матрицу, которая позволяет высвобождать либо диффузионные, либо выщелачивающие механизмы. Е. десны. Медленно дегенерирующие матрицы также могут быть включены в состав. Другая форма контролируемого высвобождения этого терапевтического средства представляет собой способ на основе терапевтической системы Oros (Alza Corp.), где лекарственное средство заключено в полупроницаемую мембрану, которая позволяет воде поступать и выталкивать лекарственное средство через одно небольшое отверстие вследствие осмотических эффектов. Некоторые энтеросолюбильные покрытия также обладают эффектом замедленного высвобождения.

Для композиции могут быть использованы другие покрытия. Они включают в себя множество сахаров, которые могут быть нанесены в сквороте для нанесения покрытия. Терапевтическое средство также может быть представлено в таблетке с пленочным покрытием; материалы, используемые в этом случае, разделены на 2 группы. Первыми являются незэнтеросолюбильные материалы и включают метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, метилгидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, провирус и полиэтиленгликоли. Вторая группа состоит из кишечнорастворимых материалов, которые обычно представляют собой сложные эфиры фталевой кислоты.

Смесь материалов может быть использована для получения оптимального пленочного покрытия. Пленочное покрытие может быть выполнено в устройстве для нанесения покрытий или в псевдооживленном слое или путем компрессионного покрытия.

Легочная доставка

Также в настоящем документе предусматривается легочная доставка настоящего белка (или его производных). Белок (или производное) доставляется в легкие млекопитающего при вдохе и проходит через эпителиальную выстилку легкого в кровоток. Другие сообщения этого включают Adjei et al, *Pharmaceutical Research*, 7 (6): 565-569 (1990); Adjei et al. *International Journal of Pharmaceutics*, 63: 135-144 (1990) (лейпролид ацетат); Braquet et al. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (suppl. 5): 143-146 (1989) (эндотелин -1); Hubbard et al, *Annals of Internal Medicine*, 3 (3): 206-212 (1989) (α 1-антитрипсин); Smith et al. *J Clin. Инжит.*, 84: 1145-1146 (1989) (А1-протеиназа); Oswein et al. "Аэрозолизация белков", *Proceedings of Symposium on*

Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, (March 1990) (рекомбинантный человеческий гормон роста); Debs et al, J Immunol, 140: 3482-3488 (1988) и Platz et al. патент США № 5284656 (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор). Предполагается, что для использования при практическом применении этого изобретения широкий диапазон механических устройств, предназначенных для легочной доставки терапевтических продуктов, включая, но не ограничиваясь этим, небулайзеры, дозированные ингаляторы и порошковые ингаляторы, все из которых знакомы специалистам в данной области техники.

Некоторые конкретные примеры коммерчески доступных устройств, подходящих для практического осуществления настоящего изобретения, представляют собой тубулайзер Ultravent, производимый Mallinckrodt, Inc. St. Louis, Missouri; Acorn π -небулайзер, производимый Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; ингалятор дозированной дозы Ventolin производства Glaxo Inc. Research Triangle Park, North Carolina; и порошковый ингалятор Спрингальтора, производимый компанией Fisons Corp. Bedford, Massachusetts.

Все такие устройства требуют применения составов, подходящих для дозирования белка (или производного). Как правило, каждый состав относится к типу используемого устройства и может включать применение соответствующего топливного материала в дополнение к обычным разбавителям, адъювантам и/или носителям, полезным в терапии. Также предполагается использование липосом, микрокапсул или микросфер, комплексов включения или других типов носителей. Химически модифицированный белок также может быть получен в различных составах в зависимости от типа химической модификации или типа используемого устройства.

Композиции, подходящие для применения с небулайзером, либо струей, либо ультразвуком, как правило, содержат белок (или производное), растворенный в воде в концентрации от примерно 0,1 до 25 мг биологически активного белка на мл раствора. Состав может также включать буфер и простой сахар (например, для стабилизации белка и регулирования осмотического давления). Композиция небулайзера может также содержать поверхностно-активное вещество, чтобы уменьшить или предотвратить индуцированную поверхностью агрегацию белка, вызванную распылением раствора при образовании аэрозоля.

Составы для применения с дозирующим ингаляторным устройством, как правило, содержат тонкоизмельченный порошок, содержащий белок (или производное), суспендированный в пропелленте с помощью поверхностно-активного вещества. Пропеллент может быть любым обычным материалом, используемым для этой цели, таким как хлорфторуглерод, гидрохлорфторуглерод, гидрофторуглерод или углеводород, включая трихлорфторметан, дихлордифторметан, дихлортетрафторэтанол и 1,1,1,2-тетрафторэтан, или их комбинации. Подходящие поверхностно-активные вещества включают сорбитан триолеат и соевый лецитин. Олеиновая кислота также может быть полезна в качестве поверхностно-активного вещества.

Составы для дозирования из порошкового ингаляторного устройства будут содержать тонко измельченный сухой порошок, содержащий белок (или производное), и могут также включать объемобразующий агент, такой как лактоза, сорбит, сахароза или маннит в количествах, которые облегчают диспергирование порошка из устройства, например, от 50 до 90% по массе композиции. Белок (или производное) наиболее предпочтительно должен быть получен в форме панцита со средним размером частиц менее 10 мкм (или микрон), наиболее предпочтительно от 0,5 до 5 мкм, для наиболее эффективной доставки к дистальному легкому.

Назальная доставка

Также предполагается назальная доставка белка (или производного). Назальная доставка обеспечивает прохождение белка в кровоток непосредственно после введения терапевтического продукта в нос без необходимости осаждения продукта в легком. Составы для назальной доставки включают таковые с декстраном или циклодекстраном.

Способы лечения, способы получения лекарственного средства

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены способы лечения и производства лекарственного средства. Условия, облегчаемые или модулируемые введением настоящих производных, являются такими, как указано выше.

Дозировки

Для всех вышеуказанных молекул, как дальнейшие исследования, информация будет появляться в отношении соответствующих уровней дозировки для лечения различных состояний у различных пациентов, и обычный специалист, принимая во внимание терапевтический контекст, возраст и общее состояние здоровья реципиента, будет способен установить надлежащую дозировку. Как правило, для инъекции или инфузии дозировка будет составлять от 0,01 мкг биологически активного белка/кг массы тела (расчет массы только белка, без химической модификации) и 10 мг/кг (на основе этого). График дозирования может варьироваться в зависимости от периода полужизни циркуляции белка или производного, используемого, доставляется ли полипептид болюсной дозой или непрерывным вливанием, и используемым составом.

Введение с другими соединениями

Для терапии, связанной с ожирением, можно вводить настоящий белок (или производные) в сочетании с одной или несколькими фармацевтическими композициями, используемыми для лечения других клинических осложнений ожирения, таких как используемые для лечения диабета (например, инсулина), высокого кровяного давления, высокого холестерина и других неблагоприятных условий, падающих на ожирение. Кроме того, могут быть введены другие средства, подавляющие аппетит, например амфетамины. Введение может быть одновременно (например, введение смеси настоящего белка и инсулина) или может быть серийно.

Терапевтическое лечение на основе нуклеиновой кислоты

Ген ОВ может быть введен в человеческие жировые клетки для разработки генной терапии ожирения. Ожидается, что такая терапия будет снижать массу тела. И наоборот, введение антисмысловых конструкций в жировые клетки человека уменьшило бы уровни активного полипептида ОВ и было бы предсказано, чтобы увеличить ожирение организма.

В одном варианте осуществления ген, кодирующий полипептид ОВ, вводят *in vivo* в вирусном векторе. Такие векторы включают аттенуированный или дефектный вирус ДНК, такой как, без ограничений, вирус простого герпеса (HSV), вирус папилломы, вирус Эпштейна Барр (EBV), аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV) и тп. Предпочтительными являются дефектные вирусы, которые полностью или почти полностью не обладают вирусными генами. Дефектный вирус не является инфекционным после введения в клетку. Использование дефектных вирусных векторов позволяет вводить клетки в определенной локализованной области, не касаясь того, что вектор может инфицировать другие клетки. Таким образом, жировая ткань может быть специально нацелена. Примеры конкретных векторов включают, но не ограничиваются ими, дефектный вектор вируса герпеса 1 (Hsv1) [Kaplitt et al. *Molec. Cell. Neurosci.* 2: 320-330 (1991)], аттенуированный аденовирусный вектор, такой как вектор, описанный Stratford-Perricaudet et al. *J Clin. Invest.* 90: 626-630 (1992), и дефектный аденоцитируемый вирусный вектор [Samulski et al. *J Virol*, 61: 3096-3101 (1987); Samulski et al. *J Virol.* 63: 3822-3828(1989)].

В другом варианте осуществления ген может быть введен в ретровирусный вектор, например, как описано в патенте США № 5399346 на имя Anderson и др. Mann et al. *Cell*, 33: 153 (1983); Temin et al. патент США № 4650764; Temin et al. патент США № 4980289; Markowitz et al, *J Virol*, 62: 1120 (1988); Temin et al. патент США № 5124263; международная патентная публикация № WO 95/07358, опубликованная 16 марта 1995 г. Dougherty et al. и Kuo et al. *Blood*, 82: 845 (1993).

Альтернативно, вектор может быть введен *in vivo* путем липофекции. В течение предыдущего десятилетия было увеличено применение липосом для инкапсуляции и трансфекции нуклеиновых кислот *in vitro*. Синтетические катионные липиды, предназначенные для ограничения трудностей и опасностей, встречающихся с опосредованной липосомой

трансфекцией, могут быть использованы для получения липосом для трансфекции *in vivo* гена, кодирующего маркер [Feigner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987); см. Macky et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8027-8031 (1988)]. Использование катионных липидов может способствовать инкапсуляции отрицательно заряженных нуклеиновых кислот, а также способствовать слиянию с отрицательно заряженными клеточными мембранами [Feigner et al. Science, 337: 387-388 (1989)]. Использование липофекции для введения экзогенных генов в конкретные органы *in vivo* имеет определенные практические преимущества. Молекулярное нацеливание липосом на конкретные клетки представляет собой одну область пользы. Ясно, что направление трансфекции к конкретным типам клеток будет особенно полезным в ткани с клеточной гетерогенностью, такой как поджелудочная железа, печень, почка и головной мозг. Липиды могут быть химически связаны с другими молекулами с целью нацеливания (см. Maskey et al. 1988, выше). Нацеленные пептиды, например, гормоны или нейротрансмиттеры, и белки, такие как антитела или непептидные молекулы, могут быть химически связаны с липосомами.

Также можно вводить вектор *in vivo* в качестве оголенной ДНК-плазмиды. Оголенные ДНК-векторы для генной терапии могут быть введены в желаемые клетки-хозяева способами, известными в данной области, например, трансфекцией, электропорацией, микроинъекцией, трансдукцией, слиянием клеток, декстраном DEAE, осаждением фосфата кальция, использованием генной пушки или использованием переносчика ДНК-вектора (см. например, Wu et al. J Biol. Chem. 267: 963-967 (1992); Wu et al. J Biol. Chem. 263: 14621-14624 (1988); Hartmut et al. Canadian Patent Application No. 2012311, поданной 15 марта 1990).

Сельскохозяйственные применения

Ген ОВ также может быть выделен из домашних животных, и соответствующий полипептид ОВ, полученный таким образом. В конкретном примере ниже зонд, полученный из гена ОВ мыши, гибридизуется с соответствующими гомологичными кодирующими последовательностями из большого количества видов животных. Как обсуждалось для терапии человека, рекомбинантные белки также можно получать и вводить домашним животным. Введение полипептида может быть реализовано для получения более бедных пищевых животных, таких как говяжий крупный рогатый скот, свиньи, домашняя птица, овцы и тд. Предпочтительно вводят аутологичный полипептид ОВ, хотя изобретение предусматривает также введение антиаутологичного полипептида. Поскольку полипептид ОВ состоит из приблизительно 160 аминокислотных остатков, он не может быть высокоиммуногенным. Таким образом, введение неаутологичного полипептида может не приводить к иммунному ответу.

Альтернативно, введение клонированных генов в трансгенные домашние животные позволит потенциально уменьшить массу тела и ожирение путем сверхэкспрессии трансгена ОВ. Простейшими средствами достижения этого можно было бы нацеливать трансген ОВ на жир с использованием собственного или другого специфичного для жира промотора.

И наоборот, в других обстоятельствах может быть желательным увеличение жира в организме, например, для развития говядины Кобе или жировой печени, чтобы получить жеребку. Это может быть достигнуто путем нацеливания на антисмысловой трансген ОВ на жир или с использованием технологии нокаута генов. Альтернативно, если требуется увеличение массы тела при процентном содержании жира, может быть введен ингибитор или антагонист полипептида ОВ. Такие ингибиторы или антагонисты включают, но не ограничиваются ими, антитела, способные вступать в реакцию с полипептидом, и фрагменты полипептида, которые связываются, но не активируют рецептор ОВ, те антагонисты полипептида ОВ.

Косметические последствия

Полипептид ОВ имеет значительное значение для косметического применения в дополнение к пользе для здоровья. В частности, поскольку полипептиды ОВ по изобретению, включая их производные и аналоги-агонисты, полезны для модуляции скорости и количества

отложения жировых клеток у животного, они полезны для уменьшения неприглядной жировой ткани, например, жировых отложений в животе, бедрах, шее и подбородке, которые не обязательно составляют ожирение, но которые тем не менее ухудшают внешний вид индивидуума. Считается, что эффект снижения жира достигается частично за счет снижения аппетита, т.е. снижения потребления пищи, путем увеличения базального метаболизма или и того, и другого. Таким образом, настоящий полипептид ОВ или его производные или аналоги агониста полезен для введения субъекту для осуществления косметических изменений в отложениях жировой ткани, путем модуляции отложения жира, снижения аппетита или и того, и другого.

Кроме того, настоящие композиции и способы могут быть использованы в сочетании с различными процедурами, такими как косметические операции, предназначенные для изменения общего внешнего вида тела (например, липосальных или лазерных хирургических вмешательств, предназначенных для уменьшения массы тела путем аспирации или абляции жировой ткани), физических упражнений (особенно при тренировке и тренировке по массе), рациона с низким содержанием жира, гипноза, биологической обратной связи, в качестве примеров способов можно попытаться уменьшить процент жировой ткани и улучшить внешний вид тела.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу осуществления косметической модуляции жировой ткани у индивидуума, включающему введение жирового модулирующего количества полипептида ОВ, или его производного или агониста, индивидууму, которому требуется косметическая модуляция жировой ткани для улучшения внешнего вида тела. В конкретном аспекте модуляция жировой ткани является следствием подавления аппетита. Предпочтительно, модуляция жировой ткани представляет собой уменьшение жировой ткани.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к способу осуществления косметической потери жировой ткани, включающему объединение процедуры изменения внешнего вида тела с введением жирового модулирующего количества полипептида ОВ, или его производного или агониста, индивидууму, которому требуется косметическая модуляция жировой ткани для улучшения внешнего вида тела.

ОВ Рецептор

Развитие низкомолекулярных агонистов и антагонистов фактора ОВ будет значительно облегчено выделением его рецептора. Это может быть достигнуто путем получения активного полипептида ОВ и использования его для скрининга библиотеки экспрессии с использованием стандартной методики. Связывание рецептора в экспрессионной библиотеке может быть протестировано путем введения рекомбинантного полипептида, полученного с использованием либо бактериальных, либо млекопитающих экспрессионных векторов, и наблюдения за эффектами кратковременного и непрерывного введения рекомбинантного полипептида на клетки экспрессионной библиотеки или путем непосредственного обнаружения связывания ОВ полипептида с клетками.

В настоящее время считается, что рецептор ОВ, вероятно, расположен в гипоталамусе, и, возможно, печень, предпочтительно библиотеки кДНК из этих тканей будут сконструированы в стандартных экспрессионных клонирующих векторах. Эти клоны кДНК затем вводили в клетки COS в виде пулов, и полученные трансформанты подвергали скринингу активным лигандом для идентификации клеток COS, экспрессирующих рецептор ОВ. Положительные клоны затем можно выделить таким образом, чтобы восстановить клонированный рецептор. Клонированный рецептор используется в сочетании с лигандом ОВ (предполагая, что он является гормоном) для разработки необходимых компонентов для скрининга низкомолекулярных модуляторов ОВ.

Конкретная система анализа, которая должна использоваться в соответствии с настоящим изобретением, известна как анализ рецептора. В анализе рецепторов подлежащий анализу материал является соответствующим образом меченым, и затем определенные клеточные тестируемые колонии инокулируют количеством как меченого, так и немеченого материала,

после чего проводят исследования связывания для определения степени, до которой меченый материал связывается с клеточными рецепторами. Таким образом, можно установить различия в аффинности между материалами.

Соответственно, очищенное количество модулятора веса может быть радиоактивно мечено и объединено, например, с антителами или другими ингибиторами к ним, после чего проводили исследования связывания. Затем готовили растворы, содержащие различные количества меченого и немеченого некомбинированного весового модулятора, и затем образцы клеток инокулировали и затем инкубировали. Полученные монослои клеток затем промывают, солибилизируют и затем подсчитывают в гамма-счетчике в течение периода времени, достаточного для получения стандартной ошибки $< 5\%$. Эти данные затем подвергаются анализу Scatchard, после чего могут быть проведены наблюдения и заключения касательно активности материала. Хотя вышеизложенное является примерным, он иллюстрирует способ, которым может быть выполнен и использован рецепторный анализ, в случае, когда способность к клеточному связыванию анализируемого материала может служить отличительной характеристикой. В свою очередь, анализ рецепторов будет особенно полезен при идентификации конкретных рецепторов для настоящих модуляторов, таких как db-рецептор.

Дополнительный анализ, полезный и предусмотренный в соответствии с настоящим изобретением, известен как анализ "цис/транс". Вкратце, в этом анализе используются две генетические конструкции, одна из которых обычно представляет собой плазмиду, которая непрерывно экспрессирует конкретный представляющий интерес рецептор при трансфицировании в соответствующую клеточную линию, и вторая из которых представляет собой плазмиду, которая экспрессирует репортер, такой как люцифераза, под контролем комплекса рецептор/лиганд. Таким образом, например, если желательно оценить соединение в качестве лиганда для конкретного рецептора, одна из плазмид будет конструкцией, которая приводит к экспрессии рецептора в выбранной клеточной линии, в то время как вторая плазида будет обладать промотором, связанным с геном люциферазы, в который вставлен ответный элемент для конкретного рецептора. Если исследуемое соединение является агонистом рецептора, лиганд будет комплексно с рецептором, и полученный комплекс будет связывать ответный элемент и инициировать транскрипцию гена люциферазы. Затем полученную хемилюминесценцию измеряют фотометрически, и получают кривые зависимости ответа от дозы и сравнивают с результатами известных лигандов. Вышеупомянутый протокол подробно описан в патенте США № 4981, 784 и международной публикации PCT № WO 88/03168, для чего специалист в данной области техники называется.

После идентификации рекомбинантного, который экспрессирует последовательность гена ОВ-рецептора, может быть проанализирован рекомбинантный ОВ-рецептор. Это достигается с помощью анализов, основанных на физических или функциональных свойствах ОВ-рецептора, включая радиоактивное мечение рецептора с последующим анализом посредством гель-электрофореза, иммуноферментного анализа, связывания лиганда и т.д. Кроме того, антитела к ов-рецептору могут быть получены, как описано выше.

Структура ОВ-рецептора может быть проанализирована различными способами, известными в данной области техники. Предпочтительно, анализируют структуру различных доменов, в частности, сайта связывания ОВ. Структурный анализ может быть выполнен путем идентификации сходства последовательностей с другими известными белками, конкретными гормональными и белковыми рецепторами. Степень сходства (или гомологии) может обеспечивать основу для прогнозирования структуры и функции ОВ-рецептора или его домена. В конкретном варианте осуществления сравнения последовательностей могут быть выполнены с последовательностями, найденными в Genbank, с использованием, например, программ FASTA и FASTP [Pearson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-48 (1988)].

Белковая последовательность может быть дополнительно охарактеризована анализом гидрофильности (например, Нор et al, 1981, выше). Профиль гидрофильности может быть использован для идентификации гидрофобных и гидрофильных областей белка ОВ-рецептора,

которые, в свою очередь, могут указывать экстрацитоплазматическое, мембранное связывание и области in.racytoplas.nic.

Также может быть выполнен вторичный структурный анализ (например, Chou et al. 1974, см. выше), чтобы идентифицировать области ОВ-рецептора, которые предполагают конкретные вторичные структуры.

Прогнозирование, трансляция и прогнозирование вторичной структуры, а также прогнозирование открытой рамки считывания и построение графика, также могут быть выполнены с использованием компьютерных программ, доступных в данной области техники.

Путем обеспечения обильного источника рекомбинантного полипептида ОВ и возможности выделения ОВ-рецептора (те продукта гена db) настоящее изобретение обеспечивает количественное структурное определение активной конформации полипептида ОВ и ОВ-рецептора или его доменов. В частности, достаточно материала для ядерного магнитного резонанса (ЯМР), инфракрасного (ИК), рамановского и ультрафиолетового (УФ), особенно кругового дихроизма (CD), спектроскопического анализа. В частности, ЯМР обеспечивает очень мощный структурный анализ молекул в растворе, что более близко аппроксимирует их нативную среду (Marion et al. 1983, supra; Bar et al. 1985, supra; Kimura et al, 1980, supra). Также могут быть использованы другие способы структурного анализа. Они включают, без ограничений, рентгеновскую кристаллографию (Engstrom, 1974, выше).

Более предпочтительно могут быть изучены сокристаллы полипептида ОВ и рецептора ОВ. Анализ сокристаллов обеспечивает подробную информацию о связывании, что, в свою очередь, позволяет рационально конструировать агонисты и антагонисты лигандов. Можно также использовать компьютерное моделирование, особенно в связи с ЯМР или рентгеновскими методами [Flexterick et al. eds. , Computer Graphics and Molecular Modeling, in Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1986)].

Идентификация и выделение гена, кодирующего ОВ-рецептор согласно изобретению, обеспечивает экспрессию рецептора в количествах, больших, чем можно выделить из природных источников, или в индикаторных клетках, специально разработанных для индикации активности рецептора, экспрессируемого после трансфекции или трансформации клеток. Соответственно, в дополнение к рациональной конструкции агонистов и антагонистов, основанных на структуре полипептида ОВ, настоящее изобретение предусматривает альтернативный способ идентификации специфических лигандов ОВ рецептора с использованием различных анализов скрининга, известных в данной области техники.

Изобретение может быть лучше понято со ссылкой на следующие примеры, которые предназначены для примера изобретения и не ограничивают его.

ПРИМЕРНАЯ СЕКЦИЯ

Нижеследующее очерчивает способ, используемый для идентификации генетического материала, который является примером настоящего изобретения. Эта endeavor содержит четыре последовательных этапа: А) генетическое картирование, В) Физическое картирование, С) Выделение гена-кандидата, и D) обнаружение мутации. После подтверждения того, что мышинный ген в объекте был выделен (Стадия D), был проведен поиск гомологичного гена человека, и были охарактеризованы как гены мыши и человека, так и предполагаемые белки. Эти стадии обобщены более подробно ниже.

А Генетическое картирование

Мутация об была разделена на генетические скрещивания, и стандартный анализ связывания использовали для позиционирования мутации относительно RFLP (полиморфизмов длины рестрикционных фрагментов). Эти данные, помещенные в ген ОВ в интервале ~ 5 сМ на проксимальной хромосоме мыши 6. (5 сМ-измерение генетического расстояния, соответствующего 5 кажущимся генетическим кроссинговерам на 100 животных.) Всего 771

информативных мейоз получали и использовали в последующем генетическом картировании (Friedman et al. 1991, выше). Все ранее опубликовали генетические локусы, которые картировались относительно ОБ. Описанные две ближайшие RFLP были определены зондами, полученными из генов карбоксипептидазы и мет онкогена.

Генетическое разрешение описанных выше экспериментов было неадекватным для клона ob, главным образом, поскольку ни один из генетических маркеров не был герметичен. Для идентификации необходимых тесно связанных RFLP выделяли дополнительные зонды и размножали генетическое перекрестие. Метод, известный как микродиссекция хромосом, использовали для выделения случайных кусков ДНК из проксимальной хромосомы 6 мыши [Bahary et al. Mammalian Genome, 4: 511-515 (1993)]. Отдельные клонированные зонды испытывали на герметичную связь с ob. На основании этих исследований был выбран один зонд D6rck13, также называемый psd3, для дальнейшего анализа благодаря его генетической близости к ОБ.

Этот зонд использовали для генотипирования 835 ob потомства из межвидовых и межспецифических скрещиваний, что указывает на то, что D6rck13 является нерекомбинантным у всех 835 животных, как описано в Bahary et al. В ходе физического картирования новый полиморфный маркер был идентифицирован из космидного субклона, полученного из YAC 53A6. Этот новый маркер был расположен между D6rck13 и геном ОБ и был использован для генотипирования дополнительных 771 информативных мейоз из внутривидового межперекрестного и обратного креста. Было определено, что одно животное # 167 имеет кроссинговер рекомбинации между ob и D6rck39. Эти исследования показали, что D6rck39/D6rck13 составляет ~ 0,06 cM от ob. Был идентифицирован дополнительный зонд Рах4, который был. 12 cM проксимальнее об. Рах4 был рекомбинантным у двух животных; # 111 и # 420. Рах4 представляет собой псевдоген, который ранее отображался в проксимальную хромосому 6 мыши по траву и сотрудникам [Травы и др. Genomics, 11: 424-434 (1991)]. На этой основе было определено, что ген ОБ находится в интервале ~ 0,2 cM между Рах4 и D6rck13. Это привело к попыткам клонирования промежуточной ДНК с целью выделения ОБ.

