

(19)



(10)

LT 4265 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **4265**

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/12**

(21) Paraiškos numeris: **97-020**

C07K 14/47

C12Q 1/68

(22) Paraiškos padavimo data: **1997 02 17**

C12N 5/10

C12N 5/16

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 09 25**

C07K 16/18

G01N 33/53

(45) Patent paskelbimo data: **1997 12 29**

A61K 38/17

A61K 7/00

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/10479**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 08 17**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1997 02 17**

(31, 32, 33) Prioritetas: **292345, 1994 08 17, US**
347563, 1994 11 30, US
438431, 1995 05 10, US
483211, 1995 06 07, US

(72) Išradėjas:

Jeffrey M. Friedman, US

Yiying Zhang, US

(73) Patent savininkas:

**THE ROCKEFELLER UNIVERSITY, 1230 York Avenue, New York,
NY 10021-6399, US**

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

**Kūno svorio modulatoriai, atitinkamos nukleino rūgštys ir baltymai ir jų
panaudojimas diagnostikoje ir terapijoje**

(57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su gyvūnų, įskaitant žinduolius ir žmogų, kūno svorio kontrole, o tiksliau su medžiagomis, kurios čia vadinamos svorio modulatoriais, ir su tokių moduliatorių panaudojimu diagnostikoje ir terapijoje. Platesne prasme, šis išradimas yra susijęs su nukleotidinių sekų ir baltymų, kuriuos gali ekspresuoti tokie nukleotidai arba jų degeneraciniai variantai, kurie gali dalyvauti žinduolių kūno svorio kontrolėje, išaiškinimu ir atradimu. Šio išradimo nukleotidinės sekos atstovauja genus, atitinkančius pelės ir žmogaus OB geną, kurie, kaip buvo postuliuota, vaidina esminį vaidmenį kūno svorio ir nutukimo reguliavime. Čia pateikti preliminarūs duomenys leidžia manyti, kad aptariamo geno polipeptidinis produktas funkcionuoja

kaip hormonas. Šiame išradime taip pat pateikiamos nukleino rūgšties molekulės, skirtos naudoti kaip molekuliniai zondai arba kaip polimerazinės grandininės reakcijos (PRC) amplifikacijos pradmenys, t. y. sintetiniai arba gamtiniai oligonukleotidai. Dar kita prasme šiame išradime pateikiamas klonavimo vektorius, kuris apima šio išradimo nukleino rūgštis; ir bakterijų, vabzdžių arba žinduolių ekspresijos vektorius, kuris apima šio išradimo nukleino rūgštis, veiksmingai sujungtas su ekspresijos kontroline seka. Tokiu būdu, šis išradimas susijęs ir su bakterijų arba žinduolių ląstelėmis, transfekuotomis arba transformuotomis atitinkamu ekspresijos vektoriumi, ir atitinkamai su aukščiau minėtų darinių panaudojimu išradimo modulatoriams gauti. Taip pat pateikiami antikūnai prieš OB polipeptidą. Be to, duodamas žinduolių kūno svorio moduliavimo būdas. Specifiniuose pavyzdžiuose pateikiami genai, koduojantys dvi pelės ir žmogaus OB polipeptidų izoformas.

Šis išradimas iš esmės yra susijęs su žinduolių, įskaitant gyvulius ir žmones, kūno svorio kontrole, tiksliau - su medžiagomis, čia identifikuojamomis kaip svorio modulatoriai, ir su tokių moduliatorių panaudojimu diagnostikoje ir terapijoje.

Išradimo prielaidos

Nutukimas, apibrėžiamas kaip kūno riebalų perteklius, lyginant su neriebaline kūno mase, yra surištas su svarbiomis fiziologinėmis ir medicininėmis patologijomis, tarp pastarųjų yra hipertenzija, padidintas lipidų kiekis kraujyje ir II tipo arba nesusijęs su insulinu cukrinis diabetas (NIDDM). JAV yra 6-10 milijonų žmonių, sergančių NIDDM, jų tarpe 18% yra 65 metų amžiaus [Harris *et al.*, *Int. J. Obes.*, 11:275-283 (1987)]. Apie 45% vyrų ir 70% moterų, sergančių NIDDM, yra nutukę, ir jų diabetas pastebimai sumažėja arba išnyksta, sumažinus kūno svorį [Harris, *Diabetes Care*, 14(3):639-648 (1991)]. Kaip aprašyta žemiau, tiek nutukimas, tiek NIDDM žymia dalimi yra paveldimi, nors polinkio genai nebuvo identifikuoti. Tokių sutrikimų, susijusių su metabolizmu, molekulinės genetikos pagrindas yra svarbi, mažai tyrinėta problema.

Maisto energijos asimiliacija, laikymas ir sunaudojimas sudaro sudėtingą homeostatinę sistemą, kuri yra svarbiausia daugialąsčių gyvūnų išgyvenimui. Ant žemės gyvenančių žinduolių atveju, didelio kiekio metabolinio "kuro", tokio kaip trigliceridai, atsargų sukaupimas riebaliniuose audiniuose yra labai svarbus, išgyvenant maisto trūkumo periodus. Poreikis išlaikyti fiksuotą energijos atsargų lygį, nesikeičiant organizmo dydžiui ir formai, reikalauja, kad būtų pasiekiamas balansas tarp energijos gavimo ir sunaudojimo. Tačiau molekuliniai mechanizmai, reguliuojantys energetinį balansą, vis dar reikalauja išaiškinimo. Molekulių, kurios perduoda maitinimo informaciją ir kontroliuoja energijos balansą, išskyrimas būtų posūkio taškas, norint suprasti kūno svorio reguliavimą sveikame ir sergančiame organizme.

Individualūs nutukimo lygiai didžiąja dalimi yra apspręsti genetiškai. Kūno svorio atitikimo proporcijų ir nutukimo tyrimai tarp mono- ir dizigotinių dvynių arba įsūnių ir jų

fiziologinių tėvų duoda pagrindą manyti, kad nutukimo paveldimumas (0,4-0,8) viršija daugumą kitų požymių, kurie, kaip paprastai laikoma, turi esminį genetinį komponentą, tokių kaip šizofrenija, alkoholizmas ir aterosklerozė [Stunkard *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 322:1483-1487 (1990)]. Taip pat buvo aprašyti šeimyniniai panašumai energijos sunaudojimo greičiuose [Bogardus *et al.*, *Diabetes*, 35:1-5 (1986)]. Geografiškai apribotų populiacijų genetinė analizė duoda pagrindo manyti, kad palyginus nedidelis skaičius genų gali paaiškinti 30-50% kūno sudėties nukrypimų [Moll *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 49:1243-1255 (1991)]. Tačiau, bendroje populiacijoje nebuvo genetiškai nustatytas nei vienas apibrėžtoje chromosominėje padėtyje esantis genas, atsakingas už nutukimą.

Grauzikų nutukimo modeliai apima tur būt septynias viengenines mutacijas. Labiausiai tirtos pelių nutukimo mutacijos yra *ob* (nutukimo) ir *db* (diabeto) genai. Kai jie yra ant to pačio genetinio kamieno fono, *ob* ir *db* duoda neatskiriamus metabolinius ir elgsenos fenotipus, kas leidžia manyti, kad šie genai gali funkcionuoti tuo pačiu fiziologiniu keliu [Coleman *et al.*, *Diabetologia*, 14:141-148 (1978)]. Pelės, homozigotinės bet kuriai mutacijai, yra hiperfaginės ir hipometabolinės, susidarant nutukusiam fenotipui, kas pastebima jau 1 mėn. amžiaus individuose. Tokių gyvuliukų svoris linkęs stabilizuotis, esant 60-70 g. (plg. 30-35 g. kontrolinių gyvuliukų). *ob* ir *db* gyvuliukai rodo daugybę kitų hormoninių ir metabolinių pokyčių, todėl sunku nustatyti pirminį defektą, priskirtiną mutacijai [Bray *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 50:891-902 (1989)].

Kiekvieną grauzikų nutukimo modelį lydi karbohidratų metabolizmo pakitimai, panašūs į žmonių II tipo diabetą. Kai kuriais atvejais diabeto išsivystimo lygis dalinai priklauso nuo pelės linijos [Leiter, *Endocrinology*, 124:912-922 (1989)]. Ir *ob*, ir *db* atveju, giminingos C57BL/Ks pelės išvysto smarkų diabetą su pilna β ląstelių nekroze ir salelių atrofija, susidarant reliatyviajai insulinopenijai. Atvirkščiai, giminingos C57BL/6J *ob* ir *db* pelės išvysto pereinamąjį, rezistentišką insulinui diabetą, kurį galų gale kompensuoja β ląstelių hipertrofija, panaši į žmogaus II tipo diabetą.