В Физическое картирование

Клонирование ДНК в этом интервале позволило использовать дрожжевые искусственные хромосомы (YAC), относительно новый клонирующий вектор, который обеспечивает клонирование длинных участков непрерывной ДНК часто более чем одной миллиона пар оснований в длину.

Искусственные хромосомы дрожжей выделяли с использованием D6rck13 и Рах4. Это осуществляли путем получения очищенных ДНК-зондов и их применения для выделения соответствующих YAC. Эти YAC (# 8, # 16, # 107 и # 24) были выделены и первоначально охарактеризованы, и на основании полученных анализов был сделан вывод, что YAC 16 представлял собой YAC, который был выдвинут дальше всего дистально, те ближайший к ней. Затем был извлечен ключевой конец YAC # 16, и было определено, что этот конец был ближе к ob, чем Рах4. Этот конец был назван 16М (+). Этот вывод был достигнут, поскольку было показано, что этот зонд не был рекомбинантным у животного # 420 (как было Рах4). Этот конец секвенировали и использовали для разработки ПЦР-анализа. Этот анализ ПЦР использовали для скрининга библиотеки YAC. Были выделены четыре положительных клона. Последующая характеристика этих YAC путем окончания спасения, картирования рестрикции, электрофореза в геле с импульсным полем и блоттинга по Саузерну с генетическими перекрестиями определила, что два из этих YAC, adu и aad были критическими для последующих исследований. AAC aad представляет собой нехимерный YAC 550 kВ, который наиболее удален дистально. Таким образом, дистальный конец этого YAC, aad (pICL) использовали для завершения физической карты. YAC adu представляет собой нехимерный YAC 370 кб, а его дистальный конец, adu (+), был определен как нерекомбинантный во всех потомстве генетических скрещиваний, включая животные № 111 и № 167, что позволяет предположить, что ген ОБ может находиться в этом YAC.

Анализ ПЦР для этих двух концов aad (pICL) и adu (+) был разработан и использован для выделения большого количества YAC и клонов P1 для продолжения физического картирования. Важные P1 клоны, выделенные этим усилием, включали 498, 499, 500 (выделено с использованием зонда, полученного из aad (pICL)) и 322, 323 и 324 (с использованием зонда из adu (+)).

В то же время были охарактеризованы YAC, выделенные D6Rck13 (53A6, 25A8, 25A9, 25A10). Эти исследования определили, что 53A6 проходило дальше всего проксимально к aad YAC. Определяли размер зазора между 53 A6 и aad, равный ~ 70 кВ. Ключевой конец 53A6, 53 (pICL) затем использовали для скрининга трех доступных библиотек YAC и библиотеки P1. Был выделен критический клон P1, 325. Этот клон P1 перекрывался клонами P1, выделенными aad (pICL), как описано выше, и поэтому служил для закрытия зазора между 53 (pICL) и aad (pICL). В результате клонировали весь контиг, содержащий YAC и клоны P1, длиной ~ 2,5 миллиона пар оснований и охватывающий Pax4, 16M (+), adu (+), aad (pICL), 53 (pICL), D6rck39 и D6rck13. Путем тщательного картирования сайтов рекомбинации, очевидных для животного № 111 и № 167, был сделан вывод, что ОВ был расположен в интервале 400 кВ. Для обеспечения источника рабочей ДНК для выделения гена ОВ приблизительно 500 кВ, покрывая эту нерекомбинационную область, выделяли в общей сложности 24 клонов P1. Эти P1 клонов, включая 322 и 323, которые позже оказались полезными клонами, использовали для захвата экзона.

Физическая карта части хромосомы, несущей ОВ, показана на фиг. 7А. На фиг. 7В представлен контиг YAC. Фиг. 7С представляет P1 контиг.

С. Выделение генов-кандидатов

Способ, используемый для выделения генов в этом интервале, представлял собой захват экзона. Этот способ использовали коммерческий вектор для идентификации экзона ДНК (i.e. кодирующие последовательности) путем выбора функциональных акцепторных и донорских последовательностей в геномной ДНК, вводимой в тестовую конструкцию. ДНК из этих клонов P1 выращивали и субклонировали в вектор для захвата экзона. Эти клоны представляли собой короткие вставки, клонированные в вектор Bluescript. Каждый клон амплифицировали с помощью ПЦР-праймеров, соответствующих плазмидным последовательностям, которые фланкировали вставку. ПЦР-амплификацию проводили непосредственно на бактериях, уносивших плазмиду. Реакции устанавливали с использованием робота Biomek. Продукты ПЦР подвергали электрофорезу на 1% агарозном геле в буфере TBE, который содержал бромид этидия. Метод улавливания экзона был модифицирован для устранения контаминирующей ДНК E.coli из клонов P1, и для скрининга обильных артификальных экзонов, которые превысили 80 -90% предполагаемых экзонов, захваченных. Вектор захвата экзона включает в себя последовательности HTV; короткий сегмент этих векторных последовательностей соответствует этому артефакту.

Эксперимент по улавливанию экзонов проводили с использованием различных клонов P1. Затем продукты, улавливающие экзон, амплифицировали с помощью ПЦР, выбирали и секвенировали. Последовательности предполагаемых "экзонов" сравнивали с последовательностями в Genbank с использованием компьютерной программы Blast. Для дальнейшего исследования с помощью ОТ-ПЦР, Северного анализа и зоо-блоттинга для присутствия соответствующих РНК или консервативных последовательностей были выбраны приблизительно пятнадцать экзонов. Было обнаружено, что семь из пятнадцати предполагаемых экзонов 325 -2, 323 -9, 322 -5, D1-F7, 1H3 и 2G7 кодируют транскрипт РНК. 325-2 представляет собой специфический ген яичка; 323-8 и 323 -9, вероятно, являются двумя экзонами из одного и того же гена, экспрессируемого главным образом в мозге и почках. 1H3 и 322-5 представляют собой два транскрипта головного мозга низкого уровня. D1-F7 представляет собой экзон из ранее клонированного гена, инозин монофосфатдегидрогеназы (IMPDH), который имеет повсеместно распространенный характер экспрессии. Ни один из этих

генов не появился для кодирования ОВ. 2G7, который является экзоном ОВ, дополнительно обсуждается ниже.

После трех неудачных усилий для захвата экзона гена ОВ другая попытка была получена путем пулирования ДНК из всей P1s из критической области ОВ. Они включают P1s: 258,259,322, 323,324,325, 498,499,500, 653, 654 и другие. После этого P1s 258,260,322, 498 и 499 субклонировали в вектор для захвата экзона, а затем получали несколько пластин с бактериальными клонами, каждый из которых несет предполагаемый экзон. Получали приблизительно 192 клонов, представляющих предполагаемые кандидаты ОВ. Как отмечено выше, наблюдался согласованный артефакт, так что многие из изолятов содержали два уловленных экзона, полученных из вектора. Таким образом, клоны идентифицировали как по их размеру, так и тем факту, что гибридизация ДНК-зондов, соответствующих этому артефакту, гибридизуется с соответствующими полосами на саузерн-блоттинге геля. Таким образом, 185 из 192 клонов исключали из дальнейшей оценки. Исключение артефактов на основании только одного размера было невозможным, так как это могло бы иметь в конце исключение экзона, соответствующего ОВ.

Таким образом, для 192 экзона было выбрано всего семь экзона для дальнейшего изучения. Готовили шаблоны для секвенирования семи экзона и проводили секвенирование. Анализировали последовательности для семи экзона, и было обнаружено, что семь были идентичными, и один из них был кажущимся артефактом. В частности, клон 1D12 содержал последовательность НТВ, т.е. полосу артефактов. Это левые три экзона для дальнейшего анализа: 1F1, 2G7 и 1H3. 1F1 был исключен из-за того, что он отображался вне критической области. Были выбраны и синтезированы праймеры для ПЦР как для 1H3, так и для 2G7.

Определяли последовательность экзона на 2G7, и она показана на фиг. 10 (SEQ ID NO: 7). Были выбраны и синтезированы праймеры для ПЦР для 2G7. Части последовательности, соответствующие праймерам ПЦР, подчеркнуты. Используемые праймеры представляли собой:

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

(SEQ ID NO: 8)

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

(SEQ ID NO: 9) Эти праймеры амплифицировали геномную ДНК в условиях ПЦР следующим образом: 25-30 циклов при 55° C отжиг на 2', 72° удлинение при 2', 94° C денатурация в течение 1' в стандартном буфере ПЦР. Эти праймеры также использовали для получения меченого зонда путем включения P-dCTP в реакции ПЦР с соответствующим уменьшением количества холодного dCTP.³²

ОТ-ПЦР проводили на различных тканевых РНК, и был сделан вывод, что 2G7 экспрессировали исключительно в белом жире среди исследованных тканей (Фигура 11А). После этого Р-меченый 2G7 гибридизовался с нозерн-блоттингом тканевых РНК (фигура 11В) и показал, что его РНК экспрессируется на высоком уровне в жировой ткани, но либо не экспрессируется, либо экспрессируется на очень низких уровнях во всех других тканях (где сигналы могут быть результатом содержания жира в тканевых препаратах). Десять мкг общей РНК из каждой из перечисленных тканей подвергали электрофорезу на агарозном геле с формальдегидом. Зонд гибридизовали с блоттингом при 65° C в стандартном буфере для гибридизации, Rapid Hybe (Amersham). Размер РНК составлял приблизительно 4,9 кВ. В этот момент 2G7 рассматривали как жизнеспособный ген-кандидат для ОВ и дополнительно анализировали.³²

Обнаружение мутаций D

Для подтверждения того, что 2G7 кодировал ген ОВ, необходимо продемонстрировать различия в уровнях экспрессии РНК последовательности ДНК этого гена в мутанте по сравнению с животными дикого типа. Для исследования доступны две отдельные мутации гена ob, C57BL/6J ob/ob (1J) и Ckc/Smj ob/ob (2J). Они далее будут называться 1J и 2J, соответственно. (Неформальная номенклатура используется для обозначения исследованных штаммов мыши. В данном описании и на чертежах будет понятно, что C57BL/6J относится к

C57BL/6J +/-; CКC/smj относится к SM/Ckc-+ Dас-+/-; CКC/smj ob/ob относится к SM/Ckc-+ Dас-ob/ob). РНК получали из жировой ткани, которая была выделена из 1J, 2J, и контрольных животных. Общую РНК для каждого образца обрабатывали Днказы и затем подвергали обратной транскрипции с использованием олиго-dT в качестве праймера и обратной транскриптазы. Полученную одноцепочечную кДНК затем амплифицировали ПЦР либо с праймерами 2G7 (условиями, показанными выше) для нижней полосы, либо с коммерчески доступными актиновыми праймерами для верхней полосы. Продукты ОТ-ПЦР проводили на 1% агарозном геле TBE, который окрашивали бромидом этидия (фигура 12А). С использованием RT-РСТ было обнаружено, что в то время как мРНК 2G7 была экспрессирована в 1J, и все другие контрольные мыши полностью отсутствовали в мышечной 2J. Никакой сигнал не обнаруживали после 30 циклов амплификации. Этот эксперимент предоставил прямое доказательство того, что 2G7 соответствовало экзону из гена OB.2112

Поскольку мутация 2J является относительно последней и поддерживается в качестве соизогенного штамма, этот результат был первым доступным доказательством, которое указывает на то, что 2G7 представляет собой экзон из гена OB. Мутация, вероятно, находится в промоторной области, что приводит к полному прекращению синтеза мРНК. Присутствие сигнала у мыши U в этом эксперименте RT-PCR позволило предположить, что 1J может нести точечную мутацию, которая не приводит к грубому изменению размера образца РНК. Кроме того, мРНК 2G7 отсутствовала при тестировании с помощью ОТ-ПЦР, от четырех дополнительных 2J животных.

Этот результат подтверждали на нозерн-блоттинге (фиг. 12В). РНК жировых клеток получали из каждого из штаммов (C57b1/6J, 1J, CКC/smj и 2J). Десять мкг этих РНК выбивали и промокали. Блот исследовали с помощью зонда 2G7, который был меченым ПЦР, путем амплификации материала, те полосы, на фиг. 11 с использованием Р-dСТР в реакции ПЦР. Актин представляет собой контроль количества загружаемой РНК. Сигнал актина довольно похож во всех образцах. Сигнал OB отсутствует в головном мозге, поскольку мРНК является специфичной для жировых клеток.32

Результаты Северного анализа подтверждают, что специфическая РНК 2G7 отсутствует у мышей 2J. В CКC/smj ob/ob мышей отсутствует OB РНК, поскольку в этом мутантном с ожирением штамме ген разрушается таким образом, что РНК не образуется. Кроме того, уровень РНК 2G7 был увеличен в ~ 10-20 раз в 1J, а также db/db жир. Эти результаты совместимы с гипотезой, что OB либо кодирует циркулирующий гормон, либо отвечает за генерацию сигнала из жировых клеток, который модулирует массу тела. Эти результаты подтверждали вывод, что 2G7 является геном OB и прогнозировали, что 1J мыши имеют точечную мутацию, вероятно, нонсенс-мутация, приводящая к преждевременному прекращению трансляции.

Эти северные результаты были реплицированы с использованием препаратов РНК жировых клеток из четырех разных животных 2J (фиг. 13). В этом анализе ар2 представляет собой специфический для жира транскрипт, который использовали в качестве контроля, такого же, как актин на фиг. 12В. Значение плотности ар2-диапазона не имеет значения. Ар2 метили путем конструирования праймеров ПЦР, образующих опубликованную последовательность ар1. Затем проводили реакцию продуктов RT-PCR РНК жировых клеток с использованием того же протокола для мечения ПЦР. Этот анализ демонстрирует присутствие мРНК OB у нормальных гомозиготных или гетерозиготных животных и ее отсутствие у мутантных животных 2J.

Мутация была идентифицирована у 1J мышей. Мутация представляет собой изменение основания С по Т, которое приводит к изменению аргинина на очевидный преждевременный стоп-кодон у аминокислоты 108, и во всех правдоподобиях учитывает мутацию 1J (Фигура 14), несмотря на высокий уровень экспрессии мРНК об (см. Фиг. 12 и 13, C57BL/6J ob/ob дорожки).

Недавно использовали саузерн-блоты, чтобы сделать вывод, что мутация 2J является результатом детектируемого изменения ДНК на 5'- конце OB, которое, по-видимому,

полностью устраняет экспрессию РНК. Точная природа этой возможной реаранжировки остается определенной.

Проводят геномную саузерн-блоттинг ДНК из СКК/smj (SM/Ckc-+ Dac) и мышей C57BL/6J с использованием четырех различных эндонуклеаз рестрикции, чтобы определить, давал ли мутант об уникальному рисунку фрагментов (фиг. 15 А). Приблизительно 10 мкг ДНК (полученной из геномной ДНК, полученной из печени, почки или селезенки) расщепляли рестрикционным ферментом, указанным. Затем ДНК подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле ТВЕ. ДНК переносили на мембрану imobilon и гибридизовали с меченым ПЦР зондом 2G7. Ключевая полоса является самой верхней полосой в расщеплении BglII для ДНК СКК/smj ob/ob (SM/Ckc-+ DAC ob/ob). Эта полоса имеет более высокую молекулярную массу, чем в другом штамме, что указывает на мутацию в этом штамме.2121

Фигура 15В представляет собой саузерн-блоттинг расщепления геномной ДНК BGLII из потомства ob/+ x ob/+ креста. Некоторые ДНК имеют только верхнюю полосу, часть только нижней полосы, и некоторые имеют обе полосы. Животные только с верхней полосой являются алло-област, т. е. ob/ob. Эти данные показывают, что полиморфизм (те мутация), показанный на фиг. 15 А, сегрегирует в генетическом смысле.21212121

Пример 1: Клонирование кДНК и определение последовательности ОБ

С помощью меченого зонда для ПЦР 2G7 в общей сложности было выделено пятьдесят клонов кДНК мыши из библиотеки кДНК мышинного жира λ gt11 (кДНК Clonetech 5'-EXTENSION из тестикулярных жировых подушечек мышей Swiss, # M13005b) и тридцать перекрестных гибридизирующих клонов кДНК человека из библиотеки кДНК человеческого жира (Clonetech 5'-EXTENSION cDNA из брюшной полости # HL1108a). Скрининг библиотеки проводили с использованием процедуры подъема зубного налета. Фильтры от подъема зубного налета денатурировали с использованием автоклавного способа. Фильтры гибридизовали в двух повторностях с меченым ПЦР зондом 2G7 (Rapid Hybe buffer, 65° C, в течение ночи). После 2-4-часовой предварительной гибридизации фильтры промывали 2х SSC, 2% SDS, дважды в течение 30 минут при 65° C и подвергали воздействию рентгеновской пленки. Дублированные положительные результаты были очищены бляшками. Очищенный от бляшек фаг подвергали ПЦР-амплификации с использованием коммерчески доступных векторных праймеров, например, λ gt10 и λ gt11. Полученные продукты ПЦР соответствовали вставке кДНК для каждого фага с небольшим количеством векторной последовательности на каждом конце. Полосы очищали на геле и секвенировали с использованием автоматизированного секвенатора ABI и векторных праймеров для зондирования ДНК-полимеразы.

Необработанные данные секвенирования затем вручную исследовали основание с помощью основания для коррекции сдвига по компьютерной программе. Поскольку правильная последовательность стала доступной, нижерасположенные праймеры синтезировали и использовали для продолжения секвенирования. Такие эксперименты повторяли, пока каждый доступный кДНК клон секвенировали и синтезировали в контиг. На сегодняшний день было скомпилировано ~ 3000 пар оснований с 5'-конца мРНК. Один из клонов кДНК проходил до 5'-конца мРНК, так как его последовательность была идентична таковой продукта 5'-RACE РНК жировой ткани (данные не показаны).

Данные последовательности показали, что имеется 167-аминокислотная открытая рамка считывания (фиг. 1). Консенсусная последовательность инициации трансляции Kozak присутствовала с тремя основаниями остатка аденозина выше по потоку от ATG. Было обнаружено, что два класса кДНК различаются включением или исключением одного кодона глутамина. Этот остаток находится в положении непосредственно 3'к акцептору сплайсинга экзона 2G7. Поскольку САГ кодон глутамина включает возможную акцепторную последовательность AG сплайсинга, по-видимому, имеется проскальзывание на участке акцептора сплайсинга с очевидной делецией 3 пар оснований в подмножестве кДНК, как показано ниже.

Gln Ser Val

Ag CAG TCG GTA (с глутамином) (SEQ ID NO: 17)

†

(сайт акцептора сплайсинга)

оживальный вал

Ag CAG TCG GTA (без глутамина)

†

(сайт акцептора сплайсинга)

"ag" в последовательностях выше соответствует предполагаемой интронной последовательности выше по потоку от кодона глутамина, а AG представляет собой предполагаемый альтернативный сайт сплайсинга. Этот остаток глутамина находится в высоко консервативной области молекулы, и его важность для биологической активности является еще неизвестной.

Была обнаружена предполагаемая последовательность N-концевого сигнала, сайт расщепления сигнала которой прогнозируется как карбокси-терминал до остатка аланина в аминокислотном положении 21. Эта предполагаемая сигнальная последовательность была подтверждена путем применения компьютерного алгоритма к способу von Heijne. Используя эту методику, наиболее вероятную сигнальную последовательность идентифицировали в области кодирования полипептида, соответствующей аминокислотам 1 -23, имеющим последовательность:

MCWRPLCRFLWLWSYVQA † VP (SEQ ID NO: 10), в которой стрелка указывает предполагаемый сайт расщепления последовательности сигналов. Остальная часть аминокислотной последовательности была в значительной степени гидрофильной и не имела каких-либо заметных структурных мотивов или мембран, охватывающих домены, отличные от N-концевой сигнальной последовательности. В частности, мы не обнаружили консенсусные последовательности для N-связанных последовательностей гликозилирования или двухосновных аминокислот, указывающих на расщепление белка в прогнозируемом обработанном белке (Sabatini et al. The metabolic basis of inунаследованной disease, pp. 177 -223, CV Scribver et al. eds. , Mcgraw-Hill, New York). Поиск базы данных с использованием программ Blast и Block не выявил каких-либо гомологичных последовательностей.

РНК из жировой ткани человека анализировали на нозерн-блотах, детектировали виды РНК аналогичного размера по отношению к гену мыши. Секвенирование и анализ кДНК-клонов выявили, что человеческий ОВ также кодирует 167 аминокислотный полипептид (фиг. 2 А и В и фиг. 3). Два класса кДНК, с делециями трех пар оснований или без них, также были обнаружены у человека (Фигура 6). Гены ОВ мыши и человека были высоко гомологичными в прогнозируемой области кодирования, но имели только 30% гомологию в доступных 3'- и 5'-нетранслируемых областях. N-концевая сигнальная последовательность также присутствовала в человеческом полипептиде ОВ. Сравнение полипептидных последовательностей ОВ человека и мыши показало, что две молекулы совместно используют общую 83% идентичность на уровне аминокислоты (фиг. 4). N-концы зрелых белков из обоих видов имеют даже более высокую гомологию, только с шестью консервативными и тремя неконсервативными аминокислотными заменами среди N-концевых 100 аминокислотных остатков.

Геномную ДНК выделяли из мыши, крысы, кролика, волта, кошки, коровы, овец, свиньи, человека, курицы, ели и дрозофилы и рестрикции, расщепленной Ecor1. Перевариватели подвергали электрофорезу на 1% агарозном геле ТВЕ. Затем ДНК переносили на мембрану immobilon и зондировали с помощью зонда, меченного ПЦР, 2G7. Фильтр гибридизовали при 65° С и промывали 2х SSC, 0,2% SDS при 65° С дважды в течение двадцати минут каждой промывки, те было два изменения буфера. Эти данные указывают на то, что ОВ сохраняется среди позвоночных (фиг. 16). Следует отметить, что в eel ДНК имеется 2 + сигнал; eel-рыба.

Таким образом, доступные доказательства свидетельствуют о том, что масса тела и ожирение являются физиологически управляемыми. В течение семи лет попытки аго начали идентифицировать два из ключевых компонентов этой системы: гены OB и DB. Как показано в этом примере, ген OB теперь идентифицирован как специфический для жира ген, который играет ключевую роль в регуляции массы тела. Продукт этого гена, который наиболее вероятно является секретируемым гормоном, будет иметь важные последствия для диагностики и лечения питательных расстройств у человека и животных, отличных от человека.

Пример 2: Экспрессия OB в бактериях

Как мышинные, так и человеческие кДНК, кодирующие ob, были клонированы в вектор экспрессии pET-15 b (Novagen). Этот вектор содержит промотор T7 в сочетании с lac-оператором и экспрессирует слитый белок, содержащий гистициновую метку (His-tag) и сайт расщепления тромбина непосредственно перед сайтом введения кодирующей последовательности (Фигура 17) (SEQ ID NO: 11 и 12).

Мышинные и человеческие кДНК были модифицированы таким образом, что аланин в конце сигнальной последовательности был повернут в сайт NdeI, как и отдельная последовательность в 3'- области. Вставку сайта NdeI осуществляли с использованием ПЦР с новыми праймерами:

Mnde -5' (мышинный пять праймер прайм):

CTTATGTTCA TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC (SEQ ID NO: 13)

Mnde -3' (мышинный три праймер):

TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC (SEQ ID NO: 14)

Hnde -5' (человеческий пять праймер):

TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC (SEQ ID NO: 15)

Hnde -3' (человеческий три праймер):

TTCCCTCCCA TATGGTACTC CTTCGAGGAA GA (SEQ ID NO: 16) Праймеры содержат

рассогласование пар 6 пар в середине, которое вводит сайты рестрикции NdeI на каждом конце фрагмента ПЦР. Фаг, несущий кДНК мыши или человека, амплифицировали методом ПЦР с использованием этих праймеров. Продукт ПЦР расщепляли с помощью NdeI и геля, очищенного на 1% агарозном геле с низкой температурой плавления. Очищенные гелем полосы субклонировали в вектор pET. Полученные плазмиды секвенировали, чтобы гарантировать, что мутации не были введены во время стадии ПЦР-амплификации клонирования. Были получены конструкции для кДНК, которые кодируют человека и мыши и в которых отсутствует глутамин 49. В частности, конструкции pET 15b, содержащие кодирующую последовательность OB человека или мыши, минус сигнальную последовательность и слитые с His-меткой, были получены с использованием метода клонирования ПЦР. Конструкции секвенировали для обеспечения отсутствия ошибок последовательности в кодирующей области гена OB во время стадии амплификации ПЦР.

Две результирующие плазмидные конструкции pETM9 и pETH14 были выбраны для трансформации бактериального экспрессирующего хозяина. После индукции с 1 mM IPTG в оптимальных условиях трансформированные бактерии способны продуцировать 100-300 мкг/мл OB слияния. Большая часть OB слитого белка была обнаружена в теле включения. После солюбилизации с помощью 6M гуанидин-HCl или мочевины слитый белок очищали с помощью His-связывающей (Ni-хелатирующей) смоляной колонки. Условия очистки колонки гибридного белка OB (включая связывание, промывание и элюирование) были установлены экспериментально. OB слитый белок связывается со смолой при 5 mM имидазол/6M гуанидин-HCl и остается связанным с до 20 mM имидазолом/6M гуанидин-HCl. Белок можно элюировать из смолы при 60 mM имидазол/6M гуанидине (фиг. 18A, B). Как очищенный человеческий, так

и мышинный ОВ слитые белки дополнительно диализовали в PBS для удаления гуанидин-HCl из препарата, затем использовали для поднятия поликлональных антител.

Для того чтобы тестировать биологическую активность слитых белковых продуктов, были протестированы и разработаны условия рефолдинга для очищенного белка. Это включает первоначальный диализ слитого белка в 1 М растворе гуанидина с последующим разбавлением 0,4 М раствором аргинина. His-метку удаляли из слитых белков перед определением биологической функции. Удаление метки достигается путем обработки слитого белка тромбином из плаценты человека.