ob ir *db* pelių fenotipas yra panašus į žmonių nutukimą dėl kitokių priežasčių, negu diabeto išsivystymas - mutantinės pelės ėda daugiau ir mažiau sunaudoja energijos negu nenutukusios kontrolinės (kaip ir nutukę žmonės). Šis fenotipas yra taip pat gana panašus į fenotipą, matomą gyvuliukuose su ventramedialinio pagumburio pakenkimais, kas leidžia manyti, kad abiejose mutacijose gali būti trukdoma tinkamai susumuoti arba

atsakyti į maistinę informaciją centrinės nervų sistemos viduje. Šią hipotezę remia parabiozės eksperimentų rezultatai [Coleman, *Diabetologia*, 9:294-298 (1973)], kurie duoda pagrindo manyti, kad *ob* pelėms trūksta cirkuliuojančio pasisotinimo faktoriaus, ir kad *db* pelės yra rezistentiškos *ob* faktoriaus efektams (tikriausiai dėl *ob* receptoriaus defekto). Šie eksperimentai leidžia padaryti išvadą, kad šių mutantinių pelių nutukimas gali atsirasti dėl įvairių defektų centriniuose nerviniuose mazguose ir/arba postuluoto grįžtamojo ryšio mechanizmo integraciniame centre, kuris reguliuoja kūno kompoziciją.

Naudojant molekulinis ir klasikinius genetinius markerius, *ob* ir *db* genai buvo priskirti atitinkamai artimajai 6 chromosomai ir viduriniajai 4 chromosomai [Bahary *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87:8642-8646 (1990); Friedman *et al.*, *Genomics*, 11:1054-1062 (1991)]. Abiem atvejais mutacijos priskiriamos pelių genomo sritims, kurios yra sintoniškos su žmogaus sritimis, kas leidžia manyti, kad, jeigu yra žmogaus *ob* ir *db* homologai, tai jie turėtų atitikti atitinkamai žmogaus chromosomas 7q ir 1p. Defektai *db* gene gali duoti nutukimą kitų rūšių žinduoliuose: genetiniuose krosuose tarp Zucker *fa/fa* žiurkių ir Brown Norway *+/+* žiurkių, *fa* mutacija (žiurkių 5 chromosoma) yra flankuota tuo pačiu lokusu, kuris flankuoja *db* pelėje [Truett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7806-7809 (1991)].

Kadangi kūno svorį, matyt, veikia daugybė faktorių, nebuvo galima numatyti, kurie faktoriai, o tiksliau kurie homeostatiniai mechanizmai pirmiausiai apspredžia kūno svorį. Tokiu būdu, pagrindinė problema, išskylanti šiame išradime, yra gauti kūno svorio modulatorius, kurie leistų kontroliuoti žinduolių nutukimą ir riebalų kiekį.

Išradimo santrauka

Pagal šį išradimą, gyvūnų, ypač žinduolių, nutukimo kontrolės problema buvo išspręsta, pateikiant nutukimo polipeptidus (OB) ir nukleino rūgščių molekules, koduojančias šiuos polipeptidus, taip kaip aprašyta šiame išradime. Šis išradimas pirmą kartą pateikia išskirtus polipeptidus, tinkamus kūno svorio ir nutukimo moduliacijai, t.y. kontrolei ir reguliavimui, o taip pat nukleino rūgščių sekas, koduojančias tokius polipeptidus, kurios ne tik suteikia galimybę gauti OB polipeptidus rekombinantiniu būdu, bet ir pačios yra naudingos kūno svorio moduliacijoje.

Šio išradimo nutukimo polipeptidai (OB) turi maždaug 145-167 aminorūgštis, gali moduluoti gyvūnų, ypač žinduolių, kūno svorį; išradimas apima ir šio polipeptido alelinius variantus arba analogus, įskaitant jų fragmentus, turinčius tą patį biologinį aktyvumą. Polipeptidai gali būti pagaminti rekombinantiniais arba cheminės sintezės būdais. Tinkamiausi polipeptidai apima tokius, kurių aminorūgščių seka yra SEQ ID NOS: 2, 4, 5 arba 6, arba jų alelinius variantus arba analogus, įskaitant fragmentus.

Šio išradimo imunogeniniai OB polipeptidų fragmentai yra: 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); and Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys (SEQ ID NO:21).