Кроме того, каждую из кодирующих последовательностей гена ОВ человека и мыши за вычетом сигнальной последовательности вводят в вектор pET 12c с использованием метода клонирования ПЦР. Эти констримеры могут направлять синтезированные слитые белки ОВ в периплазматическое пространство бактериальной клетки-хозяина. ОВ слитый белок, выделенный из периплазматического пространства, может требовать только простой гель-фильтрации, который должен быть очищен от других белков-хозяев и не будет денатурирован во время такого процесса.

Пример 3: Получение антител к полипептиду ОВ

В дополнение к применению рекомбинантного белка для получения поликлональных антител, набор из четырех пептидных последовательностей из выведенной последовательности ОВ мыши идентифицировали с использованием программного обеспечения на графике иммуногенности (GCG Package). Четыре фрагмента карбоксильного концевого пептида представляют собой:

(SEQ ID NO: 18:

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

(SEQ ID NO: 21:

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

Cys

Эти пептиды конъюгировали с KLH, и конъюгаты пептид-KLH использовали для иммунизации кроликов стандартными методами. Поликлональные антисыворотки, специфичные для каждого пептида, извлекают из кроликов.

EX AMPLEE 4: In vitro транслокация ОВ полипептида

Чтобы подтвердить присутствие функциональной сигнальной последовательности, кДНК человека, которая включала весь открытый считывающий кадр, субклонировали в PGEM-вектор. В этом эксперименте использовали только кДНК человека, поскольку подходящие субклоны мыши не были восстановлены. Положительную цепь человека об РНК транскрибировали с использованием полимеразы Spb и использовали в реакции трансляции *in vitro* с микросомальными мембранами поджелудочной железы собак и без него. Первичный продукт трансляции мигрировал с кажущейся молекулярной массой ~ 18 кДа, что согласуется с предсказанной последовательностью кДНК. Включение микросомальных мембран в реакцию ингибировало общую эффективность трансляции ~ 5 раз. Тем не менее, приблизительно 50 -

70% продукта первичного трансляции ОВ усекали приблизительно на 2 кДа в присутствии мембранного препарата, что позволяет предположить, что сигнальная последовательность является функциональной (фиг. 19А). Размер первичного продукта трансляции РНК интерлейкина-1 α , который не кодирует сигнальную последовательность, не изменился при включении в реакцию микросомальных мембран. Для подтверждения того, что транслокация белка ОВ имела место, продукты трансляции *in vitro* обрабатывали протеиназой-К Протеазой, что приводило к полному протеолизу продукта первичного трансляции 18 кДа, в то время как обработанная форма 16 кДа не подверглась воздействию ферментативной обработки, что указывает на то, что она была перенесена в просвет микросом (фиг. 19В). Эти данные совместимы с гипотезой, что ОВ является секретируемой молекулой.

После расщепления сигнальной последовательности два цистеиновых остатка будут оставаться в прогнозируемом белке, что повышает вероятность того, что молекула содержит дисульфидную связь, характерную для других секретируемых полипептидов [Shen et al. Science, 224: 168-171 (1984)].

Пример 5: Характеристика гена ОВ

Для установления соотношения между ожирением и генетическими изменениями в гене ОВ у человека определяли последовательность гена ОВ человека (фиг. 20А-С) (SEQ ID NO: 22 и 24). Специфические праймеры из кодирующей последовательности человека использовали для скрининга библиотеки Р1 человека. Были получены три различных клон Р1, выращенные, и ПЦР амплифицировали с использованием праймеров, фланкирующих сайт сплайсинга между первым и вторым кодирующими экзонами. Всю область интрона приблизительно в 2 тпн амплифицировали и частично секвенировали (см. фиг. 20А; и как указано в SEQ ID NO: 22 и 24).

Генная структура как мышинных, так и человеческих генов характеризовалась с помощью ПЦР-анализов и других стандартных методик. Было обнаружено, что ген ОВ мыши состоит из трех экзонов, второй и третий из которых учитывают кодирующую последовательность (фиг. 20D). Кодирующая область гена ОВ человека имеет такую же структуру; однако ген человека не содержит 5'экзона и интрона (фиг. 20Е).

Получали два набора праймеров, полученных из интронных последовательностей гена человека (фиг. 20А-С). Последовательности праймеров следует (F и R относятся к прямому и обратному, соответственно):

ВАРОЧНАЯ ПАНЕЛЬ 1 gF 5'- CCCAAGAAGCCATCCTG -3' (SEQ ID NO: 29)

ВАРОЧНАЯ ПАНЕЛЬ 1 gR 5'- GACTATCTGGGTCCAGTGCC -3' (SEQ ID NO: 30)

НОВ 2 gF 5'- CCACATGCTGAGCACTTGTT -3' (SEQ ID NO: 31)

НОВ 2 gR 5'- CTTCAATCCTGGAGATACCTGG -3' (SEQ ID NO: 32)

Образцы ДНК были получены из различных источников, и эти наборы праймеров используются для амплификации геномной ДНК человека от людей с тяжелым ожирением. Продукты ПЦР были гап на агарозном геле с низкой температурой плавления, и полосы вырезали и расщепляли агарозой. Последовательности получали с использованием секвенатора ДНК ABI 373A и набора Taq дидезокси-терминатора (ABI, Perkin-Elmer). На сегодняшний день была обнаружена одна точечная мутация в гене об из образца пациента. Эта мутация находится в первом экзоне и не изменяет аминокислотную последовательность. Предварительные данные указывают на то, что последовательность введения может присутствовать в первом экзоне другого пациента.

Для получения более легко считываемых последовательностей для обнаружения мутаций можно использовать другой автоматизированный способ секвенирования с использованием Sequenase вместо ДНК-полимеразы Taq.

Пример 6: Экспрессия ОВ в дрожжах

После клонирования положения ОВ стало важным открыть физиологический механизм, с помощью которого белок ОВ снижает потребление пищи и массу тела. Первый этап в этом направлении заключается в рекомбинантном получении функционального белка с использованием экспрессионной системы. В дополнение к успешной бактериальной экспрессионной системе также была выбрана дрожжевая экспрессионная система. Экспрессия дрожжей имеет несколько привлекательных признаков для экспрессии ОВ. Наиболее важным является то, что с большей вероятностью могут быть получены биологически активные эукариотические белки. Полипептид ОВ секретируется клетками млекопитающих. Секреция белка очень похожа на все эукариоты, что означает, что дрожжевой секреторный аппарат намного более похож на секреторный путь млекопитающих, чем бактериальные секреторные пути. В частности, модификации белка ОВ, наблюдаемые в клетках млекопитающих, вероятно, также наблюдались бы в экспрессии через дрожжевую секреторную систему. Кроме того, фолдинг белка проводят в пассаже через секреторный аппарат и, таким образом, доставка ов через дрожжевой секреторный аппарат, вероятно, дает правильно свернутый белок с нативной биологической активностью. Это является существенным для ОВ, поскольку два цистеиновых остатка могут образовывать дисульфидный мостик. В отличие от секреторных путей, восстановительная среда цитоплазмы клетки предотвращает образование дисульфидных мостиков; и, следовательно, важно, чтобы ОВ проходил через секреторный путь для образования *in vivo* этой дисульфидной связи. Другие преимущества заключаются в легкости и скорости манипулирования дрожжами, доступности векторов и штаммов и обширного опыта в дрожжевой рекомбинантной технологии.

Система экспрессии *Pichia pastoris* была выбрана по четырем причинам: (1) она имеет более высокие уровни экспрессии гетерологичного белка, чем другие дрожжевые системы, такие как *S. cerevisiae*; (2) гликозилирование белка более похоже на систему млекопитающих в Р.

pastoris, чем в *S. cerevisiae* (хотя сайты гликозилирования не были обнаружены на ов с использованием компьютерного поиска, все еще остается возможность гликозилирования в непризнанных сайтах); (3) *P. pastoris* секретирует очень мало белков изначально и, таким образом, обычно является простым для очистки экспрессируемого чужеродного белка; и (4) векторы и дрожжевые штаммы коммерчески доступны (от Invitrogen). Две стратегии генерирования векторов экспрессии дрожжей показаны на фиг. 21 и 22.

Выбранный вектор представлял собой рPIC. 9. Этот вектор содержит сайт клонирования непосредственно после кодирующей последовательности фактора α -сопряжения, которая направляет белок, кодируемый геном, клонированным в сайт клонирования, секретиремый секреторным путем. Другим важным признаком вектора является ген His4, который позволяет отбирать вектор с использованием ауксотрофного штамма дрожжей, выращенного на гистидин-дефицитных средах после трансформации дрожжей вектором. Стратегия клонирования была следующей: ПЦР амплифицировала кДНК ОВ с использованием 5'- праймера, который содержит на своем 3'- конце последовательность, комплементарную последовательности ОВ непосредственно после прогнозируемого сайта расщепления лидерного пептида, и на его самом 5'- конце последовательность, комплементарную 3'- концу последовательности α -сопряженного фактора вектора. 5'- праймер также содержит участок XhoI. 3'- праймер сконструирован таким образом, чтобы иметь на своем 3'- конце последовательность, комплементарную последним нескольким аминокислотам ОВ, и сайт EcoRI на своем 5'- конце. После ПЦР-амплификации продукт ПЦР расщепляли с помощью XhoI и EcoRI и клонировали в аналогичным образом

расщепленный рPIS9 после клонирования как мышей ОВ, так и человека ОВ, каждый с глутамином в кодоне 49 и без него, отдельные клоны выделяли для всех четырех конструкторов и секвенировали для проверки того, что констримеры были клонированы в правильной ориентации, и в рамку, и не содержали мутаций из стадии амплификации ПЦР. После идентификации клонов с правильной последовательностью их трансформировали в штамм *P.pastoris* Gs115, гистидин ауксотроф.

Для двух костров ОВ мыши трансформированные дрожжевые клоны подвергали скринингу на экспрессию белка. Как доказательство того, что трансформированные дрожжи содержат ОВ, анализ ДНК-точек и анализ гибридизации колоний, которые продемонстрировали последовательность ОВ в трансформированных дрожжах, но не в нетрансформированных дрожжах. Кроме того, трансформированные дрожжи в настоящее время секретируют белок 16 кДа в культуральную среду, тогда как нетрансформированные дрожжи не секретируют белок такого размера (Фиг. 23 А). Это прогнозируемый размер ОВ. Были выявлены отдельные клоны для обоих мышечных раковин, которые являются высокоэкспрессирующими для ОВ, и в настоящее время разрабатывается стратегия очистки для очистки об до гомогенности. Одна стратегия заключается в очистке ОВ на катионообменной колонке (фиг. 23В); предварительные данные свидетельствуют о том, что может быть полезным сильный катионообменник. Однако после катионообменной хроматографии предполагаемый об-продукт теряется. Это указывает на присутствие протеазы в образце.

Одной стратегией решения этой проблемы является получение слияний об-His-tag для экспрессии в дрожжах (Фигура 22). Дальнейшая оценка продемонстрировала, что ОВ без His-метки прочно ассоциируется с Ni-хелатирующей колонкой. Очистка полипептида ОВ с помощью Ni-хелатирования с последующей гель-фильтрацией давала продукт достаточной чистоты для масс-спектрального анализа. Mass spec, подтверждает молекулярную массу экспрессируемого белка, идентичную ожидаемой молекулярной массе, что сильно подтверждает, что ОВ успешно экспрессируется в *Pichia*.

Однако протокол очистки Ni-хелатирования/фильтрации геля не приводит к получению полипептида ОВ в достаточно чистой форме. Присутствуют дополнительные малые молекулы. По-видимому, протеолитическая активность элюируется из Ni-хелатной колонки в объеме пустот. Соответственно, планируется процесс трехстадийной очистки: Ni-хелатирование с последующим катионным обменом (который устраняет примеси мелких молекул) с последующей гель-фильтрацией.

Оценка уровня экспрессии с помощью окрашивания кумасси синим в SDS-PAGE гелях выявляет приблизительно 10 мг/л, когда дрожжи выращивают в шейкерных колбах. Ожидается, что эти уровни увеличиваются в ферментационных сосудах, и мы можем инициировать ферментацию с надеями получения больших количеств белка. Что касается Constrasts человека ОВ, были идентифицированы трансформированные клоны дрожжей, содержащие высокие числа копий гена ОВ, и ожидается, что они экспрессируют белок ОВ. В качестве антител, они будучи использованы для подтверждения идентичности секретируемого белка 16 кДа.

Пример 7: Высокая экспрессия слитого пептида Об в бактериях

Подготовка морозильных камер:

К каждой из двух аликвот по 4 мл стерилизованной среды M9ZB без источника углерода добавляли 40 мкл исходной декстрозы (0,4 г/мл, стерилизованный фильтром) 10мкл ампициллина (200 мг/мл и 5 мкл смеси хлорамфеникола (34 мг/мл, в этаноле). Для инокуляции этих клеток использовали одну колонию, каждая из *E. coli* с клонированной ДНК мыши и человека ОВ1 в векторе Novagen pET-14 b. Пробирки инкубировали при 37° С в течение ночи.

0,5 мл ночной культуры использовали для инокуляции 50 мл среды M9ZB декстрозой, ампициллином и хлорамфениколом. Их инкубировали при 30° С и периодически

контролировали поглощение при 600 нм (A600). При A600 приблизительно 1 -1,2 аликвоты 175 мкл культуры смешивали с 25 мкл 60% глицерина в 2 мл пробирок Эппендорфа, флэш-замораживали в жидком азоте и хранили при -80° С.

Рост культуры:

50 мл среды M9ZB с 0,5 мл 40% декстрозы, 125 мкл ампициллина и 50 мкл смеси хлорамфеникола инокулировали 1 мл морозильной смесью и инкубировали при 30° С при A₆₀₀ 1 -1,2, 10 мл этой культуры использовали для инокуляции каждой из четырех 2 л колб с 500 мл среды M9ZB с декстрозой, ампициллином и хлорамфениколом. Их инкубировали при 30° С до индукции при A600 приблизительно 1 -1,2 с конечной концентрацией 0,5 mM IPTG. Культуры инкубировали в течение ночи. Клетки собирали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 минут. Эта система экспрессии приводит к получению рекомбинантного полипептида ОВ в виде достаточно высокого процента общего белка; порядка грамм/литр E. coli.

Клеточный лизис и ресуспендирование телец включения:

Клеточную пасту ресуспендировали в минимальном объеме 20 mM HEPES, pH 7,2, 10% глицерина, 0,1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 1% аprotинина, 1 mM PMSF, 5 мкг/мл лейпептина и 50 мкг/мл Днказы I. Суспензию оттаивали три раза с использованием жидкого азота и луктеплой воды. Лизированные клетки центрифугировали при 18000 об/мин в течение 30 минут и ресуспендировали в 20 mM HEPES, pH 7,5, 0,1 M NaCl. Суспензию обрабатывали ультразвуком и добавляли Triton X100 до конечной концентрации 2%. Это центрифугировали в течение 15 минут при 18000 об/мин. После еще двух таких циклов давали три цикла отмывок без Triton. Наконец, осадок растворяли в 6 M Гднс1 (гуанидин-HCl), 20 mM HEPES, pH 7,5 с помощью обработки ультразвуком с последующим центрифугированием. Супернатант использовали для дальнейшей очистки.

Белок ОВ очищали в разложенном состоянии с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (IMAC). Раствор наносили на 40 мл колонку Pharmacia chelating fast flow sepharose, заряженную 5 объемами колонки 50 mM Niso₄ и уравновешенную 6 M GDHCl, 20 mM HEPES, pH 7,5. Колонку промывали 6 M GDHCl, 30 mM имидазолом, 20 mM HEPES, pH 7,5. Наконец, белок элюировали тем же буфером, содержащим 0,2 M имидазола. Развернутый белок в 6 M GDHCl хранили при 4° С после добавления ацетата натрия (Naac) до 10 mM и доведения pH до приблизительно 4,5 уксусной кислотой.

Рефолдинг и очистка белка:

6 M раствор GDHCl, содержащий 100 мг белка, обрабатывали 67 мкл 1 M дитиотреитола (DTT) и разбавляли до приблизительно 67 мл 6 M GDHCl, 10 mM Naac, pH 4,5. При комнатной температуре перемешивали в течение приблизительно часа. Затем его разбавляли в 4 л 20% глицерина, 2,5 mM CaCl₂, 20 mM Tris, pH 8,4 буфера при перемешивании. После надлежащего смешивания раствор оставляли при комнатной температуре в течение приблизительно 8 часов без дополнительного перемешивания. Затем добавляли 2000 единиц очищенного бычьего тромбина (из тромбоцистата, продукта Parke-Davis), и раствор оставляли при осторожном перемешивании. Через 2,5 часа повторно дозировали 2000 единиц тромбина и расщепление гистидиновой метки продолжали в течение 3 более часов. Расщепление тромбина останавливали добавлением PMSF до конечной концентрации 0,1 mM. Раствор фильтровали и хранили при 4° С.

Расщепленный белок дополнительно очищали на одной и той же колонке IMAC, как указано выше, уравновешенную в 1 M KCl, 20% глицерине, 20 mM HEPES, pH 8,4 буфера. После загрузки белкового раствора его промывали тем же буфером и расщепленный белок

элюировали 1 М KCl, 120% глицерином, 40 мМ имидазолом, 20 мМ HEPES, pH 8,4. Нелишенный белок элюировали при 0,2 М имидазоле.

Очищенный расщепленный белок концентрировали, обрабатывали 50-100 мМ EDTA, 10 мМ феррицианидом калия (для завершения любого неполного окисления) и гель фильтровали на колонке superdex 75 16/60. Выходы с использованием этой процедуры приближались к 50% исходного пептида.

После очистки экспрессируемый белок характеризуется несколькими способами. Физическая характеристика включает в себя динамическое светорассеяние для определения однородности структуры и используется в качестве меры правильного складывания. Данные светорассеяния указывают на то, что полипептид ОВ человека экспрессируется преимущественно или исключительно в качестве мономера, тогда как мышинный ОВ полипептид может быть найден как димер, а также мономер.

Анализы с реактивом Ellman и масс-спектроскопическим анализом подтверждают, что остатки цистеина образуют дисульфидную связь в белке. Эту окисленную форму полипептида вводили мышам, как описано ниже, и продемонстрировали биологическую активность.

Круговой дихроизм используется для грубого определения структурной геометрии белка. CD-спектры в физиологическом буфере (pH приблизительно 8, приблизительно физиологическая ионная прочность) указывают на то, что полипептид ОВ человека имеет приблизительно 60% α -спиральной структуры и приблизительно 40% случайной структуры катушки. Было обнаружено, что мышинный полипептид ОВ имеет приблизительно 50% α -спирали и 50% случайной катушки посредством CD-спектроскопии.

Для идентификации частей полипептида ОВ, доступных для протеолиза, применяли ограниченный протеолиз с последующей масс-спектрометрией (Cohen et al. 1995, выше). Этот анализ продемонстрировал присутствие гибкой петлевой структуры аминокислотных остатков 54-60 (как показано на фиг. 4). Вероятно, что эта гибкая петля соединяет два домена определенной структуры с 2°, например, α -спираль.

Важно отметить, что, как показано в следующих Примерах, биоактивность очищенного белка анализировали путем введения белка на грызуны как на бедную, так и на ожирение через осмотический насос (например, осмотический насос ALZET от Alza Coipor, Пало-Альто, СА) или путем ежедневной болюсной дозы ip в течение по меньшей мере двухнедельного периода и наблюдали влияние на поведение при кормлении и массу тела.

Пример 8: Снижение веса полипептида ОВ (Leptin)

Генный продукт локуса ОВ мыши играет важную роль в регуляции массы тела. Настоящий пример устанавливает, что белок ОВ циркулирует у мыши, крысы и плазмы человека. Циркулирующая форма во всех трех видах имеет идентичную молекулярную массу с помощью SDS-PAGE к выведенной полипептидной последовательности без сигнальной последовательности, что позволяет предположить, что *in vivo* белок не обрабатывается после расщепления сигнальной последовательности. Белок ОВ отсутствовал в плазме у мышей C57/B16J ob/ob и присутствовал в десятикратных более высоких концентрациях в плазме мышей db/db и в двадцать раз более высоких уровней в плазме крыс fa/fa относительно контролей. Предполагается, что эти мутанты животных с ожирением устойчивы к эффектам ОВ. Существовали семикратные различия в уровнях содержания белка ОВ в группе из шести людей, обедненных человеком. Ежедневные инъекции рекомбинантного белка ОВ мыши резко снижали массу тела у мышей ob/ob, оказывали значительное влияние на массу тела мышей дикого типа, но не оказывали влияния на мышей db/db. Эти данные свидетельствуют о том, что генный продукт локуса ОВ служит эндокринной функцией для регулирования массы тела.

Материалы и способы

Кролики иммунизировали рекомбинантным белком в адъюванте Фрейнда (HRP, Inc.). Иммунофицированные анти-мышинные ОБ антитела получали путем пропускания антисерина по сефарозе 4В, конъюгированной с рекомбинантным белком, как описано [Harlow et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)]. Иммунопреципитацию плазмы мыши проводили следующим образом: 0,5 мл плазмы от мыши, крысы и человека, содержащие приблизительно 2,5 мМ ЭДТА, предварительно осветляли неконъюгированной сефарозой -4 В при комнатной температуре с качанием в течение 2 часов. Сефарозу удаляли путем прядения и добавляли 50 мл 50% суспензии конъюгированной с антителом сефарозы, содержащей аффинно-очищенное антитело в концентрации 1 мг/мл упакованной сефарозы. Добавляли половину мл 2х RIP буфера для получения конечных условий связывания следующим образом: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 1% NP -40, 0,1% SDS, 0,5% дезоксихолата натрия и 0,025% азида натрия. Реакцию проводили в течение ночи при 4° С с качанием. Конъюгированную с антителом сефарозу промывали 8 раз с использованием буфера RIPA с последующим трехкратным промыванием PBS и проводили на 15% SDS-PAGE. Белки переносили на нитроцеллюлозу и Вестерн-блоттировали биотинилированным иммунофицированным антителом против рекомбинантного белка. В качестве вторичного антитела использовали HRP-стрептавидин, а ECL использовали для детекции.

Для количественного определения количества ОБ в серам мыши увеличивающиеся количества повторно сложенного рекомбинантного белка ОБ мыши (0,01, 0,1, 0,5, 2, 0,15, 0 нг) добавляли к 100 λ C57BL/6J ob/ob плазмы и инкубировали при 4° С в течение 3 часов с белком А сефарозой, конъюгированным с антителом. После обширной промывки буфером А (10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,4; 100 мМ NaCl; 1% Triton X -100, 5 мМ EDTA, 1 мМ PMSF), образцы ресуспендировали в буфере образцов, загружали на 15% SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Вестерн-блоттинг проводили с использованием иммунофицированного биотинилированного анти-амино-концевого антитела в качестве первичного антитела и HRP-стрептавида в качестве вторичного антитела с последующим детектированием ECL.

Цитоплазматические экстракты получали путем гомогенизации жировой ткани в буфере NDS (10 мМ Tris, pH 7,5, 10 мМ NaCl, 60 мМ ICCI, 0,15 мМ спермина, 0,5 мМ спермидина, 14 мМ β-меркаптоэтанол, 0,5 мМ EGTA, 2 мМ EDTA, 0,5% NP -40) с помощью гомогенизации политрона и унции, а удаление ядер осуществляли путем центрифугирования при 700 г.

Иммунопреципитации проводили, как описано выше, за исключением того, что были использованы иммунопатогенные антитела к ОБ человека. Для ELISA 100 мл 1 мг/мл раствора иммунофицированного антитела к ОБ человека растворяли в боратном буферном растворе PBS и наносили на ночь на планшеты для микротитрования (Corning cat. # 2595) при 4° С. Затем планшеты промывали 4 раза боратным солевым раствором, содержащим 0,05% Tween 20, и удаляли избыточную жидкость. Планшеты блокировали инкубацией при комнатной температуре в течение 2 часов с 240 мл на лунку боратного солевого буфера, содержащего 0,3% желатина, а затем промывали и сушили. Либо известные количества повторно сложенных образцов белка ОБ человека, либо образцов плазмы в объеме 100 мл инкубировали в отдельных лунках в течение ночи при 4° С. После промывания планшеты инкубировали с 100 мл биотинилированного иммунофицированного антитела против человека (0,1 мг/мл в желатиноборатном буферном растворе) в течение 4 часов при комнатной температуре. После промывки к планшетам добавляли пероксидазу хрена (HRP)-стрептавидин (0,1 мг/мл в боратном буфере, 0,3% желатина). Затем использовали раствор субстрата HRP (ABTS, 0,3 мг/мл и H₂O₂, 0,01% в лимонной кислоте) и измеряли оптическую плотность при 414 нМ для количественного определения связывания антитела.

Последовательности, кодирующие ген ОВ мыши и человека, амплифицировали ПЦР из плазмид, содержащих последовательности кДНК ОВ, и субклонировали в плазмиду pPIC.9 (Invitrogen). Использовали праймер человека 5'

5'GTATCTCTCGAGAAAAGAGTGCCCATCCAAAAAGTCCAAG 3'

(SEQ ID NO: 34)

а 3'- праймер

5'GCGCGAATTCTCAGCACCAGGGGCTGAGGTC 3' (SEQ ID NO: 35).

Для мыши 5'- праймер представлял собой

5'GTATCTCTCTCGAGAAAAGAGTGCCTATCCAGAAAGTCCAGG 3'

(SEQ ID NO: 36)

а 3'- праймер

5'GCGCGAATTCTCAGCATTCAGGCTAACATC 3' (SEQ ID NO: 37).