Žmogaus OB polipeptido analogai apima tokius analogus, kurie turi žmogaus aminorūgščių sekas SEQ ID NOS: 4 ir 6, kur viena arba daugiau aminorūgščių 53, 56, 71, 85, 89, 92, 95, 98, 110, 118, 121, 122, 126, 127, 128, 129, 132, 139, 157, 159, 163, ir 166 padėtyse (pagal SEQ ID NO:4 numeraciją) yra pakeistos kita aminorūgštimi, tokia kaip nesutampanti su pelės OB polipeptido aminorūgštimi, kaip nurodyta SEQ ID NO:2, arba alaninu. Tokie analogai taip pat apima analogus, kuriuose: (a) serino liekana 53 padėtyje yra pakeista glicinu, alaninu, valinu, cisteinu, metioninu arba treoninu; (b) serino liekana 98 padėtyje yra pakeista glicinu, alaninu, valinu, cisteinu, metioninu arba treoninu; ir (c) arginino liekana 92 padėtyje yra pakeista asparaginu, lizinu, histidinu, glutaminu, glutamino rūgštimi, asparto rūgštimi, serinu, treoninu, metioninu arba cisteinu. Geriausiai, kai OB polipeptido analogas pagal šį išradimą turi 83% arba daugiau aminorūgščių sekos homologijos žmogaus polipeptido aminorūgščių sekai, parodytai SEQ ID NO:2, 4, 5 arba 6.

Kiti žmogaus OB polipeptido analogai pagal šį išradimą turi aminorūgščių seką SEQ ID NOS: 4 ir 6 ir juose: (a) viena arba daugiau asparto rūgšties liekanų pakeista glutamino rūgštimi; (b) viena arba daugiau izoleucino liekanų pakeista leucinu; (c) viena arba daugiau glicino arba valino liekanų pakeista alaninu; (d) viena arba daugiau arginino liekanų pakeista histidinu; (e) viena arba daugiau tirozino arba fenilalanino liekanų pakeista triptofanu; (f) viena arba daugiau iš 121-128 liekanų (pagal SEQ ID NO:4

numeraciją) pakeista glicinu arba alaninu; ir (g) viena arba daugiau liekanų 54-60 arba 118-166 padėtyse (pagal SEQ ID NO:4 numeraciją) pakeista lizinu, glutamino rūgštimi, cisteinu arba prolinu.

Dabartiniu metu tinkamiausi žmogaus OB polipeptido sutrumpinti analogai pagal šį išradimą apima tokius, kuriuose (pagal SEQ ID NO:4 numeraciją): (a) viena arba daugiau liekanų 121-128 padėtyse yra pašalinta; (b) 1-116 liekanos yra pašalintos; (c) 1-21 ir 54-167 liekanos yra pašalintos; (d) 1-60 ir 117-167 liekanos yra pašalintos; (e) 1-60 liekanos yra pašalintos; (f) 1-53 liekanos yra pašalintos; ir (g) (a) poskyrio analogas, kuriame pašalintos 1-21 liekanos. OB polipeptidai ir ob polipeptido analogai pagal šį išradimą, kuriuose nėra 21 aminorūgšties "signalinės" sekos (pvz., SEQ ID NO:4 1-21 aminorūgščių), gali turėti N-galinę aminorūgštį arba aminorūgščių seką, tokią kaip (1) metioninas, (2) seką glicinas-serinas-histidinas-metioninas (SEQ ID NO:38), (3) seką metioninas-glicinas-serinas-serinas-histidinas-histidinas-histidinas-histidinas-histidinas-histidinas-serinas-serinas-glicinas-leucinas-valinas-prolinas-argininas-glicinas-serinas-histidinas-metioninas (SEQ ID NO:98), (4) seką leucinas-glutamino rūgštis-lizinas-argininas-glutamino rūgštis-alaninas-glutamino rūgštis-alaninas (SEQ ID NO:26), (5) seką glutamino rūgštis-alaninas-glutamino rūgštis-alaninas (SEQ ID NO:27), (6) seką leucinas-glutamino rūgštis-lizinas-argininas (SEQ ID NO:28), (7) seką metioninas-glicinas-serinas-serinas-histidinas-histidinas-histidinas-histidinas-histidinas-histidinas-serinas-serinas-leucinas-valinas-prolinas-argininas-glicinas-serinas-prolinas (SEQ ID NO:99) ir (8) seką glicinas-serinas-prolinas.

OB polipeptido dariniai pagal šį išradimą turi vieną arba daugiau cheminių grupių, prijungtų prie jo, įskaitant vandenyje tirpius polimerus, tokius kaip polietilenglikolis. Polietilenglikoliu derivatizuoti dariniai gali būti mono-, di-, tri- arba tetrapolietilenglikolinti dariniai, pvz., N-galiniai monopolietilenglikoliai. Tinkamiausi N-galiniai mono-polietilenglikolinti išradimo ob polipeptidų dariniai apima OB polipeptidus, turinčius SEQ ID NO:4 22-166 aminorūgščių liekanas arba SEQ ID NO:6 22-166 aminorūgščių liekanas, esant reikalui, turinčius (polietilenglikolintą) metioniną 21 padėtyje.

Išskirta nukleino rūgšties molekulė, pateikiama šiame išradime, koduoja OB polipeptidą, alelinį variantą arba analogą, įskaitant fragmentus, kurie aprašyti aukščiau.

Atskirai pateikiamos DNR molekulės, skirtos panaudoti OB polipeptido ekspresijai, pasižyminčiam žinduolių kūno svorio moduliavimo aktyvumu, ir pasirinktos iš grupės, kurią sudaro: (a) DNR molekulės, parodytos SEQ ID NO:1 ir 3, arba jų fragmentai; (b) DNR molekulės, kurios hibridizuojasi su DNR molekulėmis, apibrėžtomis (a) dalyje, arba jų galintys hibridizuotis fragmentai; ir (c) DNR molekulės, kurios koduoja aminorūgščių sekos ekspresiją, užkoduotą bet kurios iš aukščiau paminėtų DNR molekulių. Tokių molekulių iliustracija yra žmogaus genomine DNR molekule SEQ ID NO:22 ir 24.

Tinkamiausios DNR molekulės pagal šį išradimą, koduoja polipeptidą, turintį aminorūgščių seką, parodytą: (a) SEQ ID NO:2; (b) SEQ ID NO:2 22-167 aminorūgštis; (c) SEQ ID NO:4; (d) SEQ ID NO:4 22-167 aminorūgštis; (e) SEQ ID NO:5; (f) SEQ ID NO:5 22-166 aminorūgštis; (g) SEQ ID NO:6 ir (h) SEQ ID NO:6 22-166 aminorūgštis; o taip pat polipeptidus, kurie turi aukščiau nurodytą N-galinę aminorūgštį arba aminorūgščių seką. Kaip iliustracija, tinkamiausia DNR molekulė turi seką, parodytą kaip baltymą koduojanti seka SEQ ID NO:3 ir ypatingai turi seką, parodytą kaip seka, koduojanti 22-167 aminorūgštis.

Taip pat pateikiamos detektuojama žyme pažymėtos nukleino rūgšties molekulės, galinčios hibridizuotis su išradimo DNR molekule, ir apima nukleino rūgšties molekules, galinčias hibridizuotis su nekoduojančia OB nukleino rūgšties dalimi, o nekoduojanti dalis yra pasirinkta iš grupės, susidedančios iš introno, 5' nekoduojančios dalies ir 3' nekoduojančios dalies. Šiame išradime taip pat pateikiami oligonukleotidiniai pradmenys, skirti žmogaus genominei DNR, koduojančiai ob polipeptidą, amplifikacijai, tokie kaip oligonukleotidai parodyti SEQ ID NO:29-32.

Išradime pateikiami vektoriai apima DNR molekulę pagal šį išradimą, kaip aprašyta aukščiau; pageidautina, kad jie turėtų ekspresijos vektoriaus formą, kuris apima DNR molekulę, veiksmingai surištą su ekspresijos kontroline seka. Pagal išradimą vienaląsčio šeimininko ląstelės transformuojamos arba transfekuojamos DNR molekulėmis pagal išradimą arba aukščiau aprašytu vektoriumi. Tinkamiausios šeimininko ląstelės apima bakterijas, mieles, žinduolių ląsteles, augalų ląsteles, vabzdžių ląsteles ir žmonių audinių kultūrų ląsteles. Kaip iliustracija, tokios šeimininko ląstelės yra parinktos iš grupės, kurią sudaro *E.Coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, mielės, CHO, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, BMT10, ir Sf9 ląstelės. Dabartiniu metu

tinkamiausi mielės-šeimininkai apima *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* ir *Torulopsis*. Taip pat pateikiamos žinduolių ląstelės, turinčios ob polipeptidą koduojančią DNR seką ir modifikuotos *in vitro*, kad būtų galima gauti didesnę ob polipeptido ekspresiją homologinių rekombinantinių veiksmų pagalba, susidedančią iš ekspresijos reguliatorinės sekos įterpimo į funkciškai artimą vietą prie ob polipeptido koduojančios sekos. Ekspresijos reguliatorinė seka gali būti arba nebūti ob polipeptido ekspresijos seka ir gali pakeisti mutantinio ob polipeptido reguliatorinę seką ląstelėje.