5'- праймер как для мыши, так и для человека содержит участок XhoI на 5'- конце и кодирующие последовательности для последних 4 аминокислот сигнальной последовательности фактора α -сопряжения, присутствующей в векторе pPIC. 9. Этот вектор направляет секрецию гетерологично экспрессируемых генов из клетки в культуральную среду. Праймер 5'ПЦР также включает первые 19 нуклеотидов открытой рамки считывания гена ОВ после сайта расщепления сигнальной последовательности до аланина в положении аминокислоты 21. 3'- праймер содержит участок EcoRI на своем 5'- конце, за которым непосредственно следуют последовательности, комплементарные предполагаемому стоп-кодону ОВ. Условия ПЦР были следующими: денатурация в течение 1 мин при 94° С, отжиг в течение 1 мин при 55° С и удлинение в течение 2,5 мин при 72° С. ПЦР с низким циклом (15 циклов) и полимеразу OFU, получающую подтверждение (Stratagene), использовали для ограничения количества генерированных ПЦР мутаций. Продукты ПЦР расщепляли XhoI и EcoRI и клонировали в аналогично расщепленный вектор pPIC9, секвенировали все констримеры на обеих нитях, чтобы гарантировать отсутствие каких-либо генерированных ПЦР мутаций. Клоны трансформировали в *Pichia pastoris* (His) методом сферопластов и выбирали на гистиридиновых дефицитных средах. Приблизительно 200 мышинных и человеческих клонов подвергали скринингу на интеграцию с высоким числом копий посредством анализа гибридизации колоний. Затем клоны с высоким числом копий анализировали на экспрессию ОВ, первоначально окрашиванием Кумасси, показывающим присутствие нового белка 16 кДа, присутствующего в культуральной среде трансформированных дрожжей. Было подтверждено, что полоса 16 кДа представляет собой ОВ с использованием антител к бактериально экспрессированному белку ОВ. Рекомбинантные белки очищали с помощью двухстадийного способа очистки, описанного ниже. Масс-спектрометрию и обработку бромидом цианогена проводили, как описано в работе Beavis et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6873-6877 (1990).

Всю кодирующую последовательность ОВ мышинных и человеческих ОВ генов С-конца к сигнальной последовательности субклонировали в экспрессионный вектор pET15b (Novagen) и сверхэкспрессировали в *Escherichia coli* [B121 (DE3) plysS] с использованием системы РНК-полимеразы T7 [Studier et al. Meth. Enzymology, 185: 80-89 (1990)]. Клетки, выращенные при 30° С до абсорбирующей способности 0,7 при 595 нМ и индуцированные 0,5 мМ изопропил- β -D-тиогакто-пиранозидом в течение ночи, собирали путем низкоскоростного центрифугирования. Лизис осуществляли с помощью трех циклов замораживания замораживания и расщепления ДНК с использованием DnaseI. Мембранную экстракцию проводили путем обработки ультразвуком и солиubilизации детергента, и конечный осадок на теле включения растворяли в 6М гуанидине-HCl, 20 мМ HEPES, pH8. 4. Рекомбинантные белки ОВ очищали в денатурирующих условиях IMAC с использованием Ni-ионной аффинной колонки и промывали возрастающими количествами имидазола. Очищенный денатурированный ОВ белок затем хранили в 6 М гуанидине-HCl, 10 мМ ацетата натрия (Naac), pH 5 и восстанавливали с использованием 1 мМ DTT при комнатной температуре в течение 1

часа. Денатурацию проводили путем разбавления восстановленного белка до 20% глицерина, 5 mM CaCl₂, 5 mM NaAc, pH 5, путем перемешивания и инкубации при комнатной температуре в течение 8-12 часов. После денатурации pH доводили до 8,4 добавлением Трис до 10 mM, и гекса-гистидиновую метку удаляли путем расщепления тромбина. Расщепленный ренатурированный белок повторно очищали с помощью IMAC для отделения продукта от тромбина и неликованного слитого белка. Расщепленный ренатурированный белок элюируется из аффинной Ni-ионной аффинной колонны при 40 mM имидазола, тогда как тромбин не сохраняется, и неликованный слитый белок элюируется при 0,2 mM имидазола. Затем продукт концентрировали, обрабатывали 100 mM EDTA и 10 mM феррицианидом калия и дополнительно очищали с помощью гель-фильтрации с использованием колонки Pharmacia superdex 75 16/60.

Анализ Ellman проводили, как описано в Ellman, Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77 (1959). Реагент Ellman получали растворением 39,6 мг 5,5'- дитио-бис (2-нитробензойной кислоты) (DTNB) в 10 мл 0,05 M фосфата, pH 8. Калибровочную кривую строили в диапазоне концентраций 10-120 mM свободного сульфгидрила (с использованием 1 mM исходного раствора восстановленного DTT) при 412 нм. Каждый анализ проводили с использованием 0,02 мл реагента Ellman и общей реакционной смеси 0,5 мл. Измеренный коэффициент экстинкции составлял 12974 M⁻¹ см⁻¹ для свободной сульфгидрильной группы (коэффициент корреляции 0,99987), который находится в пределах 5% от ранее сообщенного значения 13600 M⁻¹ см⁻¹.

Пятьдесят мл фильтрованного по 2 мг/мл белка чистого геля, соответствующего возможной свободной сульфгидрильной концентрации приблизительно 24 mM в конечной реакционной смеси, подвергали анализу Ellman. Полученный раствор давал A412 примерно 0,02, что позволяет предположить, что два остатка цистеина в белке находятся в окисленном состоянии, образуя цистин, или что их свободные сульфгидрильные группы полностью утоплены в недоступном ядре сложенного белка. Идентичные результаты были получены путем проведения такого же анализа на развернутый белок в присутствии 6 M гуанидин-HCl.

Мышей индивидуально подвергали старению в среде, не содержащей патогенов, и акклиматизировали в рацион, содержащий 35% (масс./масс.) лабораторного диетического корма 5001 грызуна (PMP Feed, Inc.), 5,9% (масс./масс.) смеси для пудинга тапиоки (General Foods) и 59. 1% воды, которая имеет энергосодержание 1,30 ккал/г. Диету стерилизовали в автоклаве и упаковывали в пластиковую посуду размером 60 мм, которую фиксируют к вершинам 100 мм чашек Петри. Тапиока дает рацион пастообразной текстуры, что затрудняет распределение корма животным в клетке. 100 мм крышка восстанавливает небольшое количество пищи, разлитой животным. Свежую чашку пищевого продукта помещали в клетку каждый утроем и чашку предыдущего дня удаляли и взвешивали. Разница в весе обеспечивала меру суточного потребления пищи. Влияние рекомбинантного белка на потребление пищи и массу тела измеряли у трех штаммов мышей: C57b1/6J ob/ob, C57 B1/Ks db/db и CBA/J +/+, приобретенных у Jackson Laboratory. Тридцать мышей из каждого штамма разделяли на группы из 10. Одна группа из каждого штамма приняла ежедневные внутрибрюшинные (ip) инъекции повторно свернутого бактериального белка ob в дозе 5 мг/г/день в 300 мкл PBS. Вторую группу получали инъекции в один и тот же объем PBS. Эти контрольные мыши получали инъекции PBS диализата рекомбинантного белка. PBS очищали от эндотоксина с использованием колонки Acticlean ETOX. Третья группа животных не получала инъекции. Потребление пищи регистрировали ежедневно, и измерения массы тела регистрировали регулярно в течение 3,5-недельного интервала. Для эксперимента с парным питанием потребление пищи отдельной группы мышей ob соответствовало ежедневному базису на потребление белка, потребляемого мышами, получающими белок.

Результаты

Th e OB Белок циркулирует у мыши, крысы и человека.

Рекомбинантную мышь и белок OB человека получали с использованием бактериального вектора экспрессии pET 15b (Novagen) и клонирования в *Pichia pastoris*, дрожжевой

экспрессионной системы, которая секретирует рекомбинантные белки непосредственно в культуральную среду. Белок ob, экспрессируемый в дрожжах, включает 146 аминокислот карбокси-терминала в сигнальную последовательность. Кролики иммунизировали бактериальными белками (HRP, Inc.). Антитела были иммунокормурованы (Research Genetics) и использовались для иммунопреципитации и вестерн-блотов белка из плазмы и жировой ткани.

Белок OB из плазмы мыши мигрирует с кажущейся молекулярной массой 16 кДа с помощью SDS-PAGE. Электрофоретическая подвижность идентична рекомбинантному белку OB, секретируемому дрожжами после удаления сигнальной последовательности (фигура 24A), белок не был обнаружен в плазме у мышей C57BL/6J ob/ob, которые имеют нонсенс-мутацию в кодоне 105. Несколько различных антисывороток не смогли идентифицировать укороченную цепь остатка полипептида 105, прогнозируемую последовательностью кДНК.

Десятикратное увеличение уровня циркулирующего белка наблюдали у мышей db/db относительно контрольного животного (Фигура 24 A). Иммунопреципитация плазмы крысами дикого типа и fa/fa выявила двадцатикратное увеличение уровня белка OB у мутантной крысы по сравнению с диким типом (фиг. 24B). Мутация db приводит к фенотипу с ожирением, идентичным фенотипу, наблюдаемому у мышей ob (Bahary et al. 1990, выше), жирные крысы ожидают в результате рецессивной мутации в гене, гомологичном db (Truett et al. 1991, выше). Для количественного определения уровня OB в плазме мышей увеличивали количества рекомбинантного белка в сыворотке и иммунопреципитировали (фигура 24C). Линейное увеличение интенсивности сигнала на вестерн-блотах наблюдалось с увеличением количества рекомбинантного белка. Сравнение интенсивности сигнала нативного белка в плазме мыши со стандартами показало, что уровень циркулирующего белка OB у мышей дикого типа составляет приблизительно 20 нг/мл. Эти данные демонстрируют, что иммуноосадки и вестерн-блоты проводили в условиях избытка антитела. Повышенные уровни белка OB также наблюдались в белковых экстрактах жировой ткани мышей db/db относительно контролей (фиг. 24D). Как ожидалось для секретируемого белка, белок из жировой ткани, фракционированный с фракцией сырой мембраны (данные не показаны).

Образцы плазмы из шести человек-людей с индексом массы тела менее 25 (ИМТ = масса/длина) были иммунопреципитированы с использованием иммунофицированных антител к белку человека. Иммунопреципитированный материал мигрировал с электрофоретической подвижностью, идентичной той, что видна для белка 146 аминокислот человека, экспрессированного в дрожжах. Интенсивность сигналов значительно изменялась среди шести образцов (фиг. 25 A). Денситометрия автоматической рентгенографии выявила приблизительно пятикратную разницу уровней у индивидуумов HP1 и HP6, с промежуточными уровнями у других субъектов. Иммуноферментный анализ (ELISA) был разработан с использованием иммунофицированного антитела и повторно свернутого бактериального белка в качестве стандарта (см. ниже). Полученная стандартная кривая показана на фиг. 25B. Используя этот анализ, уровни белка OB в шести образцах плазмы человека варьировали между 2-15 нг/мл (фиг. 25C). Уровень белка OB в плазме от HP6 был за пределами линейного диапазона иммуноанализа и составлял ≥ 15 нг/мл. Эти количественные различия коррелировали с теми, которые наблюдались на вестерн-блотах.²

Предварительные данные позволяют предположить, что лептин может циркулировать по меньшей мере частично в комплексе с другим белком или белками. Этот вывод был основан на гетерогенности формы кривой титрования для серам по сравнению с рекомбинантным стандартом. Анализ большого количества лептина, иммунокормулированного на колонке "анти-OB" кролика с помощью гель-фильтрационной ВЭЖХ в денатурирующих и неденатурирующих условиях, с контролем с помощью ELISA и SDS-PAGE, позволило предположить, что полипептид OB ведет себя подобно высокомолекулярному комплексу. Однако эти данные остаются предварительными; связывающий белок OB, если он есть, еще должен быть охарактеризован.

Структурные характеристики белка OB.

Поскольку белок ОВ имеет два остатка цистеина, он может образовывать либо интра-, либо межмолекулярные дисульфидные связи в окислительных условиях *in vivo*. Вестерн-блоты повторяли с добавлением восстанавливающих агентов и без добавления восстанавливающих агентов в буфер образца. При обоих условиях белок ОВ в серам человека мигрировал в качестве мономера (данные не показаны). В невосстанавливающих условиях белок, иммунопреципитированный из сыворотки крови db, детектировали в положениях, соответствующих положению как мономера 16 кДа, так и димера приблизительно 32 кДа (фиг. 26А). Фрагмент с более высокой молекулярной массой исчезает в восстановительных условиях, что позволяет предположить, что фракция "ОВ" мыши циркулирует в качестве частиц с более высокой молекулярной массой посредством образования межмолекулярной дисульфидной связи. Приблизительно 80% ОВ мыши циркулирует как белок приблизительно 16 кДа и 20% в виде приблизительно 32 кДа.

Те же молекулярные формы наблюдаются, когда мыши и человеческие белки экспрессируются в *Pichia pastoris* [Abraams et al. *Immunol Rev.* : 5-24(1992)]. В этих исследованиях последовательность ДНК, соответствующая 146 аминокислотному зрелому белку ОВ, была клонирована ниже по потоку от сигнальной последовательности фактора α -сопряжения дрожжей в векторе pPIC.9 (Invitrogen). Белок ОВ очищали из дрожжевых сред штаммов, экспрессирующих белки мыши и человека, и подвергали электрофорезу в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (фигура 26А). Мышинный белок экспрессировали в дрожжах преимущественно в виде димера в невосстанавливающих условиях и только в качестве мономера в присутствии восстанавливающих агентов. Рекомбинантный человеческий белок мигрировал в положение мономера в обоих условиях (данные не показаны).

Очищенный человеческий белок, экспрессируемый в *Pichia*, имел молекулярную массу $16,024 \pm 3$ Да, как определено с помощью масс-спектрометрии 1990 (Beavis, 1990, выше). Это значение согласуется с массой, вычисленной из аминокислотной последовательности белка, содержащей один внутримолекулярный дисульфидный мостик (16024 Да). Масс-спектрометрический анализ продуктов расщепления цианбромида белка с помощью матрицы указывает на то, что цистеины 117 и 167 связаны через внутримолекулярную дисульфидную связь (Фигура 26В) Цианоген бромид расщепляет карбоксиконца на остатки метионина.

Получение и характеристика биоактивного рекомбинантного белка.

Белок ОВ мыши экспрессировали в *E.coli* из плазмиды pET 15b в качестве нерастворимого слитого белка, с 20 остатком, N-концевой гекса-гистиридиновой меткой, содержащей сайт расщепления тромбина. Бактериальные тельца включения солибилизировали с использованием гуанидин-HCl и очищали в денатурирующих условиях с использованием аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (IMAC) (фигура 27). Очищенный денатурированный слитый белок восстанавливали, разбавляли и позволяли повторно складываться в водном растворе при комнатной температуре. После расщепления тромбина ренатурированный белок ОВ мыши, содержащий четыре дополнительных N-концевых остатка (Gly-Ser-His-Met; SEQ ID NO: 38), повторно очищали с помощью IMAC до > 98% гомогенности, по результатам SDS-PAGE и масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбционной масс-спектрометрией давала измеренную массу 16414 ± 3 Да (прогнозируемая масса = 16415 Да). Как восстанавливающие, так и невосстанавливающие SDS-PAGE гели продемонстрировали единичные молекулярные соединения с кажущейся и молекулярной массой 16 кДа (данные не показаны).

Динамическое рассеяние света с использованием детектора молекулярного размера Dp801 (Protein Solutions, Inc.) продемонстрировало, что ренатурированный белок ОВ мыши в значительной степени мономерный, с некоторыми агрегатами более высокого порядка. Белок обрабатывали EDTA и химически окисл. Затем частицы с более высокой молекулярной массой удаляли путем гель-фильтрации. Дальнейшее динамическое рассеяние света подтвердило, что очищенный ренатурированный рекомбинантный белок ОВ мыши был

монодисперсным. После диализа против фосфатно-солевого буфера (PBS) бактериальный эндотоксин удаляли с использованием колонки Acticase ETOX (Sterogene Bioseparations, Inc.). Конечный выход белка составил 45 мг/л.

Анализ Ellman проводили на очищенном ренатурированном рекомбинантном белке ОВ мыши для оценки его состояния окисления (Ellman, 1959, выше). Как ренатурированный белок, так и белок, развернутый с помощью 6М гуанидин-НСl, продемонстрировали < 0,5% свободного сульфгидрильного содержимого, демонстрируя, что мономерный продукт содержит внутримолекулярную дисульфидную связь. Это было подтверждено с помощью масс-спектрометрии продуктов расщепления цианбромида рескладчатого бактериального белка (данные не показаны).

Биоактивность белка ОВ. Очищенный ренатурированный рекомбинантный белок ОВ мыши вводили в виде ежедневной внутрибрюшинной инъекции 5 мг/кг/день в группы из 10 C57b1/6J ob/ob (возраст, 16 недель), C57b1/Ks db/db (возраст, 12 недель) и мышей CBA/J +/- (возраст, 8 недель). Равное количество животных приняло PBS в качестве ежедневного введения. PBS, используемый для контрольных инъекций, получали из диализата после уравнивания белка. Десять дополнительных животных из трех штаммов мыши не получали инъекции. Потребление пищи у отдельных животных контролировали ежедневно, и веса животных регистрировали через три или четыре дня. Кумулятивные результаты для приема пищи и массы тела из каждой из 9 групп мышей показаны на фиг. 28 А-Е, и статистическая значимость данных показана в Таблице 1. Прием пищи у мышей C57B16J ob/ob, инъецированных белком, был значительно уменьшен после первой инъекции и продолжался до снижения до пятого дня, когда оно стабилизировалось на уровне, равном приблизительно 40% от приема животных, получающих инъекции PBS ($p < .001$). Мышам "ОВ", введенным швамом, не теряли массу в течение трехнедельного периода исследования. Мышей C57b1/6J ob/ob, получавших белок, теряли приблизительно 10% своей массы тела через 5 дней ($p < .001$). Эти животные продолжали терять вес в течение трех недель лечения, и в этот момент вес у животных, получающих белок, снизился до среднего значения 60% от их первоначальной массы тела ($p < .0001$). Отдельную группу мышей ob скормливали мышам, получающим белок. Данные на фиг. 29В показывают, что парные мыши теряли значительно меньшую массу, чем животные, принимающие рекомбинантный белок ($p < .02$). Фотография двух мышей, получающих инъекции либо белка, либо транспортного средства, показывает грубую разницу во внешнем виде, возникающую в результате обработки белка (фиг. 29В). Для того чтобы дополнительно выяснить влияние белка, проводили аутопсис двух мышей в каждой из групп. Грубое обследование у мышей-об, получающих белок, выявило резкое снижение жира в организме, а также размер печени. Массы печени мышей db и дикого типа не менялись при лечении. Ливеры у мышей ob, получавших инъекции PBS, взвешивали 5,04 и 5,02 грамма по сравнению с 2,23 и 2,03 грамма у животных, получавших рекомбинантный белок. В отличие от бледно-жировой характеристики печени у мышей ob мышей, получавших белок, приобретал более темную цветовую характеристику нормальной печени (Фигура 29С). Гистологические срезы печени показали, что у необработанных животных была жировая печень, которая была заметно улучшена у животных, обработанных белком (данные не показаны).

В отличие от мышей ob не было существенных различий в массе тела или приеме пищи у мышей C57BL/Ks db/db, получающих белок по отношению к принимающему контрольную группу транспортному средству (фиг. 28А-Е, таблица 1). Все три группы мышей db/db теряли между 2-5 граммами в течение периода лечения. Среднее содержание глюкозы в крови мышей db измеряли с помощью глюкометра, и у всех мышей было ≥ 500 мг/дл, что указывает на то, что у этих животных был разработан диабет, являющийся вторичным по отношению к ожирению. Инъекции мышей db прекращали через две недели.

У мышей дикого типа было небольшое, но значительное снижение массы тела после введения рекомбинантного белка ob (фигура 28А-Е, таблица 1). Через пять дней инъекции белка обработанные мыши потеряли в среднем 0,5 грамма, в то время как контрольные мыши

получали 0,4 грамма ($p < .02$). В два последующих момента времени животные получали белок, взвешенный значительно меньше, чем у мышей, получающих ежедневные инъекции PBS. Значимость изменения веса уменьшалась в более поздние моменты времени. У животных, которые потеряли вес, потребление пищи незначительно отличалось от контрольных животных. Инъекции PBS имели небольшое, но значительное влияние на потребление пищи и массу тела у мышей ob, db и дикого типа по сравнению с мышами, не получающими инъекции ($p < .05$).

Таблица 1

Animal Group	Treatment Group	WEIGHT CHANGE				
		Days	n	Mean	Std. Error	p
ob/ob	protein	1-5	10	-6.38000000	0.47628190	<0.001
			9	-0.14444444	0.24444444	
	vehicle	1-12	10	-14.45000000	0.70793126	<0.001
			9	0.98888889	0.38058597	
	protein	1-27	6	-24.28333333	0.69924563	<0.0001
			5	4.30000000	0.79874902	
db/db	protein	1-5	10	-1.47000000	0.36939891	0.240
			10	-2.00000000	0.23142073	
	vehicle	1-12	10	-3.75000000	0.77348418	0.610
			10	-4.19000000	0.34655447	
CBA/J	protein	1-5	10	-0.48000000	0.17876117	0.006
			10	0.38000000	0.21489015	
	vehicle	1-12	10	-0.12000000	0.45748103	0.015
			10	1.20000000	0.18378732	
	protein	1-27	5	1.98000000	0.48723711	<0.651
			6	2.23333333	0.20763215	

Обсуждение

Эндокринная функция для белкового продукта локуса ОВ была впервые предложена Coleman, который показал, что вес тела мышей ob/ob был уменьшен после парабактериального союза до нормальных или db мышей (Coleman et al. 1978, см. выше). Результаты, указанные выше, поддерживают эту гипотезу, показывая, что белок ОВ циркулирует в кровотоке, и что инъекции рекомбинантного белка уменьшают массу тела. Молекулярная масса генного продукта, кодируемого геном ОВ, составляет приблизительно 16 кДа, что равно 146 аминокислотной последовательности Caisboxy-терминалу в сигнальную последовательность. Рекомбинантный белок ОВ не модифицирован при экспрессии в *Pichia pastoris*. Экспрессия генов млекопитающих в *Pichia*, как правило, приводит к образованию правильной белковой структуры [Cregg et al. Bio/Technology, 11: 905-914 (1993)]. Эти результаты позволяют предположить, что белок ОВ не гликозилирован и не подвергается посттрансляционной обработке in vivo. Данные не исключают возможности того, что белок ОВ нековалентно связан с самим собой или другими белками в плазме или жировой ткани. Хотя протеолитическое расщепление белка не исключено, низкомолекулярные формы белка ОВ не были обнаружены ни одной из используемых антисывороток, включая четыре антипептидных антитела.

Белок ОВ имеет два остатка цистеина и циркулирует в качестве мономера у человека и в качестве мономера и димера у мыши. Внутримолекулярная дисульфидная связь, характерная для секретируемых молекул, обнаруживается, когда человеческий белок экспрессируется в *Pichia pastoris*, что позволяет предположить, что он, вероятно, будет присутствовать in vivo. Это поддерживается за счет биоактивности рекомбинантного бактериального белка, который имеет внутримолекулярную дисульфидную связь. Белок ОВ мыши можно найти в плазме в качестве мономера и в виде димера. Мономер и димер наблюдаются, когда белок ОВ мыши

экспрессируется в дрожжах, показывая, что склонность белка мыши к образованию димера является результатом различий в первичной последовательности относительно человека. Хотя ясно, что мономер обладает биологической активностью, функциональная активность димера неизвестна.

Влияние белка ОВ на потребление пищи и массу тела у мышей об является резким. После трех недель лечения мышам-об, получающим ежедневные инъекции рекомбинантного белка, потеряли 40% от их веса и потребляли 40% как много пищи в качестве контрольных животных. Кроме того, вес обработанных об мышей еще не уравнивался в момент прекращения эксперимента. Результаты эксперимента по подпитке пары указывают на потерю массы в результате воздействия как на потребление пищи, так и на расход энергии. Таким образом, отдельная группа мышей об, калорийность которых была ограничена от приема белка у мышей, получавших белок, теряла значительно меньший вес, чем у животных, получающих белок. Снижение потребления пищи у мышей об/об до уровня ниже, чем у мышей дикого типа, в течение дня приема белка ОВ, указывает на то, что они особенно чувствительны к его эффектам. Действительно, у этих животных можно умыть рецептор ОВ. Потребление пищи у обработанных мышей об стало относительно постоянным после пяти дней лечения. Если это является результатом того, что белок достиг установившихся уровней, то предполагается, что белок имеет относительно длительный период полужизни [The Pharmacological Basis of Therapeutics, pp. 19 -45, Goodman and Gilman, eds. , Pergamon Press, New York, (1990)]. Этот вывод согласуется с данными экспериментов парабиоза [Coleman et al, 1978, supra; Weigle, Int. J Ожирение, 12: 567-578 (1988)].

Эффекты рекомбинантного белка на массу тела мышей дикого типа были небольшими, но статистически значимыми в течение первых двух недель исследования. В то время как разница в весе между мышами дикого типа, получающими белок в сравнении с PBS, поддерживалась в более поздние моменты времени, статистическая значимость данных значительно уменьшилась через три недели. Ранние потери веса не могут быть учтены за счет разницы в приеме пищи. Предположительно, измерение потребления пищи было недостаточно точным для обнаружения уменьшения, приводящего к разнице в один грамм в массе тела во время лечения. Эти наблюдения отличаются от результатов предыдущих экспериментов, в которых грызуны дикого типа были соединены парабиотическими союзами с мышами db, крысами fa, крысами с гипоталамическими поражениями и крысами, приобретенными ожирением с помощью диеты высокой калорийности [Coleman et al. 1978, выше; Harris et al, 1987, выше; Harris et al. "Физиологические и метаболические изменения в парабиотических партнерах крыс с ожирением", в гормонах, термогенезе и ожирении, Lardy и Straatman, eds. , Elsevier Science Publishing Co. New York (1989); Hervey, J physiol, 145: 336-352 (1959)]. В каждом случае животные дикого типа становятся анорексическими и теряют поровые количества веса. Поскольку уровни белка ОВ повышаются у мышей db и крыс fa, и уровень РНК ОВ увеличивается у мышей с гипоталамическими поражениями, вероятно, что мыши дикого типа могут реагировать на ОВ, когда он циркулирует в плазме на достаточно высоком уровне. Полученные данные соответствуют возможности того, что уровни вводимого белка были ниже эндогенных уровней, что приводит к уравниванию при немного более низкой массе тела. Количественное определение циркулирующих уровней белка ОВ у обработанных мышей разрешает эту проблему. Хотя иммуноанализ белка мыши еще не доступен, предположили, что уровни циркулирующего белка ОВ не были существенно повышены у мышей дикого типа, получающих белок.

Меньший эффект белка на мышах дикого типа и отсутствие ответа у мышей db делает маловероятным, что лечение имеет неспецифические или аверсивные эффекты. Все из мышей db теряли небольшое количество веса в течение периода лечения, принимали ли они белок об. Животные db были заметно гипергликемическими, и потеря веса, вероятно, является результатом диабета, а не экспериментального протокола. Мыши C57BLJ/Ks db/db часто развивают диабет и начинают терять небольшие количества веса при возрасте животных,

используемых в данном исследовании (Coleman et al. 1978, выше). Мыши C57b1/6J ob/ob аналогичного возраста не развивают значимую гипергликемию. Считается, что эти фенотипические различия являются результатом генетических различий в штаммах (C57BL/6J против c57Bl/Ks), несущих мутации (Coleman et al. 1978, выше).

Неспособность обнаружить укороченный 105 аминокислотный белок, предсказанный последовательностью кДНК гена ОВ в мышах C57b1/6J ob/ob, предполагает, что мутантный белок деградирован или не транслирован. Однако вероятность того, что используемые антисыворотки не детектируют этот укороченный белок, не могут быть исключены. Наблюдаемое десятикратное увеличение уровней белка ob у мышей db по сравнению с диким типом свидетельствует о том, что белок ob переполнен, когда существует устойчивость к его эффектам. Эти данные коррелируют с исследованиями мРНК ОВ. Как упоминалось, предыдущие эксперименты показали, что мутации мышинного db и генов fa fa крысы, которые картируются с гомологичными хромосомными областями, приводят к сверхпродукции плазменного фактора, который подавляет массу тела (Traett et al. 1991, выше; Coleman, 1978, выше; Herveu, 1959, выше). В обоих случаях было предложено, что мутантные животные являются устойчивыми к эффектам белка ОВ. Эта возможность подтверждается наблюдением того, что белок ОВ не оказывает влияния на массу тела или потребление пищи при введении мышам db.

Ожирение у людей может быть связано с повышенными уровнями белка ОВ в плазме у индивидуумов, которые являются относительно невосприимчивыми к гормону. С другой стороны, сниженная экспрессия ОВ также может приводить к ожирению, и в этом случае можно найти "нормальный" (те ненадлежащим образом низкие) уровни белка. Таким образом, уровни белка ОВ в плазме человека могут быть маркером различных форм ожирения. В небольшой группе обедненных субъектов с ИМТ < 25, низкие уровни наногرامмов циркулирующего белка ОВ обнаруживаются с помощью ELISA. Значительно было отмечено, что переменные концентрации свидетельствуют о том, что уровень экспрессии и/или чувствительности к белку может играть роль в определении массы тела.

Место действия белка ОВ неизвестно. Белок влияет как на потребление пищи, так и на расход энергии, что согласуется с клиническими исследованиями, указывающими на то, что изменения обеих систем действуют для регулирования массы тела [Leibel et al. N Engl. J Med. , 332: 621-628 (1995); Keeseey et al. "Metabolic recommendation of the body weight set-point," in Association for Research in Нервной and Mental Disease, pp. 87 -96, Strinkard and Stellar, eds. , Raven Press, New York. (1984)]. Гипоталамус, вероятно, будет находиться ниже по потоку от ОВ в пути, который контролирует массу тела, хотя возможно прямое воздействие на множество органов.

Пример 9: Повышенная экспрессия в адипоцитах ОВ РНК у мышей с Повреждения гипоталамуса и мутации в локусе db

Генный продукт недавно клонированного гена ожирения мыши (ОВ) играет важную роль в регуляции массы жировой ткани. РНК ОВ экспрессируется конкретно адипоцитами мыши *in vivo* в каждом из нескольких различных депо жировых клеток, включая коричневый жир. Он также экспрессируется в культивируемых клетках 3T3 -442 А преадипоцитов, которые были индуцированы для дифференцирования. Мыши с поражениями гипоталамуса, а также мышами, мутантными в локусе db, экспрессируют двадцатикратный более высокий уровень РНК ОВ в жировой ткани. Эти данные позволяют предположить, что как ген db, так и гипоталамус находятся ниже по потоку от гена ОВ в пути, который регулирует массу жировой ткани и согласуется с предыдущими экспериментами, что позволяет предположить, что locus db кодирует рецептор ОВ. В db/db и лесных мышах количественные различия в уровне экспрессии ОВ РНК коррелировали с липидным содержанием адипоцитов. Молекулы, которые регулируют уровень экспрессии гена ОВ в адипоцитах, вероятно, играют важную роль в определении массы тела, как и молекулы, которые опосредуют эффекты ОВ в месте действия.

Материалы и способы

In situ Гибридизация.

Ткани белого жира из идентичных брюшных областей мышей дикого типа (wt) и db обрабатывали одновременно в соответствии с модифицированным способом, описанным Richardson et al. *Growth, Development & Aging*, 56: 149-157 (1992). Вкратце, ткани фиксировали в растворе Bouin в течение 2 часов при 4° С. Затем их дегидратировали путем последовательной обработки возрастающих концентраций этанола от 10% до 100%, каждая в течение 5 мин при 4° С. Дальнейшая инкубация тканей с ксилолом (1hr.) и парафин (2 часа). Были осуществлены при 65° С Внедренные wt и db/db жировые ткани были разделены на секции и установлены в тех же условиях позже. Секции выпекали при 65° С в течение 1hr. И обрабатывали ксилолом и серийными разведениями этанола от 100% до 50%, каждый в течение 3 мин при комнатной температуре. Антисмысловой РНК-зонд гена ОБ синтезировали путем транскрипции *in vitro* линеаризованной кодирующей последовательности гена ОБ перед промотором РНК-полимеразы Sp6. Гибридизацию *in situ* проводили точно в соответствии с Schaeren-Wiemaers, et al. *Histochemistry*, 100: 431-440 (1993).

Препарат РНК и культура клеток.

Общую РНК и нозерн-блоты получали, как описано. Стромальные сосудистые клетки и адипоциты получали в соответствии с Rodell, и РНК из обеих фракций получали в соответствии с Dani et al. *Mol. Клетка. Endocrinol*, 63: 199-208 (1989); Rodell, *J Biol. Chem.* 239: 375-380 (19). После субклонирования клетки 3T3-F442 выращивали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (определенной как стандартная среда) [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)]. При конfluентности клетки обрабатывали в стандартной среде с добавлением 2 нМ триодотиронина (Т3) и 17 нМ инсулина. Через двенадцать дней РНК получали, как указано выше.

Лечение Gold Thioglucose (GTG).

Двухмесячную самку мышей СВА/J обрабатывали однократным внутрибрюшинным введением ауротиоглюкозы (Sigma номер по каталогу A0632) в дозе 0,2 мг/г в физиологическом растворе. Контрольные животные инъецировали физиологическим раствором. После лечения мышей взвешивали через один месяц. РНК жировой ткани выделяли из тех обработанных животных, масса которых увеличилась более чем на двадцать грамм после лечения GTG.

Результаты

Недавно было обнаружено, что ген ОБ экспрессируется в жировой ткани [Zhang et al. *Nature*, 372: 425-432 (1994)]. Поскольку жировая ткань состоит из многих типов клеток, включая адипоциты, преадипоциты, фибробласты и сосудистые клетки, гибридизацию *in situ* проводили на участках эпидидимальных жировых подушечек от нормальных животных с смысловыми и антисмысловыми ОБ рибозондами [Richardson et al. 1992, выше; Wasserman, "The concept of the fat organ" in Rodahl, Issekutz, fat as a tissue", pp. 22 -92, Mcgraw Hill, New York (1964)]. При использовании антисмыслового зонда положительные сигналы были обнаружены во всех адипоцитах в разделе (Фигура 30-меченный Wt). Сигналы не были отмечены, когда антисмысловой зонд гибридизовался с участками головного мозга (данные не показаны). Гибридизация антисмыслового зонда с участками жировой ткани мышей C57b1/Ks db/db была значительно увеличена, что подтверждает специфическую экспрессию ОБ РНК адипоцитов и демонстрирует большое увеличение уровня РНК ОБ на адипоцит у этих животных (фиг. 30-меченный db/db). Мутант мышей в локусе db массивно ожидает в качестве части синдрома, который фенотипически идентичен таковому у мышей C57b1/6J ob/ob (Bahary et al. 1990, выше).

РНК ОБ не синтезировали стромальными клетками жировой ткани, выделенными из адипоцитов. Как ожидалось, клетки в фракции адипоцитов экспрессировали РНК ОБ с использованием нозерн-блотов (фиг. 31). Тот же результат был получен с использованием ОТ-ПЦР (данные не показаны). Эти данные подтверждают вывод, что только адипоциты

экспрессируют ген ОВ. Данные из культивируемых адипоцитов подтверждают этот вывод. В этих исследованиях клетки 3Т3-F442А культивировали с использованием условий, которые приводят к накоплению липидов, как часть клеточной программы, приводящей к дифференцировке в адипоциты. РНК ОВ не экспрессируется в экспоненциально растущих клетках, а также в конфлюэнтных клетках преадипоцитов 3Т3-F442А, которые экспрессируют ранние маркеры, в то время как дифференцировка этих клеток в адипоциты привела к экспрессии детектируемых уровней ОВ РНК (фиг. 31) [Dani et al. J Biol. Chem. 264: 10119-10125 (1989)]. Уровень РНК ОВ чрезвычайно чувствителен к условиям культивирования, поскольку сообщение не наблюдалось в поздних, постконфлюэнтных клетках, не подверженных воздействию инсулина.

Исследования гибридизации показали, что ОВ РНК экспрессируется *in vivo* в нескольких разных жировых депо, включая эпидидимальные, параметрические, абдоминальные, перинеальные и паховые жировые подушечки (фиг. 32 А). Точный уровень экспрессии в каждом из депо был несколько переменным, с паховым и параметрическим жиром, экспрессирующим более низкие уровни РНК ОВ. РНК ОВ также экспрессируется в коричневой жировой ткани, хотя уровень экспрессии приблизительно в 50 раз ниже в коричневом жире относительно других депо жировой ткани. Эти количественные различия свободно коррелируют с ранее сообщенными различиями в размере клеток среди различных депо жировых клеток [Johnson et al, J Lipid Res. 13: 2-11 (1972)]. На количество РНК СО в коричневом жире не влияет холодное воздействие (фигура 32В). В этом эксперименте уровень разобщающей белковой РНК (UCP) повышался в коричневом жире после холодного воздействия, в то время как уровень ОВ не изменился [Jacobsson et al, J Biol. Chem. 260: 16250-16254 (1985)]. В совокупности эти данные подтверждают, что все адипоциты способны продуцировать ОВ РНК и демонстрируют переменный уровень экспрессии в разных жировых депо. Эти данные поддерживают возможность того, что уровень кодируемого белка коррелирует с общей массой жировой ткани.

Измеряли уровни ОВ РНК у мышей db/db и мышей с поражениями гипоталамуса. Повреждения вентримедиального гипоталамуса (VMH) приводят к ожирению в качестве части синдрома, сходного с наличием у мышей ob/ob и db/db [Bray et al. Metabolism, 24: 99-117 (1975)]. Эксперименты парабиоза позволяют предположить, что такие повреждения приводят к чрезмерной экспрессии фактора на основе крови, который подавляет потребление пищи и массу тела (Hervey, 1959, выше). Аналогичные результаты отмечены, когда мутант мышей в локусе db парабенно мышам, что позволяет предположить, что рецептор ОВ может быть кодирован локусом db (Coleman et al. 1978, выше). Таким образом, ожирение, возникающее в результате повреждения VMH и мутации db, может быть результатом устойчивости к эффектам белка ОВ. Если это так, будет спрогнозировано вторичное увеличение уровней РНК ОВ в жировой ткани.

Гипоталамические поражения индуцировали у самок мышей СВА с использованием химического тиоглюкозы золота (GTG) [Debons et al, Fed. Proc, 36: 143-147 (1977)]. Это лечение приводит к конкретным гипоталамическим поражениям, главным образом в вентримедиальном гипоталамусе (VMH), с последующим развитием ожирения в течение нескольких недель. Как правило, однократное внутрибрюшинное введение GTG 0,2 мг/г массы тела приводит к развитию ожирения в течение четырех недель. У самок мышей СВА/Ж в возрасте одного месяца (20 -25 граммов) вводили GTG и показан последующий прирост массы обработанных и контрольных животных (таблица 2). РНК жировой ткани получали из мышей db/db и из этих животных, обработанных GTG, которые получили > 20 г. Нозерн-блоты показали двадцатикратное увеличение уровня РНК ОВ у мышей db/db и GTG, обработанных двумя месяцами, по сравнению с нормальными животными (фиг. 33).

Двухмесячную самку мышей СВА/Ж обрабатывали тиоглюкозой золота (GTG). Тиоглюкозу золота (Sigma A0632) вводили внутрипросветно в физиологическом растворе в дозе 2,0 мг/г. Массу тела контрольных и инъектированных животных регистрировали до и через месяц после инъекции. Животных помещали пять в клетку и скармливали *ad libitum*.

Количество массы, полученной за один месяц после инъекции, показано в таблице 2. Животные с увеличением массы тела больше чем 20 г через месяц после инъекции были выбраны для дальнейшего исследования.

Table 2. Weight Gain in Gold Thioglucose Treated Mice

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

Обсуждение

Генный продукт гена ОВ мыши циркулирует в плазме мыши и человека, где он может действовать, чтобы регулировать массу жировой ткани. Дальнейшие исследования регуляции экспрессии и механизма действия ОВ будут иметь важные последствия для нашего понимания физиологического пути, который регулирует массу тела.

Настоящий пример показывает, что продукт гена ОВ экспрессируется исключительно адипоцитами во всех депо жировой ткани. Этот результат согласуется с возможностью того, что белковый продукт гена ОВ коррелирует с липидными магазинами организма. Более того, RNA ОВ предполагается в двадцать раз у мышей db и мышей с гипоталамическими поражениями. У этих животных фактическое увеличение уровня ОВ РНК на клетку, вероятно, будет даже выше двадцати раз, поскольку размер клеток адипоцитов увеличивается приблизительно в пять раз у этих животных (см. фиг. 30) (Debons et al, 1977, выше). Эти данные положения гена db и гипоталамуса ниже по потоку от ОВ в пути, который контролирует массу тела, и согласуются с гипотезой, что рецептор ОВ кодируется в локусе db [Coleman et al. Diabetologia 14: 141-148 (1978)]. Молекулярное клонирование ОВ-рецептора и/или db-гена будет разрешать эту проблему. Повышение уровня РНК ОВ в мышцах db/db и GTG также предполагает не клеточную автономную функцию продукта гена ОВ в жировых клетках [Ashwell et al. Proc. R Soc. Lond. , 195: 343-353 (1977); Ashwell et al, Diabetologia, 15: 465 -470]. Таким образом, если кодируемый белок действовал непосредственно на жировые клетки для ингибирования роста или дифференцировки, сверхэкспрессия гена ОВ дикого типа у мышей, обработанных GTG, приведет к получению бедного фенотипа.

Наиболее сильным объяснением этих данных является то, что белок ОВ функционирует как эндокринная сигнальная молекула, которая секретируется адипоцитами и действует, прямо или косвенно, на гипоталамус. Непосредственное воздействие на гипоталамус потребовало бы, чтобы существовали механизмы, обеспечивающие прохождение продукта гена ОВ через гематоэнцефалический барьер. Механизмы, включающие околочентрикулярный орган и/или специфические транспортеры, могут обеспечивать доступ к мозгу молекулы, размер которой кодируется геном ОВ [Johnson et al. FASEB J. 7: 678-686 (1983); Baura et al. J Clin. Инжит. , 92: 1824-1830 (1993); Pardridge, Endocrine Reviews, 7: 314-330 (1986)]. Однако эта гипотеза должна рассматриваться с осторожностью до тех пор, пока не будет идентифицировано средство, с помощью которого белок может пересекать гематоэнцефалический барьер. Кроме того, необходимо оценить возможные эффекты на другие органы-мишени.

Сигнал (сигналы) жировой клетки, которые отвечают за количественное изменение уровня экспрессии гена ОВ, еще не известно, но коррелирует с различиями в размере клеток адипоцитов. Адипоциты мышей db/db в пять раз больше, чем у нормальных мышей, с размером клеток приблизительно 1,0 мкг липида/клетки (Johnson et al. 1972, выше). Предшествующие доказательства показали, что содержание и/или размер липидов жировой клетчатки является важным параметром при определении массы тела [Faust et al, Am. J Physiol, 235: 279-286 (1978); Faust et al. Science, 197: 393-396 (1977)]. Может быть, что каждая жировая клетка экспрессирует низкий уровень РНК ОВ, который дополнительно увеличивается

пропорционально размеру клеток. Также возможно, что размер ячейки не является измеряемым параметром, а просто коррелирует с внутриклеточным сигналом, который повышает экспрессию гена ОВ в адипоцитах из db/db и VMH-лейзонируемых мышей. В любом случае компоненты пути сигнальной трансдукции, регулирующие синтез РНК ОВ, вероятно должны быть важны при определении массы тела. Генетические и экологические влияния, которые снижают уровень экспрессии ОВ, будут действовать для увеличения массы тела, как это влияет на снижение чувствительности к кодированному белку. Специфические молекулы, которые регулируют уровень экспрессии гена ОВ, являются еще неизвестными и ожидают определения уровня (уровней) управления геном, что приводит к количественному изменению уровня РНК ОВ и исследованию регуляторных элементов гена ОВ. Идентификация молекул, которые регулируют экспрессию гена ОВ в адипоцитах, и тех, которые опосредуют эффекты кодируемого белка в его сайте (ах) действия, значительно повысит понимание физиологических механизмов, которые регулируют массу тела.

Пример 10: Картина экспрессии РНК и картирование на физическом, Цитогенетические и генетические карты хромосомы 7

РНК ОВ экспрессируется на высоких уровнях в жировой ткани человека и по существу на более низких уровнях в плаценте и сердце. Ген ОВ человека сопоставляется с крупным контигом искусственной хромосомы дрожжей (YAC), полученным из хромосомы 7q313, в дополнение к подтверждению относительного расположения гена на основе сравнительного картирования мыши-человека, данное исследование идентифицировало 8 установленных микросателлитных маркеров в непосредственной физической близости к гену ОВ человека. Поскольку мутации в мышинных ОВ могут приводить к синдрому, который близко напоминает морбидное ожирение у людей, эти генетические маркеры представляют собой важные инструменты для изучения возможной роли гена ОВ в наследственных формах ожирения человека.

Материалы и способы Нозерн-блот-анализ.

Общую РНК получали из жировой ткани с использованием способа Chirgwin et al. Biochem. 18: 5294-5299 (1979). Нозерн блоты, радиоактивно мечение и гибридизацию проводили, как описано (Zhang et al. 1994, см. выше). Нозерн-блоты поли А + РНК (MTN человека, MTN π человека и фетальная MTN U человека) были получены от CLONETECH (Palo Alto, CA), как и праймеры ПЦР, используемые для генерации радиоактивно меченого актинового зонда человека.

Development.

Были разработаны и оптимизированы, по существу, как описано [Green et al. PCR Methods Applicic, 1991; Green et al. Genomics, 11: 548-564 (1991); Green, "Physical mapping of human chromosomes: generation of chromosome-specific sequence-меченые сайты", in Methods in Molecular Genetics Vol. 1, Gene and Chromosome Analysis (Part A), pp. 192 -210, Adoleph ed. Academic Press, Inc. San Diego (1993); Green et al. Hum. Моль. Genet. , 3: 489-501(1994)]. Каждый STS называется с использованием префикса sWSS, за которым следует уникальный номер. Подробности о 19 STS, представленных в настоящем описании, представлены в таблице 3, при этом дополнительная информация (например, условия реакции ПЦР, полная последовательность ДНК) доступна в Genbank и/или базе данных генома (GDB). Для STS с микроспутниками олигонуклеотидные праймеры, используемые в анализах ПЦР (таблица 3), соответствовали либо использованным для анализа генотипа (Таблица 4), либо сконструированными (чаще всего с компьютерной программой OSP) [Hillier et al. PCR Methods

Applicis, 1: 124-128 (1991)] с использованием последовательности ДНК, доступной в Genbank. Таблица 3 иллюстрирует STS в контиге YAC, содержащем ген OB человека.

Table 3

STS Name	Alias	Locus	Source	PCR Primers	Size (bp)	SEQ ID NO:	GDB ID No:
WSS1734		D7S185	YAC End	CAAGACAAATGAGATAAGG AGAGTTACAGCTTTACAG	72	39 40	G00-455-235
WSS494		D7S2016	Lambda Clone	CTAAACACCTTTCCATTCC TTATATTTCACCTTTCCCTCTC	112	41 42	G00-334-404
WSS883	UT528	D7S1498	Genetic Marker	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG GTGCAGCTTTAAATTGTGAGC	490	43 44	G00-455-262
WSS2359	AFMa065zg9	D7S1873	Genetic Marker	AGTGTGTGTTTCTCCTG AAAGGGGATGTGATAAGTG	142	45 46	G00-455-247
WSS2336	AFMa125wh1	D7S1874	Genetic Marker	GGTGTACGTTTAGTTAC GGAATAATGAGAGAAGATTG	112	47 48	G00-455-244
WSS1218	AFM309yf1	D7S680	Genetic Marker	GCTCAACTGACAGAAAAC GACTATGTAAAAGAAATGCC	154	49 50	G00-307-733
WSS1402		D7S1916	YAC End	AAAGGCTTCTAATCTAC CCTTCCAACCTCTTTGAC	137	51 52	G00-344-044
WSS999		D7S1674	YAC Insert	TAAACCCCTTTCTGTTC TTGCATAATAGTCACACCC	105	53 54	G00-334-839
WSS1751		D7S2186	YAC End	CCAAATCAGAATTGTCAGAAAG AAACCGAAGTTCAGATACAG	186	55 56	G00-455-238
WSS1174	AFM218xf10	D7S514	Genetic Marker	AATATCTGACATTGGCAC TTAGACCTGAGAAAAGAG	144	57 58	G00-307-700
WSS2061		D7S2184	YAC End	GTTGCACAATACAAAATCC CTTCCATTAGTGTCTTATAG	200	59 60	G00-455-241

Table 3. cont.

STS Name	Alias	Locus	Source	PCR Primers	Size (bp)	SEQ ID NO:	GDB ID No.
sWSS2588		D7S2187	YAC End	ATCACTACACACCTAATC CCATTCTACATTCCACC	117	61 62	G00-455-253
sWSS808	Pax-4	PAX4	Gene	GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA TTGCCAGGCAAGAGGGCTGGAC	153	63 64	G00-455-259
sWSS1392	AFM206xc1	D7S635	Genetic Marker	CTCAGGTATGTCTTTTATC TGCTCTGCATTCTTTTC	75	65 66	G00-307-815
sWSS1148	AFM199ah12	D7S504	Genetic Marker	GACACATACAAACACAAAG ATTGAGTTGAGTGTAGTAG	60	67 68	G00-307-652
sWSS1529		D7S1943	YAC End	CAGGGATTTCTAATTGTC AAAAGATGGAGGCTTTTG	116	69 70	G00-334-119
sWSS2619	OB	OB	Gene	CGTTAAGGGAAGGAACCTCTGG TGGCTTAGAGGAGTCAGGA	106	71 72	G00-455-256
sWSS404		D7S1956	Lambda Clone	ACCAGGGTCAATACAAAG TAATGTGTCCTTCTTGCC	122	73 74	G00-334-251
sWSS2367	AFMa345wc9	D7S1875	Genetic Marker	CAATCCTGGCTTCATTTG AAGGTGGGTAGGATGCTA	81	75 76	G00-455-250

Перечислены 19-хромосомные 7-специфические STS, картированные на континг YAC, содержащий ген OB человека (Фиг. 35). В каждом случае обозначаются названное название "sWSS", релевантные псевдоним, GDB-назначенное название локуса, источник STS, последовательности праймеров ПЦР, размер STS и идентификационный номер GDB. Источники STS являются следующими: "YAC End" (выделенный вставной конец YAC) (Green, 1993, выше), "Лямбда Клон" (случайный хромосомный 7-специфический лямбда-клон) (Green et al. 1991, выше; Green, 1993, выше), "Генетический маркер" (микросателлитный маркер, см. таблицу 2) (Green et al. 1994, supra), "YAC вставка" (случайный сегмент из вставки YAC) и "Ген" (ген-специфические STS). Следует отметить, что для некоторых STS, специфичных к генетическому маркеру, праймеры для ПЦР, используемые для идентификации YAC (перечисленных в этой таблице), отличаются от тех, которые используются для выполнения анализа генотипа (таблица 4), поскольку обнаружение YAC, содержащих генетический маркер, не требует амплификации самого полиморфного тракта. Все указанные анализы ПЦР использовали температуру отжига 55° C, за исключением sWSS494, sWSS883, sWSS1529 и sWSS2619 (который использовали при 50° C), sWSS999 и sWSS1174 (который использовали 60°

С), и sWSS808 (который использовали 65° С). Дополнительные подробности в отношении STS-специфических анализов ПЦР доступны в GDB.

Table 4

Microsatellite markers in the YAC contig containing the human *ob* gene.

Marker Name	Type	Locus	Primers	SEQ ID NO:	GDB ID No.
UT528	Tetra.	D7S1498	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG GTGCAGCTTTAATTGTGAGC	77 78	G00-312-446
AFMa065zg9	(CA) _n	D7S1873	AGCTTCAAGACTTTNAGCCT GGTCAGCAGCACTGTGATT	79 80	G00-437-253
AFMa125wh1	(CA) _n	D7S1874	TCACCTTGAGATTCCATCC AACACCGTGGTCTTATCAAA	81 82	G00-437-263
AFM309yf10	(CA) _n	D7S680	CATCCAAAGTTGGCAGTTTT AGATGCTGAATTCACAGACA	83 84	G00-200-283
AFM218xf10	(CA) _n	D7S514	TGGGCAACACAGCAAA TGCAGTTAGTCCCAATGTCA	85 86	G00-188-404
AFM206xc1	(CA) _n	D7S635	CCAGGCCATGTGGAAC AGTTCTTGGCTTGGCTCAGT	87 88	G00-199-240
AFM199xb12	(CA) _n	D7S504	TCTGATTGCTGGCTGC GCCCGTGTGTATGTGAG	89 90	G00-188-280
AFMa345wc9	(CA) _n	D7S1875	AGCTCTTGGCAAACTCACAT GCCTAAGGGGAATGAGACACA	91 92	G00-437-259

Перечислены восемь микросателлитных маркеров, отображенных на контиг YAC, содержащий ген ОБ человека (Фиг. 35). В каждом случае название маркера (указано как псевдонима в Таблице 3), тип микросателлитного мотива (тетрануклеотид -'Tetra'повтор или (CA) n повтор), GDB-назначенное название локуса, последовательности праймеров, используемые для анализа генотипа на основе ПЦР, и идентификационный номер GDB указаны. Дополнительные подробности в отношении анализов ПЦР и полиморфизмов доступны в GDB.

Человека СО-специфическими STS (sWSS2619) конструировали с использованием последовательности ДНК, полученной из 3'- нетранслируемой области кДНК. Специфические к человеческому Pax4 STS (sWSS808) были разработаны с использованием следующей стратегии. Олигонуклеотидные праймеры, специфичные для гена Pax4 мыши (GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA) (SEQ ID NO: 63) и (GGGAGCCTTGTCTTGGGTACAAAG) (SEQ ID NO: 93) [Walther et al. 1991, Genomics 11: 424 - 434] (1991)], использовали для амплификации фрагмента 204 пн из геномной ДНК человека (которая являлась тем же самым размером продукта, что и у геномной ДНК мыши). Этот анализ ПЦР не был пригоден для идентификации соответствующих YAC, так как продукт аналогичного размера (200 пн) также амплифицировали из дрожжевой ДНК. Однако анализ последовательности ДНК продукта ПЦР, полученного из ДНК человека, выявил замены в 20

положениях среди 156 оснований, проанализированных (данные не показаны). Используя эту специфическую для человека последовательность, конструировали новый праймер (TTGCCAGGCAAAGAGGGCTGGAC) (SEQ ID NO: 64) и использовали с первым из вышеуказанных специфичных для мышинных Pax4 праймеров (см. таблицу 3). Полученный в результате ПЦР-анализ, специфический для Pax4 человека, не амплифицировал значимый продукт из дрожжевой ДНК и, таким образом, использовался для идентификации соответствующих YAC.

Идентификация YAC скринингом на основе ПЦР.

Большинство YAC, изображенных на фиг. 35, получали из коллекции клонов, высоко обогащенных ДНК хромосомы 7 человека ("ресурс 7 хромосомы 7 YAC") (Green et al. 1995, выше) с использованием стратегии скрининга на основе ПЦР [Green et al. 1995, supra; Greena et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 87: 1213-1217 (1990)]. В нескольких случаях клоны выделяли с помощью скрининга на основе ПЦР (Greena et al. 1990, см. выше) доступных общих геномных библиотек YAC человека, сконструированных в CEPH [Dausset et al. Behring Inst. Митот, 91: 13-20 (1992); Albertsen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 4256-4260 (1990)] или ICI [Anand et al, Nucl. Acids Res. 17: 3425-3433 (1989); Anand et al, Nucl. Acids Res. 18: 1951-1956 (1990)]. Каждый YAC назван с использованием префикса "YWSS", за которым следует уникальный номер.

Результаты и обсуждение

Исследование экспрессии ткани гена OB человека с помощью нозерн-блоттинга выявило, что РНК OB экспрессируется на высоком уровне в жировой ткани человека и намного более низких уровнях в плаценте и сердце (Фигура 34). Размер РНК (приблизительно 4,5 тпн) был эквивалентным у человека и мыши, а также в каждой из экспрессирующих тканей. В этих исследованиях наблюдали пятикратные более высокие сигналы в 10 мкг общей РНК жировой ткани, как в 2 мкг полиА + плацентарной РНК. Пятикратный нижний сигнал был виден в полиА + РНК из сердца по сравнению с плацентой. Оценивают, что уровень РНК OB приблизительно в 250 раз ниже в плаценте, чем в жировой ткани. В этом эксперименте РНК OB не была обнаружена в любой из других проанализированных тканей, включая головной мозг, легкое, печень, скелетную мышцу, почку и поджелудочную железу. Дополнительные эксперименты не выявили РНК OB в селезенке, тимусе, предстательной железе, семенниках, яичниках, тонкой кишке, толстой кишке, лейкоцитах периферической крови или в головном мозге, печени или почках плода (данные не показаны). Возможно, что OB экспрессируется на необнаруживаемом уровне (с помощью нозерн-блоттинга) в этих последних тканях или в других тканях, которые не были изучены. Наблюдаемый паттерн экспрессии у человека несколько отличается от мыши, в которой OB РНК обнаружена почти исключительно в жировой ткани.

Сравнительное картирование области гена OB в геномах мыши и человека. Ген OB мыши расположен на проксимальной хромосоме 6 в области, гомологичной части хромосомы 7q человека. Гены в этом сегменте включают (от проксимального до дистального): протоонкоген Met, регулятор трансмембранной проводимости кистозного фиброза (Cftr), парный коробчатый ген 4 (Pax4), OB и карбоксипептидазу A (Cpa) (Zhang et al, 1994, supra; Friedman et al. , 1991, выше). У мыши генетическое картирование использовали для демонстрации того, что Pax4 тесно связан с ob [Walther et al. 1991, supra; Zhang et al. 1994, supra]. Было обнаружено, что физическое расстояние между OB и Pax4 составляет приблизительно одну пары мегаазы (Mb) (Zhang et al. 1994, см. выше). Исходя из этих сравнительных исследований картирования, ожидается, что ген OB человека будет находиться между Pax4 и CPA на хромосоме 7q. Кроме того, поскольку человеческий CFTR [Heng et al. Cell Genet. , 62: 108-109 (1993)] And Pax4 [Tamura et al. Cytogenet. Клетка Genet. 66: 132-134 (1994)] были картированы флуоресцентной

гибридизацией *in situ* (FISH) до 7q31.3 и 7q32, соответственно, наиболее вероятное цитогенетическое положение гена ОБ человека будет находиться вблизи границы 7q31,3-q32.

Картирование гена ОБ на хромосоме 7 человека.

STS (sWSS2619), амплифицирующий небольшой сегмент 3'-нетранслируемой области гена ОБ человека, использовали для скрининга коллекции клонов YAC, которые высоко обогащены ДНК хромосомы 7 человека (Green et al, 1995a, Genomics 25: 170 -183), и были идентифицированы 9 YAC (yWSS691, yWSS1332, yWSS1998, yWSS2087, yWSS3319, yWSS3512, yWSS4875, yWSS4970 и yWSS5004). Чтобы убедиться, что эти YAC содержат аутентичный ген ОБ человека, были выполнены два дополнительных эксперимента. Во-первых, каждый из YAC тестировали со вторым человеческим ОБ-специфичным ПЦР-анализом, и все они оказались положительными (данные не показаны). Во-вторых, дрожжевую ДНК из каждого клона расщепляли *Eco*RI и анализировали гибридизацией с переносом геля с использованием зонда, полученного из кДНК ОБ человека. Во всех случаях наблюдали единственную полосу гибридизации; и эта полоса имела одинаковый размер в YAC и клон P1, известный как содержащий ген ОБ человека (данные не показаны).

Используя компьютерную программу SEGMAP (Green and Green, 1991, выше) и другие данные STS-содержания, основанные на YAC, которые мы генерировали для хромосомы 7 (Green et al. 1991, *supra*; Green et al. 1994, *supra*; Green et al. 1995, *supra*), было обнаружено, что ген ОБ человека находится внутри контига YAC, изображенного на фиг. 35. В частности, этот контиг состоит из 43 перекрывающихся YAC и 19 уникально упорядоченных STS. Подробности о каждом из 19 STS приведены в Таблице 3. В дополнение к ОБ-специфичным STS контиг также содержит STS (sWSS808), специфический для гена *Pax4* человека (Tamura et al. 1994, *supra*; Stapleton et al. 1993, Nature Genet. 3: 292 -298), 7 STS, полученные из хромосомных 7-специфических YAC, 2 STS, полученных из хромосомных 7-специфичных лямбда-клонов, и, что важно, 8 микросателлитно-специфичных STS. Дополнительные подробности относительно этих 8 генетических маркеров, включая последовательности праймеров, используемых для анализа генотипа, представлены в Таблице 2. Следует отметить, что существует избыточная связность на основе YAC по всему контигу (те имеются 2 или более YAC, соединяющих каждую смежную пару STS), что обеспечивает сильную поддержку относительного порядка STS, показанных на фиг. 35.

Как показано на фиг. 35, прогнозируемая ориентация человеческого СО-содержащего контига YAC такова, что sWSS1734 является центромерным-большинством STS (те наиболее близким к CFTR), тогда как sWSS2367 представляет собой теломерные большинство STS (те наиболее близкие к CPA). Эта ориентация преимущественно основана на сравнительных данных картирования, которые размещали *Pax4* проксимальный и ОБ дистально внутри синтенового блока, присутствующего в мышиной и человеческой ДНК (Zhang et al. 1994, см. выше). ОБ-генные карты вблизи теломерного конца контига, на основе размещения ОБ-специфичных STS (sWSS2619).

В то время как контиг, показанный на фиг. 35, был выведен на SEGMAP без учета размеров YAC (таким образом, демонстрируя STS, равноудаленные друг от друга), аналогичный анализ данных посредством SEGMAP, которые учитывались для размеров YAC, указывало, что общий размер области, покрытой контигом, составляет только более 2 Мб (данные не показаны). Таким образом, в то время как все 8 микросателлитно-специфичных STS (таблица 4) содержатся в геномном интервале, охватывающем примерно 2 Мб, 3 наиболее близко к теломерному концу контига (sWSS1392, sWSS1148 и sWSS2367), в частности, близки к самому гену ОБ (возможно, в интервале до приблизительно 500 кб). Фактически, все 3 из последних STS присутствуют по меньшей мере в 1 из человеческих СО-содержащих YAC.

Следует отметить, что интервал между человеческим Pax4 (sWSS808) и ob (sWSS2619) оценивается как приблизительно 400 кб, тогда как эта область была предсказана, чтобы охватывать приблизительно 1 Мб у мыши (Zhang et al. 1994, см. выше). Наконец, 3 из YAC в контиге (yWSS691, yWSS999 и yWSS2935) также анализировали с помощью FISH, и каждый из этих YAC, как было обнаружено, гибридизуется исключительно с 7q313. Один из этих YAC (yWSS691) содержит oIS-специфичные STS, в то время как другие 2 клона содержат Pax4-специфичные STS.

Последние результаты, как правило, согласуются с предыдущим цитогенетическим назначением человеческого Pax4-7q32 (Tamura et al. 1994, см. выше). На основании этих данных ген ОБ человека может быть отнесен к цитогенетической полосе 7q313

ПРИМЕР 11: Полипептид ОБ человека является биологически активным у мышей

Группы 10 ob/ob мышей обрабатывали с помощью ip-инъекции 10 мкг/г/день рекомбинантного (бактериального) полипептида ОБ человека и мышинового ОБ или физиологического раствора. Через четыре дня группа, получающая физиологический раствор, получила 0,3 г. Группа, принимающая мышинные ОБ, потеряла 3,2 г. Группа, принимающая человека ОБ, потеряла 2 г ($p < 0.1$ по сравнению с физиологическими средствами контроля). Эти группы также тестировали на потребление пищи. Данные для приема пищи показаны в таблице 5; данные для массы тела показаны в таблице 6.

Table 5

Food intake/day (g) of treated ob/ob mice (value $\pm$ S.Dev)

Treatment	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
saline	13.4 $\pm$ 2.6	12.8	12.8	13.1	14.0	12.3	12.4	8.3
murine OB	14.9	3.7	4.4	5.1	8.9	8.1	8.7	3.5
human OB	14.3	10.3	8.7	7.0	8.9	5.3	3.8	13.0

Table 6

Body weight and weight change in treated ob/ob mice (value $\pm$ S.Dev)

Treatment	Body Weight (Day 0)	Body Weight (Day 4)	Percent change (Day 0 to 4)	Body Weight (Day 6)	Percent Change (Day 0 to 6)
saline	39.9 $\pm$ 1.8	40.7 $\pm$ 1.6	0.8 $\pm$ 0.5	41.1 $\pm$ 2.2	1.2 $\pm$ 1.1
murine OB	39.5 $\pm$ 2.1	36.2 $\pm$ 2.0	-3.3 $\pm$ 1.2	36.3 $\pm$ 2.2	-3.1 $\pm$ 1.2
human OB	39.5 $\pm$ 2.0	37.6 $\pm$ 1.7	-2.0 $\pm$ 1.0	36.1 $\pm$ 1.3	-3.5 $\pm$ 1.3

Эти данные демонстрируют, что человеческий ОБ является биологически активным у мышей.

Table 7

Body mass (g) of normal mice receiving OB

Treatment	Day 0	Day 4	Day 8	Day 12	Day 16
saline	22.6 $\pm$ 1.4	22.2 $\pm$ 1.2	22.5 $\pm$ 1.3	23	22.5
murine OB	22.4 $\pm$ 1.5	20.6 $\pm$ 1.5	20.8 $\pm$ 1.3	20.8	21.8

Пример 12: Высокая доза ОБ влияет на мыши дикого типа мышей дикого типа (C57B16J + /?) обрабатывали 10 мкг/г/день рекомбинантного мышинового ОБ, и массу тела измеряли каждые четыре дня. Результаты показаны в таблице 7.

Эти данные демонстрируют, что ОВ влияет на массу тела мышей дикого типа, а также мышей с ожирением (ob/ob), хотя и в гораздо меньшей степени.

Пример 13: Полипептид ОВ, вводимый путем непрерывной инфузии насоса

Этот пример демонстрирует, что непрерывная инфузия полипептида ОВ приводит к потере массы у нормальных мышей. Мышам с нормальным (не ожирением) мышам вводили полипептид мышиногo ob посредством инфузии осмотического насоса. Дозировка 0,5 мг белка/кг массы тела/день приводила к 4,62% потере (+/- 1,34%) от исходного веса на 6-й день инфузии.

Материалы и способы

Животные

В этом примере использовали мышей C57b16 дикого типа (+/+) C57b16. Мышей помещали однократно и поддерживали в условиях гупана. Возраст мышей в начальный момент времени составлял 8 недель, и животные были стабилизированы по массе. Для каждой когорты использовали десять мышей (по сравнению с белком).

Кормление и измерение веса

Мышам вводили измельченные кормушки для грызунов (PMI Feed, Inc.) в порошкообразных питателях (Allentown Culing and Equipment), что позволило более точно и чувствительное измерение потребления пищи, чем использование регулярного блокового хоу. Вес измеряли в то же время каждый день (2: 00 мкм) в течение 6 дней. Массу тела в день до инфузии определяли как базовый вес.

Клонирование ДНК мыши ОВ

Клонирование ДНК мыши ОВ для экспрессии в *E. coli* проводили следующим образом. Последовательность ДНК, полученная из опубликованной пептидной последовательности, которая появилась в (Zhang et al, 1994, supra, те пример 1, выше), была транслирована с использованием оптимальных кодонов *E. coli*. Сайты клонирования терминала были XbaI до ВАМНІ. Усилитель связывания рибосомы и сильный сайт связывания рибосомы были включены перед областью кодирования. Последовательность дуплексной ДНК синтезировали с использованием стандартных методик. Правильные клоны подтверждали, демонстрируя экспрессию рекомбинантного белка и наличие правильной последовательности ДНК ОВ в резидентной плазмиде. Аминокислотная последовательность (и последовательность ДНК) является следующей:

Рекомбинантная мышинная МЕТ (двухцепочечная) ДНК и аминокислотная последовательность. (Seq. ID. NOS: 94 и 95):

```

TCTAGATTGAGTTTAACTTTTAGAAGGAGGAATAACATATGGTACCAGTCCAGAAAGT
9 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 68
AGATCTAAACTCAAATTTGAAAATCTTCTCCTTATTGTATACCATGGCTAGGTCTTTCA

                                     M V P I Q K V -

TCAGGACGACACCAAAACCTTAATTTAAACGATCGTTACGCGTATCAACGACATCAGTCA
69 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 128
AGTCTGCTGTGGTTTTTGGAATTAATTTTGCTAGCAATGCCATAGTTGCTGTAGTCAGT

      Q D D T K T L I K T I V T R I N D I S H -

CACCCAGTCGGTCTCCGCTAAACAGCGTGTTACCGGTCTGGACTTCATCCCGGGTCTGCA
129 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 188
GTGGGT CAGCCAGAGGCGATTGTGCGACAATGCCAGACCTGAAGTAGGGCCCAGACGT

      T Q S V S A K Q R V T G L D F I P G L H -

CCCGATCCTAAGCTTGTCCAAATGGACCAGACCCTGGCTGTATACCAGCAGGTGTTAAC
189 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 248
GGGCTAGGATT CGAACAGGTTTTACCTGGTCTGGGACCGACATATGGTCGTCCACAATTG

      P I L S L S K M D Q T L A V Y Q Q V L T -

CTCCCTGCCGTCCAGAAGCTTCTTCAGATCGCTAACGACCTCGAGAACCTTCGCGACCT
249 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 308
GAGGGACGCGAGGGTCTTGCAAGAAGTCTAGCGATTGCTGGAGCTCTTGAAGCGCTGGA

```

Экспрессионный вектор и штамм-хозяин.

Плазмидный экспрессионный вектор, используемый для получения белка, представлял собой pCFM1656, American Type Culture Collection (ATCC) Accession No. 69576. Вышеописанная ДНК лигирована в экспрессионный вектор pCFM1656, линейаризованный XbaI и BAMHI, и трансформированный в штамм-хозяин E.coli FM5. Клетки E.coli FM5 получали в Amgen Inc. тыс. Oaks, CA из штамма E.coli K -12 [Bachmann et al. Bacteriol Rev. , 40: 116-167 (1976)] и содержит интегрированный ген репрессора лямбда-фага, cIor5 7 [Sussman et al. CR Acad. Sci. 254: 1517-1579 (1962)]. Получение вектора, трансформацию клеток и отбор колоний проводили стандартными способами, например, Sambrook et al. 1989, см. выше. Клетки-хозяева выращивали в среде LB.

Введение белка или носителя

Рекомбинантный полипептид ОВ мыши использовали для настоящих экспериментов, как правило, в концентрации приблизительно 0,9 мг/мл забуференного фосфатом солевого раствора, рН 7,4. Аминокислотную последовательность (и последовательность ДНК) использовали непосредственно выше. Белок или носитель (фосфатно-солевой буфер, рН 7,4) вводили путем инфузии осмотического насоса. Осмотические мимики Alzet (Alza, Palo Alto, CA, модель № 1007D) хирургически помещали в каждый мыши в подкожном кармане в подлопаточной области. Насосы калибровали для введения 0,5 мл белка в растворе в час для дозировки 0,5 мг белка/кг массы тела/день. Контрольные животные пропитывали фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) с помощью осмотического мининасоса Alzet.

Процесс ферментации. Для получения белка использовали трехфазный протокол ферментации, известный как периодический способ с подпиткой. Мультимедийные композиции изложены ниже.

Партия. Источник азота и фосфата стерилизовали (путем повышения температуры до 122° С в течение 35 минут, 18-20 фунтов на кв. дюйм) в ферментационном сосуде (Biolafitte, емкостью 12 л). После охлаждения в асептических условиях добавляли углерод, магний, витамины и источники следовых металлов. К ферментеру добавляли ночную культуру (16 часов или более) вышеуказанных рекомбинантных продуцирующих белок бактерий мышиных бактерий объемом 500 мл (выращенных в бульоне LB).

Сырье I При достижении между 4,0 -6,0 О.д.600, сырье I добавляли к культурам. Глюкозу добавляли с предельной скоростью для контроля скорости роста (μ). Автоматизированная

система (называемая распределительной системой управления) была запрограммирована для контроля скорости роста в течение 0,15 поколений.¹

Media Composition:

Batch:	10 g/L	Yeast extract
	5.25 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄
	3.5 g/L	K ₂ HPO ₄
	4.0 g/L	KH ₂ PO ₄
	5.0 g/L	Glucose
	1.0 g/L	MgSO ₄ •7H ₂ O
	2.0 ml/L	Vitamin Solution
	2.0 ml/L	Trace Metal Solution
	1.0 ml/L	P2000 Antifoam
Feed I:	50 g/L	Bacto-tryptone
	50 g/L	Yeast extract
	450 g/L	Glucose
	8.75 g/L	MgSO ₄ •7H ₂ O
	10 ml/L	Vitamin Solution
	10 ml/L	Trace Metal Solution
Feed II:	200 g/L	Bacto-tryptone
	100 g/L	Yeast extract
	110 g/L	Glucose

Сырье II. Когда OD достигала 30, температура медленно повышалась до 42° C, и подача была изменена на подачу II, описанную ниже. Затем позволяли продолжать ферментацию в течение 10 часов с отбором проб каждые 2 часа. Через 10 часов содержимое ферментера охлаждали до температуры ниже 20° C и собирали центрифугированием.

Раствор витамина (партия, сырье I): 0,5 г биотина, 0,4 г фолиевой кислоты и 4,2 г рибофлавина растворяли в 450 мл H₂O и 3 мл 10 н. NAOH и доводили до 500 мл H₂O. Четырнадцать граммов пиридоксина-HCl и 61 г ниацина растворяли 150 мл H₂O и 50 мл 10 N NAOH и доводили до 250 мл H₂O. Пятьдесят четыре грамма пантотеновой кислоты растворяли в 200 мл H₂O и доводили до 250 мл. Три раствора объединяли и доводили до общего объема 10 литров.

Раствор микрометалла (партия, корм I):

Хлорид железа (FECL₃6H₂O): 27 г/л

Хлорид цинка (ZNCL₂4H₂O): 2 г/л хлорида кобальта (COCL₂6H₂O): 2 г/л

Молибдат натрия (NAMOO₄2H₂O): 2 г/л

Хлорид кальция (CACL₂2H₂O): 1 г/л

Сульфат меди (CUSO₄.5H₂O): 1,9 г/л

Борная кислота (H₃bo₃): 0,5 г/л

Хлорид марганца (MNCL₂4H₂O): 1,6 г/л

Дигидрат цитрата натрия: 73,5 г/л

Процесс очистки полипептида ОВ мыши

Очистку осуществляли с помощью следующих стадий (если не указано иное, следующие стадии проводили при 4° C):

1. Клеточная паста. Клеточную пасту *E coli* суспендировали в 5-кратном объеме 7 мМ EDTA, pH 7,0. Клетки в EDTA дополнительно разбивали на два прохода через микрофлюидизатор. Разрушенные клетки центрифугировали при 4 2к об/мин в течение 1 часа в центрифуге Векман JB-6 с ротором J5 -4,2.

2. Промывание тела включения № 1. Надосадочную жидкость сверху удаляли и осадок ресуспендировали 5-кратным объемом 7 мМ EDTA, pH 7,0 и гомогенизировали. Эту смесь центрифугировали, как на стадии 1.

3. Промывание тела включения # 2. Надосадочную жидкость сверху удаляли и осадок ресуспендировали в десятикратном объеме 20 мМ Tris, pH 8,5, 10 мМ DTT и 1% дезоксихолата и гомогенизировали. Эту смесь центрифугировали, как на стадии 1.

4. Промывание тела включения № 3. Надосадочную жидкость сверху удаляли и осадок ресуспендировали в десятикратном объеме дистиллированной воды и гомогенизировали. Эту смесь центрифугировали, как на стадии 1.

5. Рефолдинг. Осадок повторно складывали 15 объемами 10 мМ HEPES, pH 8,5, 1% саркозина натрия (N-лаурилсаркозина) при комнатной температуре. Через 60 минут раствор готовили как 60 мМ сульфата меди, а затем перемешивали в течение ночи.

6. Удаление саркозина. Повторно складывающуюся смесь разбавляли 5 объемами 10 мМ трис-буфера, pH 7,5 и центрифугировали, как на стадии 1. Супернатант собирали и перемешивали при перемешивании в течение одного часа со смолой Dowex 1-X4, 20-50 меш, хлоридной формой (при общем объеме разбавленной рефолдирующей смеси 0,066%). Эту смесь выливали в колонку и собирали элюант. Удаление саркозина устанавливали с помощью ВЭЖХ.

7. Кислотное осаждение. Элюант с предыдущей стадии собирали и pH доводили до pH 5,5 и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Эту смесь центрифугировали, как на стадии 1.

8. Катионообменная хроматография pH супернатанта с предыдущей стадии доводили до 4,2 и загружали на CM Sepharose Fast Flow. Двадцать объемов колонки градиента соли использовали при 20 мМ NAOAC, pH 4,2, 0 М до 1,0 М NaCl.

9. НИС-хроматография Пул CM-сефарозы пиковых фракций (выявленный в ультрафиолетовом анализе) с вышеуказанной стадии доводили до 0,2 М сульфата аммония. Градиент обратной соли по объему 20 колонки проводили при 5 мМ NaOac, pH 4,2, при 0,4 М до 0 М сульфата аммония. Этот материал концентрировали и подвергали диалфильтрации в PBS.

Результаты

Ниже представлены процентные (%) различия от исходного веса у мышей C57B16J (старые):

Table 8
Weight Loss Upon Continuous Infusion

<u>Time (days)</u>	<u>Vehicle (PBS)</u>	<u>Recombinant OB polypeptide</u>
Days 1-2	3.24 +/- 1.13	1.68 +/- 1.4
Days 3-4	4.3 +/- .97	-2.12 +/- .79
Days 5-6	4.64 +/- .96	-4.62 +/- 1.3

Как можно видеть, в конце 6-дневного непрерывного режима инфузии животные, получающие полипептид ОБ, теряли на 4% своей массы тела, по сравнению с исходным уровнем. Это значительно более быстрое снижение веса, чем наблюдалось при

внутрибрюшинном (ip) введении. Потерю массы только 2,6 -3,0% наблюдали в конце 32-дневного периода инъекции у мышей дикого типа (нормальных), с ежедневным ip

инъекции рекомбинантного полипептида ОВ мыши в дозе 10 мг/кг и не более 4% в любое время во время расписания дозирования (данные не показаны). Настоящие данные указывают на то, что при непрерывной инфузии более низкая дозировка в 20 раз (0,5 мг/кг по сравнению с 10 мг/кг) достигает большей потери веса за более короткий период времени.

Результаты, представленные в данном документе, являются статистически значимыми, например, -4,62% при $p < .0001$.

Пример 14: Клонирование и экспрессия рекомбинантного человеческого ОВ

Полипептидный аналог

Этот пример обеспечивает композиции и способы получения аналога рекомбинантного человеческого варианта полипептида ОВ.

Человеческий вариант ДНК ОВ конструировали из мышинных ОВ ДНК, как в примере 13 выше, путем замены области между сайтами MluI и BamI дуплексной ДНК (изготовленной из синтетических олигонуклеотидов), в которой были разработаны 20 кодонов. Кодоны для аргинина в зрелом положении 35 мыши и лейцина в зрелом положении 74 мыши были неизменными. Участок MluI показан под сплошной линией в последовательности ниже. Эту ДНК помещали в вектор pCFM 1656 (номер доступа ATCC 69576) таким же образом, как и рекомбинантный мышинный белок, как описано выше.

Рекомбинантная человеческая МЕТ (двухцепочечная) ДНК и аминокислотная последовательность (SEQ. ID. NOS: 96 и 97)

```

CATATGGTACCGATCCAGAAAGTTTCAGGACGACACCAAAACCTTAATTAAAACGATCGTT
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
GTATACCATGGCTAGGTCCTTTCAAGTCCTGCTGTGGTTTTGGAATTAATTTTGCTAGCAA
M V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V -
ACGCGTATCAACGACATCAGTCAACCCAGTCGGTGAGCTCTAAACAGCGTGTTACAGGC
61  -----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGCGCATAGTTGCTGTAGTCAGTGTGGGTCAGCCACTCGAGATTTGTGCGACAATGTCCG
T R I N D I S H T Q S V S S K Q R V T G -
CTGGACTTCATCCCGGGTCTGCACCCGATCCTGACCTTGTTCCAAAATGGACCAGACCCTG
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
GACCTGAAGTAGGGCCAGACGTGGGCTAGGACTGGAACAGGTTTTACCTGGTCTGGGAC
L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L -
GCTGTATACCAGCAGATCTTAACCTCCATGCCGTCCCGTAACGTTCTTCAGATCTCTAAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
CGACATATGGTCTGTAGAAATTGGAGGTACGGCAGGGCATGTGCAAGAAGTCTAGAGATTG
A V Y Q Q I L T S M P S R N V L Q I S N -
GACCTCGAGAACCTTCGCGACCTGCTGCACGTGCTGGCATTCTCCAAATCCTGCCACCTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
CTGGAGCTCTTGAAGCGCTGGACGACGTGCACGACCGTAAGAGGTTTAGGACGGTGGAC
D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L -
CCATGGGCTTCAGGTCTTGAGACTCTGGAAGTCTCTGGGCGGGGTCCTGGAAGCATCCGGT
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
GGTACCCGAAGTCCAGAACTCTGAGACCTGAGAGACCCGCCCCAGGACCTTCGTAGGCCA
P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G -
TACAGCACCGAAGTTGTTGCTCTGTCCCGTCTGCAGGGTTCCTTCAGGACATGCTTTGG
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
ATGTCGTGGCTTCAACAACGAGACAGGGCAGACGTCCCAAGGGAAGTCTGTACGAAACC
Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W -
CAGCTGGACCTGTCTCCGGGTTGTTAATGGATCC
421 -----+-----+-----+-----+ 454
GTCGACCTGGACAGAGGCCCAACAATTACCTAGG
Q L D L S P G C *
```

Брожение

Ферментацию вышеуказанных клеток-хозяев с получением рекомбинантного полипептида ОВ человека осуществляли с использованием условий и композиций, как описано выше для рекомбинантного мышинового материала. Результаты анализировали на выход (граммы/литр), предварительную очистку рекомбинантного человеческого ОВ-материала (и незначительные количества бактериального белка) и коррелировали с анализом бактериальной экспрессии:

Сокращения: Ind. + часов означает часы после индукции экспрессии белка, как описано в Примере 13 для рекомбинантного мышинового материала с использованием pCFM 1656

OD: оптическая плотность, измеренная спектрометром-фотометром миллиграммами на единицу OD на литр мг/OD • L: экспрессия в пересчете на мг белка на единицу OD на литр.

Очистка рекомбинантного человеческого об полипептида

Рекомбинантный белок человека может быть очищен с использованием способов, аналогичных используемым для очистки рекомбинантного мышинового белка, как в примере 13, приведенном выше. Для получения рекомбинантного полипептида ОВ человека стадию 8 проводили путем регулирования pH надосадочной жидкости со стадии 7 до pH 5,0 и загрузки ее на колонку с быстрым течением сефарозы CM. Градиент объемной соли 20 колонки проводили при 20 mM NAOAC, pH 5,5, 0M до 0,5 M NaCl. Стадию 9 проводили путем разбавления пула CM Sepharose в четыре раза водой и доведения pH до 7,5. Эту смесь получали до 0,7 M сульфата аммония. Градиент обратного солевого раствора в двадцать колонке проводили при 5 mM NaOac, pH 5,5, 0,2 M до 0M сульфата аммония. В противном случае вышеуказанные стадии были идентичными.

Пример 15: Исследования ответа на дозу

Дополнительное исследование показало, что существует доза ответа на непрерывное введение белка ОВ. В этом исследовании мышам дикого типа (не страдающих ожирением, CD-1 мышам, массой 35-40 г) вводили рекомбинантный белок ОВ мыши, используя способы, аналогичные Примерам 12 и 13. Результаты представляли собой (с % по массе тела, утраченной по сравнению с исходным уровнем, измеренным, как указано выше):

Table 10: Dose Response With Continuous Administration

DOSE	TIME	% REDUCTION IN BODY WEIGHT
0.03 mg/kg/day	Day 2	3.5%
1 mg/kg/day	Day 2	7.5%
1 mg/kg/day	Day 4	14%

Как можно видеть, увеличение дозы от 0,03 мг/кг/день до 1 мг/кг/день увеличивает потерю массы от 3,5% до 7,5%. Следует также отметить, что в день 14 дозировка 1 мг/кг/день привела к снижению массы тела на 14%.

Пример 16: Влияние лептина на состав тела мышей ob/ob

Мышей C57b1/6J ob/ob 16 недель обрабатывали 5 мкг/г/день мышинового лептина, носителя или не получали лечение в течение 33 дней. Во втором эксперименте мышей ob/ob в возрасте 7 недель обрабатывали 10 мкг/г/день лептина человека, лептина мыши или носителя в течение 12

дней. Мышей умерщвляли и оценивали общую массу тела, состав тела, уровни инсулина и уровни глюкозы. Данные из этих экспериментов представлены в таблице 11.

Table 11
Body Weight, Composition, Insulin Levels, and Glucose Levels of Treated Mice

Treatment Group	16 Week Old Mice, 5 µg/g/day leptin			7 Week Old Mice, 10 µg/g/day leptin		
Treatment	Murine leptin	Vehicle	Control	Human Leptin	Murine Leptin	Vehicle
Total Body Weight	31.90±2.8	64.10±4.5	67.50±6.2	31.00±1.3	33.40±2.4	42.70±1.5
Fat	Total(g)	9.10±1.7	38.30±4.0			
	%	28.40±3.4	59.70±2.1			
Lean Mass	Total (g)	6.80±1.0	7.60±0.4			
	%	21.30±1.7	11.90±1.2			
Water	Total (g)	16.00±0.8	18.20±0.7			
	%	50.30±4.2	28.40±1.0			
Insulin (UIU/ml)	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	21.4
Glucose (mg/dl)	170.0±20.9	337±30.3	317.5±51.0	258.3±26.8	320.0±44.0	789.0±152.1

Данные состава тела демонстрируют влияние лептина на три отделения тела: жировую массу, бедную массу тела и массу воды. Дата указывает на то, что лептин значительно снижает жировую массу тела и оказывает незначительное влияние на бедную массу тела. Однако эффекты на бедную массу тела не были статистически значимыми.

Сравнение уровней инсулина и глюкозы в обработанных и контрольных (необработанных) мышах лептина указывает на то, что лептин снижает уровень сахара и инсулина в крови и, таким образом, уменьшает эти показатели диабета.

Пример 17: Высокие дозовые эффекты лептина на мышах дикого типа

Регуляторы наклона у мышей ob/ob (C57b1/6J + /?) инъекцировали один раз в день ip с 10 мкг/г мышинного лептина или транспортного средства (PBS), и массу тела и потребление пищи измеряли в течение следующих двух недель. Наблюдалось значительное снижение массы тела с 4-го дня и значительное снижение потребления пищи в течение первой недели. Однако через одну неделю уровни приема пищи стали неотличимы между обеими группами мышей. Животных умерщвляли в конце двух недель и определяли состав тела. Результаты анализа состава тела показаны в Таблице 12. Данные показывают снижение содержания жира в организме животных, получающих лептин, по сравнению с животными, получающими PBS.

Table 12

Body Composition and Weight of Wildtype (+/?) Mice

GROUP	C57B1/6J	BODY WT	FAT Total	%	LEAN BODY MASS Total	%	WATER Total	%
Protein	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	69.80 %
	Avg. Std. Dev.	17.3 1.6	0.93 0.90	5.04 % 4.52 %	4.87 0.30	27.79 % 1.05 %	11.62 0.74	67.43 % 3.52 %
Vehicle	11	18.8	1.30	6.93 %	5.00	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	63.08 %
	Avg. Std. Dev.	18.7 1.1	2.28 1.07	12.09 % 5.08 %	4.75 0.20	25.54 % 1.10 %	11.66 0.72	62.45 % 3.83 %

Второй эксперимент показал эффекты дважды в день ip-инъекций 12,5 мкг/г мышинового лептина на мышах C57b1/6J дикого типа. Наблюдалось значительное снижение массы тела и ассоциата пищевых продуктов с двумя ежедневными инъекциями полипептида. Для этого эксперимента животных помещали в метаболические камеры. Пищевой продукт состоял из порошкообразного рациона Purina # 5001. Этот рацион отличался от более ранних экспериментов, которые использовали диету, состоящую из диеты, тапиоки и воды. Таким образом, пищевой продукт, используемый в метаболических камерах, имел более высокую калорийность, что объясняет, почему количество потребляемой пищи отличается от тех животных на водосодержащей диете.

Ниже приведен перечень ссылок, связанных с приведенным выше раскрытием и, в частности, с экспериментальными процедурами и обсуждением.

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-associated Robertsonian chromosome (1991).

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

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, Трюк ed. Philadelphia, WB Saunders Co. (1980).

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 -101.1, Simopoulos and Childs eds. S Karger, Basel (1990).

Siegel et al. Cytogenet. Клетка Genet. , 61(3): 184-185(1992).

Настоящее изобретение может быть воплощено в других формах или осуществлено другими способами без отступления от его сущности или существенных характеристик. Таким образом, настоящее изобретение следует рассматривать как во всех отношениях иллюстративные, а не ограничивающие, объем изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения, и все изменения, которые находятся в пределах значения и диапазона эквивалентности, предназначены для охвата в них.

В настоящем описании приведены различные ссылки, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Изобретение, как заявлено, обеспечивается в соответствии с приведенным выше описанием и легко доступными эталонами и исходными материалами. Тем не менее, Заявителями 9, 1995, были сделаны следующие отложения с Американской коллекции типовых культур, 12301 Parkgasон Drive, Rockville, MD, 20852 -1178, США в соответствии с правилами Будапештского договора о Международном распознавании депонирования микроорганизмов для целей Патентной Процедуры: Плазмидная плазида рЕТН14 E coli H14, номер доступа 69880; и штамм E coli M9, содержащий плазмиду рЕТМ9, номер доступа 69879.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: THE ROCKEFELLER UNIVERSITY
- (ii) TITLE OF INVENTION: MODULATORS OF BODY WEIGHT, CORRESPONDING NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, AND DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USES THEREOF
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 99
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
 - (A) ADDRESSEE: Klauber & Jackson
 - (B) STREET: 411 Hackensack Avenue
 - (C) CITY: Hackensack
 - (D) STATE: New Jersey
 - (E) COUNTRY: USA
 - (F) ZIP: 07601
- (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
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER:
 - (B) FILING DATE:
 - (C) CLASSIFICATION:
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER: 08/483,211
 - (B) FILING DATE: June 7, 1995
 - (C) CLASSIFICATION:
- (viii) PRIOR APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER: 08/438,431
 - (B) FILING DATE: May 10, 1995
 - (C) CLASSIFICATION:
- (ix) PRIOR APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER: 08/347,563
 - (B) FILING DATE: November 30, 1994
 - (C) CLASSIFICATION:
- (x) PRIOR APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER: 08/292,345
 - (B) FILING DATE: August 17, 1994
 - (C) CLASSIFICATION:
- (xi) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
 - (A) NAME: Jackson Esq., David A.
 - (B) REGISTRATION NUMBER: 26,742

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 600-1-087 PCT

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

- (A) DESCRIPTION: Murine ob cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Murine

(ix) FEATURE:

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

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

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	
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	
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	
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	
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	

ATCATGTAGA	GGGAAGAAAC	CTTGGCTTCC	AGGGGTCTTC	AGGAGAAGAG	AGCCATGTGC	648
ACACATCCAT	CATTCAATTC	TCTCCCTCCT	GTAGACCACC	CATCCAAAGG	CATGACTCCA	708
CAATGCTTGA	CTCAAGTTAT	CCACACAAC	TCATGAGCAC	AAGGAGGGGC	CAGCCTGCAG	768
AGGGGACTCT	CACCTAGTTC	TTCAGCAAGT	AGAGATAAGA	GCCATCCCAT	CCCCTCCATG	828
TCCCACCTGC	TCCGGGTACA	TGTTCCCTCCG	TGGGTACACG	CTTCGCTGCG	GCCCAGGAGA	888
GGTGAGGTAG	GGATGGGTAG	AGCCTTTGGG	CTGTCTCAGA	GTCTTTGGGA	GCACCGTGAA	948
GGCTGCATCC	ACACACAGCT	GGAAACTCCC	AAGCAGCACA	CGATGGAAGC	ACTTATTTAT	1008
TTATTCTGCA	TTCTATTTTG	GATGGATCTG	AAGCAAGGCA	TCAGCTTTTT	CAGGCTTTGG	1068
GGGTGAGCCA	GGATGAGGAA	GGCTCCTGGG	GTGCTGCTTT	CAATCCTATT	GATGGGTCTG	1128
CCCAGGCAA	ACCTAATTTT	TGAGTGACTG	GAAGGAAGGT	TGGGATCTTC	CAAACAAGAG	1188
TCTATGCAGG	TAGCGCTCAA	GATTGACCTC	TGGTGACTGG	TTTTGTCTCT	ATTGTGACTG	1248
ACTCTATCCA	AACACGTTTG	CAGCGGCATT	GCCGGGAGCA	TAGGCTAGGT	TATTATCAAA	1308
AGCAGATGAA	TTTTGTCAAG	TGTAATATGT	ATCTATGTGC	ACCTGAGGGT	AGAGGATGTG	1368
TTAGAGGGAG	GGTGAAGGAT	CCGGAAGTGT	TCTCTGAATT	ACATATGTGT	GGTAGGCTTT	1428
TCTGAAAGGG	TGAGGCATTT	TCTTACCTCT	GTGGCCACAT	AGTGTGGCTT	TGTGAAAAGG	1488
ACAAAGGAGT	TGACTCTTTC	CGGAACATTT	GGAGTGTACC	AGGCACCCCT	GGAGGGGCTA	1548
AAGCTACAGG	CCTTTTGTGT	GCATATTGCT	GAGCTCAGGG	AGTGAGGGCC	CCACATTTGA	1608
GACAGTGAGC	CCCAAGAAAA	GGGTCCCTGG	TGTAGATCTC	CAAGGTTGTC	CAGGGTTGAT	1668
CTCACAATGC	GTTTCTTAAG	CAGGTAGACG	TTTGCATGCC	AATATGTGGT	TCTCATCTGA	1728
TTGGTTTCATC	CAAAGTAGAA	CCCTGTCTCC	CACCCATTCT	GTGGGGAGTT	TTGTTCCAGT	1788
GGGAATGAGA	AATCACTTAG	CAGATGGTCC	TGAGCCCTGG	GCCAGCACTG	CTGAGGAAGT	1848
GCCAGGGCCC	CAGGCCAGGC	TGCCAGAATT	GCCCTTCGGG	CTGGAGGATG	AACAAAGGGG	1908
CTTGGGTTTT	TCCATCACCC	CTGCACCCTA	TGTCACCATC	AACTGGGGG	GCAGATCAGT	1968
GAGAGGACAC	TTGATGGAAA	GCAATACACT	TTAAGACTGA	GCACAGTTTC	GTGCTCAGCT	2028
CTGTCTGGTG	CTGTGAGCTA	GAGAAGCTCA	CCACATACAT	ATAAAAATCA	GAGGCTCATG	2088
TCCCTGTGGT	TAGACCCTAC	TCGCGGCGGT	GTACTCCACC	ACAGCAGCAC	CGCACCGCTG	2148
GAAGTACAGT	GCTGTCTTCA	ACAGGTGTGA	AAGAACCTGA	GCTGAGGGTG	ACAGTGCCCA	2208
GGGGAACCCCT	GCTTGCACTC	TATTGCATTT	ACATACCGCA	TTTCAGGGCA	CATTAGCATC	2268
CACTCCTATG	GTAGCACACT	GTTGACAATA	GGACAAGGGA	TAGGGGTTGA	CTATCCCTTA	2328
TCCAAAATGC	TTGGGACTAG	AAGAGTTTTG	GATTTTAGAG	TCTTTTCAGG	CATAGGTATA	2388
TTTGAGTATA	TATAAAATGA	GATATCTTGG	GGATGGGGCC	CAAGTATAAA	CATGAAGTTC	2448
ATTTATATTT	CATAATACCG	TATAGACACT	GCTTGAAGTG	TAGTTTATA	CAGTGTTTTA	2508
AATAACGTTG	TATGCATGAA	AGACGTTTTT	ACAGCATGAA	CCTGTCTACT	CATGCCAGCA	2568
CTCAAAAACC	TTGGGGTTTT	GGAGCAGTTT	GGATCTTGGG	TTTTCTGTTA	AGAGATGGTT	2628
AGCTTATACC	TAAAACCATA	ATGGCAAACA	GGCTGCAGGA	CCAGACTGGA	TCCTCAGCCC	2688
TGAAGTGTGC	CCTTCCAGCC	AGGTCATACC	CTGTGGAGGT	GAGCGGGATC	AGGTTTTGTG	2748
GTGCTAAGAG	AGGAGTTGGA	GGTAGATTTT	GGAGGATCTG	AGGGC		2793

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 168 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

- (A) DESCRIPTION: Murine ob polypeptide

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 700 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

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

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Human

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

NNNGNNGTTG CAAGGCCCAA GAAGCCCAANN NTCCTGGGAA GGAAA ATG CAT TGG	54
Met His Trp	
1	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
AGC CCT GGG TGC TGAGGCCTT GAAGGTCACT CTTCTGCAA GGACTNACGT	585
Ser Pro Gly Cys	
165	
TAAGGGAAGG AACTCTGGTT TCCAGGTATC TCCAGGATTG AAGAGCATTG CATGGACACC	645
CCTTATCCAG GACTCTGTCA ATTTCCCTGA CTCCTCTAAG CCACTCTTCC AAAGG	700

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 167 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
 - (A) DESCRIPTION: Human ob polypeptide
- (vi) ORIGINAL SOURCE: Human

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 166 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
 - (A) DESCRIPTION: Murine ob polypeptide lacking Gln at position 49
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Murine

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 167 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

- (A) Description: Human ob polypeptide lacking Gln at position 49

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Human

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

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1 5 10 15
Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
20 25 30
Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
35 40 45
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
65 70 75 80
Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile
85 90 95
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
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
145 150 155 160
Asp Leu Ser Pro Gly Cys
165

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 175 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: double
 - (D) TOPOLOGY: linear

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

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

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

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
 - (A) PCR 5' primer for exon 2G7

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

CCAGGGCAGG AAAATGTG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

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

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
 - (A) PCR 3' primer for exon 2G7

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

GTGCAAGAAG AAGAAGATCC CAGGGCAGGA AAATGTGCTG GAGACCCCTG TGTCGGGTCC	60
NGTGGNTTTG GTCCTATCTG TCTTATGTNC AAGCAGTGCC TATCCAGAAA GTCCAGGATG	120
ACACCAAAAG CCTCATCAAG ACCATTGTCA NCAGGATCAC TGANATTTC CACACG	175

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 23 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (A) DESCRIPTION: putative N-terminal signal peptide

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

```
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
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 287 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: circular

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (plasmid)

- (A) DESCRIPTION: pET-15b expression vector

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: T7 promoter
- (B) LOCATION: 20..37

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: lac operator
- (B) LOCATION: 39..64

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 108..243

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: His-Tag
- (B) LOCATION: 123..137

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Thrombin cleavage site
- (B) LOCATION: 184..196

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

```
AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG CGGATAACAA      60
TTCCCCTCTA CAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACC ATG GGC AGC      116
                                     Met Gly Ser
                                     1
AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC      164
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
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
AAACGGGTCT TGAGGGGTTT TTG      287
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 45 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

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

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

CTTATGTTCA TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

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

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

TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

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

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 16 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 - (A) DESCRIPTION: ob peptide fragment
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Murine

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

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

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

(v) FRAGMENT TYPE: internal

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

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

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 19 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 - (A) DESCRIPTION: ob peptide fragment
- (v) FRAGMENT TYPE: internal

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

Arg Gly Ser His Met Leu Glu Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys
20 25 30

Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln
35 40

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: Human 3' primer

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: Yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

TTCCTTCCCA TATGGTACTC CTTGCAGGAA GA

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 11 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(A) DESCRIPTION: Splice acceptor site in ob

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Splice acceptor site

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

AGCAGTCGGT A

11

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: Human 3' primer

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: Yes

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

TTCCTTCCCA TATGGTACTC CTTGCAGGAA GA

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 11 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(A) DESCRIPTION: Splice acceptor site in ob

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Splice acceptor site

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

AGCAGTCGGT A

11

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 16 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (A) DESCRIPTION: ob peptide fragment

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Murine

(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	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 15 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (A) DESCRIPTION: ob peptide fragment

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Murine

(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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 19 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (A) DESCRIPTION: ob peptide fragment

(v) FRAGMENT TYPE: internal

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

(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		

Ser Leu Asp

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

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

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

(v) FRAGMENT TYPE: Carboxyl terminal

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

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

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

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(A) DESCRIPTION: portion of the human ob gene including noncoding sequence upstream of first exon, coding sequence of first exon, and 5' region of first intron

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 38..181
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: 5' region of first intron
 (B) LOCATION: 182..414
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: 5' noncoding sequence of the human ob gene from which the HOB 1gF DNA primer was generated
 (B) LOCATION: 11..28
- (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:

GGTTGCAAGG CCAAGAAGC CCATCCTGGG AAGGAAA ATG CAT TGG GGA ACC CTG	55
Met His Trp Gly Thr Leu	
1 5	
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	
10 15 20	
CCC ATC CAA AAA GTC CAA GAT GAC ACC AAA ACC CTC ATC AAG ACA ATT	151
Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile	
25 30 35	
GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG GTAAGGAGAG TATGCGGGGA	201
Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr	
40 45	
CAAAGTAGAA CTGCAGCCAG CCCAGCACTG GCTCCTAGTG GCACTGGACC CAGATAGTCC	261
AAGAACATT TATTGAACGC CTCCTGAATG CCAGGCACCT ACTGGAAGCT GAGAAGGATT	321
TTGGATAGCA CAGGGCTCCA CTCTTTCTGG TTGTTTCTTN TGGCCCCCTC TGCCTGCTGA	381
GATNCCAGGG GTTAGNGGTT CTTAATTCCT AAA	414

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 48 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
 (A) DESCRIPTION: N-terminal portion of the human ob protein encoded by first exon

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 801 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: double
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
 - (A) DESCRIPTION: portion of the human ob gene including 3' region of first intron, coding sequence of second exon, and 3' noncoding sequence
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Human
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: CDS
 - (B) LOCATION: 291..648
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: 3' of first intron
 - (B) LOCATION: 1..290
- (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
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: 3' noncoding sequence of the human ob gene from which the HOB 2gR DNA primer was generated
 - (B) LOCATION: 707..728

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

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

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

CTGGTTCTTT CAGGAAGAGG CCATGTAAGA GAAAGGAATT GACCTAGGGA AAATTGGCCT	60
GGGAAGTGGG GGGAAACGGAT GGTGTGGGAA AAGCAGGAAT CTCGGAGACC AGCTTAGAGG	120
CTTGGCAGTC ACCTGGGTGC AGGANACAAG GGCCTGAGCC AAAGTGGTGA GGGAGGGTGG	180
AAGGAGACAG CCCAGAGAAT GACCCTCCAT GCCCACGGGG AAGGCAGAGG GCTCTGAGAG	240
CGATTCTCTC CACATGCTGA GCACTTGTTT TCCCTCTTCC TCCTNCATAG CAG TCA	296
	Gln Ser
	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	
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	
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	
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 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	
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	
CTG AGC AGG CTG CAG GGG TCT CTG CAG GAC ATG CTG TGG CAG CTG GAC	632
Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp	
100 105 110	
CTC AGC CCT GGG TGC T GAGGCCTTGA AGGTCACTCT TCCTGCAAGG ACTACGTTAA	688
Leu Ser Pro Gly Cys	
115	
GGGAAGGAAC TCTGGCTTTC CAGGTATCTC CAGGATTGAA GAGCAATTGCA TGGACACCCC	748
TTATCCAGGA CTCTGTCAAT TTCCCTGACT CCTCTAAGCC ACTCTTCCAA AGG	801

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(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:

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
 1 5 10 15
 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
 Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala
 50 55 60
 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
 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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 8 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: pichia yeast

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 4 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: pichia yeast
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 4 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: Internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: pichia yeast

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

Leu Glu Lys Arg

1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 22 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
 - (A) DESCRIPTION: HOB 2gR DNA primer generated from the 3' noncoding sequence of the human ob gene
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: YES
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

CTTCAATCCT GGAGATACCT GG

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (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
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:

CTCGAGAAAA GAGAGGCTGA AGCTTACGTA GAATTCCTTA GGCCGGCCGG G

51

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 40 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
 - (A) PCR 5' primer for amplifying human ob cDNA sequence
- (iii) HYPOTHETICAL: NO

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 22 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
 - (A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS494
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:42:

TTATATTCAC TTTTCCCCTC TC

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 20 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
 - (A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS883
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:43:

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44:

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

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCCATCCAA AAAGTCCAAG

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

- (A) PCR 3' primer for amplifying human ob cDNA sequence

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: YES

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

GCGCGAATTC TCAGCACCCA GGGCTGAGGT C

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

- (A) PCR 5' primer for amplifying murine ob cDNA sequence

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCTATCCAG AAAGTCCAGG

40

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS883

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:

GTGCAGCTTT AATTGTGAGC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:45:

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

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2359

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

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

AGTGTTGTGT TTCTCCTG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:46:

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

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2359

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

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

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:60:

CTTCATTAG TGTCTTATAG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:61:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 18 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2588

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:61:

ATCACTACAC ACCTAATC

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:62:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 18 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)

(A) DESCRIPTION: sequence tagged-site specific PCR primer sWSS2588

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:62:

CCATTCTACA TTTCCACC

18

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
 - (A) DESCRIPTION: Marker AFMa065zg9
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:79:

AGCTTCAAGA CTTTnAGCCT

20

(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
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (primer)
 - (A) DESCRIPTION: Marker AFMa065zg9
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Human
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:80:

GGTCAGCAGC ACTGTGATT

19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:81:

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

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	
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	
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	
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	
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	
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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:95:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 146 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

- (A) DESCRIPTION: Recombinant murine met ob protein

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

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

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

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

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

Pro Glu Cys
145

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:96:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 454 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: double
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA
 - (A) DESCRIPTION: Recombinant human met ob
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: human
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: CDS
 - (B) LOCATION: 4..444

CCG ATC CTG ACC TTG TCC AAA ATG GAC CAG ACC CTG GCT GTA TAC CAG Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln 50 55 60	192
CAG ATC TTA ACC TCC ATG CCG TCC CGT AAC GTT CTT CAG ATC TCT AAC Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Leu Gln Ile Ser Asn 65 70 75	240
GAC CTC GAG AAC CTT CGC GAC CTG CTG CAC GTG CTG GCA TTC TCC AAA Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys 80 85 90 95	288
TCC TGC CAC CTG CCA TGG GCT TCA GGT CTT GAG ACT CTG GAC TCT CTG Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu 100 105 110	336
GGC GGG GTC CTG GAA GCA TCC GGT TAC AGC ACC GAA GTT GTT GCT CTG Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu 115 120 125	384
TCC CGT CTG CAG GGT TCC CTT CAG GAC ATG CTT TGG CAG CTG GAC CTG Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu 130 135 140	432
TCT CCG GGT TGT TAATGGATCC Ser Pro Gly Cys 145	454

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:97:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: protein

- (A) DESCRIPTION: Recombinant human met ob protein

(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

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
          85             90             95
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
Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
          130            135            140
Pro Gly Cys
145
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:98:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal His-tag

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

```
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
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:99:

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

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal His-tag

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:99:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:99:

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

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal His-tag

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:99:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:99:

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

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal His-tag

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:99:

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

Arg Gly Ser Pro
20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид ожирения (ОВ), имеющий от 145 до 167 аминокислот, способный модулировать массу тела животного, или аллельные варианты или аналоги, включая их фрагменты, обладающие одинаковой биологической активностью.

2. Полипептид ОВ по п.1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4, 5 или 6, или аллельные варианты или аналоги, включая их фрагменты.

3. Иммуногенный фрагмент полипептида ОВ по п. 1 или 2.

4. Иммуногенный фрагмент полипептида ОВ, выбранный из группы, состоящей из:

Val-Pro-I e-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); и

Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys (SEQ ID NO: 21).

5. Аналог полипептида ОВ человека по п.2, в котором одна или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислот 53,56,71, 85,

89,92,95, 98,110,118, 121,122,126, 127,128,129, 132,139,157, 159, 163 и 166 (в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 4) замещено другой аминокислотой.

6. Аналог полипептида ОВ человека по п.5, отличающийся тем, что замещение представляет собой дивергентную аминокислоту полипептида ОВ мыши, представленную в SEQ ID NO: 2.

7. Аналог полипептида ОВ человека по п.5, отличающийся тем, что замещение представляет собой аланин.

8. Аналог полипептида ОВ человека по п.5, выбранный из группы, состоящей из полипептидов, в которых:

(а) остаток серина в положении 53 замещен глицином, аланином, валином, цистеином, метионином или треонином;

(b) остаток серина в положении 98 замещен глицином, аланином, валином, цистеином, метионином или треонином; и

(с) остаток аргинина в положении 92 замещен аспарагином, лизином, гистидином, глутамином, глутаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой, серином, треонином, метионином или цистеином.

9. Аналог полипептида ОВ по п.2, имеющий 83% или более гомологии аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью полипептида ОВ человека, представленной в SEQ ID NO: 2, 4, 5 или 6.

10. Аналог полипептида ОВ человека по п.2, выбранный из группы, состоящей из полипептидов, в которых:

(а) один или несколько остатков аспарагиновой кислоты замещены глутаминовой кислотой;

(b) один или более остатков изолейцина замещен лейцином;

(с) один или несколько остатков глицина или валина замещены аланином;

(d) один или несколько остатков аргинина замещены гистидином;

(е) один или более остатков тирозина или фенилаланина замещены триптофаном;

(f) один или несколько остатков с 121 по 128 (в соответствии с нумерацией SEQ ID No: 4) замещены глицином или аланином; и

(g) один или несколько остатков в положениях 54-60 или 118-166 (в соответствии с числом SEQ ID NO: 4) замещены лизином, глутаминовой кислотой, цистеином или пролином.

11. Полипептид ОВ по любому из пп. 1,2,3, 5, 6 или 9, выбранный из группы, состоящей из полипептидов:

(а) с остатками от 1 до 21 делетированной; и

(б) полипептиды подчасти (а), имеющие метин в положении 21, или имеющие последовательность глицин-серин-гистидин-метионин SEQ ID NO: 38 в положениях 18 -21, или имеющие метионин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-глицин-лейцин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-гистидин-метиониновую последовательность (SEQ ID NO: 98) в положениях 1 -21.

12. Полипептид ОВ по любому из пп. 1,2,3, 5, 6 или 9, выбранный из группы, состоящей из полипептидов:

(а) с остатками от 1 до 21 делетированной; и

(б) полипептиды подчасти (а), имеющие последовательность лейцин-глутаминовая кислота-лизин-аргинин-глутаминовая кислота-аланин-глутаминовая кислота-аланин (SEQ ID NO: 26) в положениях

14 -21, или имеющего последовательность глутаминовой кислоты-аланин-глутаминовой кислоты-аланина (SEQ ID NO: 27) в положениях 18-21 или имеющих последовательность лейцин-глутаминовую кислоту-лизин-аргинин (SEQ ID NO: 28) в положениях 18-21 или имеющих последовательность метионин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-глицин-лейцин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-пролин (SEQ ID NO: 99) в положениях 2-21 или имеющих последовательность глицин-серин-пролин в положениях 18 -21.

13. Полипептид ОВ по любому из пп. 7, 8, 9 или 10, выбранный из группы, состоящей из полипептидов:

(а) с остатками от 1 до 21 делетированной; и

(б) полипептиды подчасти (а), имеющие метин в положении 21, или имеющие последовательность глицин-серин-гистидин-метионин (SEQ ID NO: 38) в положениях 18-21 или имеющих метионин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-глицин-лейцин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-гистидин-метиониновую последовательность (SEQ ID NO: 98) в положениях 1-21 или имеющих последовательность лейцин-глутаминовая кислота-лизин-аргинин-глутаминовая кислота-аланин-глутаминовая кислота-аланин (SEQ ID NO: 26) в положениях 14-21 или имеющих последовательность глутаминовой кислоты-аланин-глутаминовой кислоты-аланина (SEQ ID NO: 27) в положениях 18-21 или имеющих последовательность лейцин-глутаминовую кислоту-лизин-аргинин (SEQ ID NO: 28) в положениях 18 -21, или имеющих последовательность метионин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-глицин-лейцин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-пролин (SEQ ID NO:99) в положениях 2-21 или имеющие последовательность глицин-серин-пролин в положениях 18 -21.

14. Усеченный аналог полипептида ОВ человека по п.2, выбранный из группы (в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 4), состоящей из полипептидов, где:

(а) удаляют один или более остатков в положениях 121 -128;

(б) остатки 1-116 удаляют;

(с) остатки 1-21 и 54-167 удаляются;

(d) удаляют остатки 1-60 и 117 -167;

(е) удаляют остатки 1 -60;

(f) делетированы 1 -53;

(g) аналог подчасти (а), в которой остатки 1-21 делетированы; и

(h) аналог подчасти (а)-(g), имеющий N-концевую аминокислотную или аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(1) метионин,

(2) последовательность глицин-серин-гистидин-метионин (SEQ ID NO: 38),

(3) метионин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-серин-глицин-лейцин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-гистидин-метиониновая последовательность (SEQ ID NO: 98),

(4) последовательность лейцин-глутаминовая кислота-лизин-аргинин-глутаминовая кислота-аланин-глутаминовая кислота-аланин (SEQ ID NO: 26),

(5) последовательность глутаминовой кислоты-аланин-глутаминовой кислоты-аланина (SEQ ID NO: 27),

(6) последовательность лейцин-глутаминовая кислота-лизин-аргинин (SEQ ID NO: 28),

(7) серин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-серин-глициново-лейцитин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-пролин последовательность (SEQ ID NO: 99), и

(8) последовательность глицин-серин-пролин.

15. Рекомбинантный полипептид ОВ по любому из пп. 1

16. Химически синтезированный полипептид ОВ по любому из пп. 1 -14.

17. Производное полипептида ОВ по любому из пп. 1 -16, имеющее один или более прикрепленных к нему химических фрагментов.

18. Производное по п.17, в котором химический фрагмент представляет собой водорастворимый полимер.

19. Производное по п.18, в котором водорастворимый полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

20. Производное по п.19, которое является моно -, ди -, три-или тетраэтилированным.

21. Производное по п. 20, которое представляет собой N-концевой моноэтилированный.

22. Производное по п.21, которое представляет собой полипептид ОВ, содержащий аминокислотные остатки 22-167 SEQ ID NO: 4 или остатки с 22 по 166 SEQ ID NO: 6.

23. Производное по п.21, которое представляет собой полипептид ОВ, содержащий аминокислотную последовательность остатков 22-167 SEQ ID NO: 4 или остатки с 22 по 166 SEQ ID NO: 6 и имеющий метионин в положении 21.

24. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид ОВ по любому из пп. 1 -6, 9 или 11.

25. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид ОВ по любому из пп. 7,8,10, 12, 13 или 14.

26. Молекула ДНК для применения в фиксации экспрессии полипептида ОВ, обладающего биологической активностью модулирующего веса тела у млекопитающего, причем ДНК выбрана из группы, состоящей из:

(а) молекулы ДНК, представленные в SEQ ID NO: 1 и 3 или их фрагменты,

(б) молекулы ДНК, которые гибридизуются с молекулами ДНК, определенными в (а) или их гибридизуемых фрагментах; и

(с) молекулы ДНК, которые кодируют экспрессию аминокислотной последовательности, кодируемой любой из вышеуказанных молекул ДНК.

27. Молекула ДНК по п.26, которая представляет собой молекулу геномной ДНК человека SEQ ID NO: 22 и 24.

28. Молекула ДНК по п.24, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, указанных в:

(а) SEQ ID NO: 2;

(б) аминокислоты 22-167 SEQ ID NO: 2;

(с) SEQ ID NO: 4;

(д) аминокислоты 22-167 SEQ ID NO: 4;

(е) SEQ ID NO: 5;

(ф) аминокислоты с 22 по 166 SEQ ID NO: 5;

(г) SEQ ID NO: 6;

(h) аминокислоту с 22 по 166 SEQ ID NO: 6; и

(i) аминокислотные последовательности подчасти (b) (d), (f) или (h), имеющие N-концевую аминокислотную или аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- (1) метионин,
- (2) последовательность глицин-серин-гистидин-метионина (SEQ ID NO: 38) и
- (3) метионин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-серин-глицин-лейцин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-гистидин-метиониновая последовательность (SEQ ID NO: 98).

29. Молекула ДНК по п.28, кодирующая аминокислоту подчасти (b), (d), (f) или (h), имеющую N-концевую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- (1) последовательность лейцин-глутаминовая кислота-лизин-аргинин-глутаминовая кислота-аланин-глутаминовая кислота-аланин (SEQ ID NO: 26),
- (2) последовательность глутаминовой кислоты-аланин-глутаминовой кислоты-аланина (SEQ ID NO: 27),
- (3) последовательность лейцин-глутаминовая кислота-лизин-аргинин (SEQ ID NO: 28),
- (4) последовательность метионин-глицин-серин-серин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-гистидин-серин-глицин-лейцин-валин-пролин-аргинин-глицин-серин-пролин (SEQ ID NO: 99), и
- (5) последовательность глицин-серин-пролин.

30. Молекула ДНК по п.24, содержащая последовательность, представленную в качестве кодирующей белок последовательности SEQ ID NO: 3.

31. Молекула ДНК по п.24, содержащая последовательность, представленную в виде последовательности, кодирующей аминокислоты с 22 по 167 по SEQ ID NO: 3.

32. Детектируемо меченая молекула нуклеиновой кислоты, гибридизуемая с молекулой ДНК по любому из пп. 24 -31.

33. нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся с некодирующей областью нуклеиновой кислоты ОВ, некодирующую область которой выбирают из группы, состоящей из интрона, а 5'некодирующая область и 3'некодирующая область.

34. Олигонуклеотидный праймер для амплификации геномной ДНК человека, кодирующей полипептид ОВ.

35. Олигонуклеотид по п.32, который выбран из группы, состоящей из:

ВАРОЧНАЯ ПАНЕЛЬ 1 gF 5'- CCCAAGAAGCCATCCTG -3' (SEQ ID NO. 29);

ВАРОЧНАЯ ПАНЕЛЬ 1 gR 5'- GACTATCTGGGTCCAGTGCC -3' (SEQ ID NO. 30);

НОВ 2 gF 5'- CCACATGCTGAGCACTTGTT -3' (SEQ ID NO. 31); и

НОВ 2 gR 5'- CTTCAATCCTGGAGATACCTGG -3' (SEQ ID NO. 32).

36. Вектор, который содержит молекулу ДНК по любому из пп. 24 -31.

37. Экспрессионный вектор, который содержит молекулу ДНК по любому из пп. 24, 26, 30 или 31, функционально связанную с последовательностью контроля экспрессии.

38. Вектор экспрессии, который содержит молекулу ДНК по п. 27 или 29, функционально связанную с последовательностью контроля экспрессии.

39. Вектор экспрессии, который содержит молекулу ДНК по п. 25, функционально связанную с последовательностью контроля экспрессии.

40. Одноклеточный хозяин, трансформированный или трансфицированный молекулой ДНК по п. 24 или 25, или вектор экспрессии по любому из пп. 36 -39.

41. Одноклеточный хозяин по п.40, в котором одноклеточный хозяин выбран из группы, состоящей из бактерий, дрожжей, клеток млекопитающих, растительных клеток, клеток насекомых и человеческих клеток в культуре ткани.

42. Одноклеточный хозяин по п.40, в котором одноклеточный хозяин выбран из группы, состоящей из *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, дрожжей, CHO, R1.1, B-W, LM, COS 1, COS 7, Bsc1, Bsc40, Bmt10 и Sf9 клеток.

43. Одноклеточный хозяин по п.40, в котором одноклеточный хозяин является дрожжевым хозяином, выбранным из группы, состоящей из *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* и *Torulopsis*.

44. Клетка млекопитающего, содержащая полипептид ОВ, кодирующий последовательность ДНК и модифицированная *in vitro* для обеспечения более высокой экспрессии полипептида ОВ посредством гомологичного рекомбинационного события, состоящего из вставки регуляторной последовательности экспрессии в функциональной близости к кодирующей последовательности полипептида ОВ.

45. Клетка по п.44, в которой регуляторная последовательность экспрессии представляет собой регуляторную последовательность экспрессии полипептида ОВ, и гомологичное рекомбинационное событие заменяет мутантную регуляторную последовательность экспрессии полипептида ОВ.

46. Клетка по п.45, в которой вставка регуляторной последовательности экспрессии не является регуляторной последовательностью полипептида ОВ.

47. Способ получения полипептида ОВ, включающий:

(а) культивирование клетки по любому из пп. 40-46 в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида ОВ; и

(b) выделение экспрессированного полипептида ОВ.

48. Способ по п.47, в котором клетка представляет собой бактерию или дрожжи.

49. Способ по п.47 или 48, дополнительно включающий:

(с) хроматографирование полипептида ОВ на Ni-хелатирующей колонке; и

(d) очистки полипептида ОВ гель-фильтрацией.

50. Способ по п.49, дополнительно включающий после стадии (с) и перед стадией (d) хроматографирование полипептида ОВ на колонке с сильным катионитом.

51. Антитело, специфичное к полипептиду ОВ по любому из пунктов формулы изобретения от 1 до 16 или получена по способу по пп. 47 -50.

52. Антитело по п.51, которое представляет собой моноклональное или поликлональное антитело.

53. Антитело по п.52, меченное детектируемой меткой.

54. Иммортальная клеточная линия, продуцирующая моноклональное антитело по п. 52.

55. Способ получения антитела, специфичного к полипептиду ОВ, включающий:

(а) конъюгирование полипептида ОВ по любому из пп. 1-16 или полученное по способу по пп. 47-50 с белком-носителем;

(b) иммунизацию животного-хозяина конъюгатом полипептида ОВ с белком-носителем на стадии (а), смешанным с адъювантом; и

(с) получение антитела из иммунизированного животного-хозяина.

56. Способ измерения присутствия полипептида ОВ в образце, включающий:

(а) приведение в контакт образца с подозрением на содержащую полипептид ОВ с антителом, которое специфически связывается с полипептидом ОВ в условиях, которые позволяют формировать реакционные комплексы, содержащие антитело и полипептид ОВ; и

(b) обнаружение образования реакционных комплексов, содержащих антитело и полипептид ОВ в образце, причем обнаружение образования реакционных комплексов указывает на присутствие полипептида ОВ в образце.

57. Способ по п.56, в котором антитело связано с твердой фазой.

58. Способ *in vitro* для оценки уровня полипептида ОВ в биологическом образце, включающий:

(a) детекцию образования реакционных комплексов в биологическом образце в соответствии со способом по п. 56 или 57; и

(b) оценку количества образующихся реакционных комплексов, количество которых соответствует уровню полипептида ОВ в биологическом образце.

59. *In vitro* способ выявления или диагностики наличия заболевания, связанного с повышенным или пониженным содержанием полипептида ОВ у субъекта-млекопитающего, включающий:

(a) оценку уровня ОВ-полипептида в биологическом образце от млекопитающего субъекта по п.58; и

(b) сравнение уровня, обнаруженного на стадии (a), с уровнем ОВ полипептида, присутствующего у нормальных субъектов или у субъекта в более ранний момент времени,

где увеличение уровня полипептида ОВ по сравнению с нормальными уровнями указывает на заболевание, связанное с повышенными уровнями полипептида ОВ, и снижение уровня полипептида ОВ по сравнению с нормальными уровнями указывает на заболевание, связанное с пониженными уровнями полипептида ОВ.

60. *In vitro* способ мониторинга терапевтического лечения заболевания, связанного с повышенными или пониженными уровнями полипептида ОВ у субъекта-млекопитающего, включающий оценку уровней полипептида ОВ в серии биологических образцов, полученных в различные моменты времени от субъекта-млекопитающего, подвергающегося терапевтическому лечению, для заболевания, связанного с повышенными или пониженными уровнями полипептида ОВ, в соответствии со способом по п. 58.

61. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид ОВ по любому из пп. 1-16 или полученный способом по пп. 47-50 и фармацевтически приемлемый носитель.

62. Фармацевтическая композиция по п.61 для снижения массы тела животного.

63. Фармацевтическая композиция для увеличения массы тела животного, содержащая антагонист полипептида ОВ по любому из пп. 1-16 или полученный способом по пп. 47-50 и фармацевтически приемлемый носитель.

64. Фармацевтическая композиция по п.63, где антагонист выбран из группы, состоящей из антитела, которое связывается и нейтрализует активность полипептида ОВ, фрагмента полипептида ОВ, который связывается, но не активирует полипептидный рецептор ОВ, и низкомолекулярного антагониста полипептида ОВ.

65. Косметическая композиция, улучшающая внешний вид тела, для снижения массы тела индивидуума, содержащая полипептид ОВ по любому из пп. 1-16 или полученный способом по пп. 47-50 и приемлемый носитель.

66. Косметическая композиция, улучшающая внешний вид тела, для увеличения массы тела индивидуума, содержащая антагонист полипептида ОВ по любому из пп. 1-16 или полученный способом по пп. 47-50 и приемлемый носитель.

67. Косметическая композиция по п.66, в которой антагонист выбран из группы, состоящей из антитела, которое связывается и нейтрализует активность полипептида ОВ, фрагмента полипептида ОВ, который связывается, но не активирует полипептидный рецептор ОВ, и низкомолекулярного антагониста полипептида ОВ.

68. Косметический способ улучшения внешнего вида тела индивидуума, в котором косметическую композицию по любому из пп. 64-67 вводят индивидууму в количестве, достаточном для модулирования массы тела человека до желаемого уровня.

69. Применение молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты, гибридизующейся с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид ОВ по любому из пп. 1-4 или 9, для изготовления лекарственного средства для модификации массы тела млекопитающего.

70. Применение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид ОВ по любому из пп. 1-16 или полученный способом по пп. 47 -50, для изготовления лекарственного средства для генной терапии для модификации массы тела животного.

71. Применение полипептида ОВ по любому из пп. 1-16 или полученного способом по пп. 47-50 для изготовления лекарственного средства для модификации массы тела животного.

72. Применение полипептида ОВ по любому из пп. 1-16 или полученного способом по пп. 47-50 для изготовления лекарственного средства для модификации массы тела млекопитающего при лечении расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, высокого кровяного давления и высокого холестерина.

73. Применение полипептида ов по любому из пп. 1-16 или полученного способом по пп. 47-50 для изготовления лекарственного средства для модификации массы тела млекопитающего для применения в комбинации с лекарственным средством для лечения диабета, высокого кровяного давления и высокого холестерина.

74. Применение антагониста полипептида ОВ по любому из пп. 1-16 или полученного способом по пп. 47-50 для изготовления лекарственного средства для увеличения массы тела животного.

75. Применение по п.74, где антагонист выбран из группы, состоящей из антитела, которое связывается и нейтрализует активность полипептида ОВ, фрагмента полипептида ОВ, который связывается, но не активирует рецептор ОВ, и низкомолекулярного антагониста полипептида ОВ.

76. Применение по любому из пп. 71-75 для изготовления лекарственного средства для внутривенной, внутриартериальной, внутрибрюшинной, внутримышечной, подкожной, назальной, пероральной или легочной доставки.