Šiame išradime pateikiami ob polipeptido pagaminimo būdai, apimantys: (a) aukščiau aprašytos ląstelės kultivavimą sąlygose, kuriose ekspresuojamas ob polipeptidas; ir (b) ob polipeptido išskyrimą. Į šią metodiką taip pat gali įeiti stadijos: (c) polipeptido chromatografavimas per Ni-chelatų sudarymo kolonėlę; ir (d) polipeptido valymas gel-filtracijos būdu. Tinkamiausiame realizavimo variante po (c) stadijos ir prieš (d) stadiją į metodą įjungama ob polipeptido chromatografavimas per stiprių katijonitų kolonėlę.

Šis išradimas taip pat pateikia žymėtus ir nežymėtus monokloninius ir polikloninius antikūnus, būdingus išradimo ob polipeptidams ir gyvybingų ląstelių linijas, kurios gamina monokloninį antikūną pagal išradimą. Antikūno gavimas pagal išradimą apima: (a) ob polipeptido prijungimą prie nešančio baltymo; (b) gyvūno-šeimininko imunizavimą (a) stadijos OB polipeptido fragmento-nešančio baltymo konjugatu, sumaišytu su stimulatoriumi; ir (c) antikūno gavimą iš imunizuoto gyvūno-šeimininko.

Išradimas taip pat pateikia OB polipeptido buvimo mėginyje išmatavimo būdus, apimančius: (a) mėginio, kuriame tikimasi, kad yra OB polipeptido, kontaktą su antikūnu (pageidautina prijungtu prie kieto pagrindo), kuris specifiškai rišasi su OB polipeptidu sąlygose, kuriose gali susiformuoti reakcijos kompleksai tarp antikūno ir OB polipeptido; ir (b) reakcijos komplekso tarp antikūno ir ob polipeptido, esančio mėginyje, susidarymo nustatymą; nustatymas, kad susidarė toks kompleksas, rodo kad mėginyje buvo OB polipeptidas. Atitinkamai pateikiami *in vitro* metodai, skirti OB polipeptido kiekiui biologiniame mėginyje įvertinti, apimantys: (a) reakcijos komplekso susidarymo biologiniame mėginyje nustatymą aukščiau minėtu būdu; ir (b) susidariusio reakcijos komplekso kiekio įvertinimą; šis reakcijos komplekso kiekis atitinka OB polipeptido kiekį biologiniame mėginyje. Nustatant arba diagnozuojant ligą, susijusią su padidintais arba sumažintais OB polipeptido kiekiais pagal šį išradimą, atliekamas aukščiau minėtas

įvertinimas, ir nustatyti kiekiai lyginami su esančio OB polipeptido kiekiais normaliuose subjektuose arba buvusiais prieš tam tikrą laiką tame pačiame subjekte. OB polipeptido kiekio padidėjimas, lyginant su normaliais arba ankstesniais kiekiais, rodo ligą, susijusią su padidintais OB polipeptido kiekiais, o OB polipeptido kiekio sumažėjimas, lyginant su normaliais kiekiais, rodo ligą, susijusią su sumažintais OB polipeptido kiekiais. Atitinkamai pateikiami terapinio ligos, susijusios su padidintais arba sumažintais OB polipeptido kiekiais žinduoliuose, gydymo kontroliavimo *in vitro* būdai, apimantys aukščiau aprašytą OB polipeptido kiekių įvertinimą eilėje biologinių mėginių, paimtų skirtingu laiku iš žinduolio, kuriam atliekamas toks terapinis gydymas.

Farmacinės kompozicijos pagal šį išradimą apima aukščiau aprašytą OB polipeptidą kartu su farmaciškai tinkamu nešikliu, ir yra tinkamos naudoti gyvūno kūno svorio sumažinimui terapiniais metodais. Papildomos farmacinės kompozicijos pagal šį išradimą, skirtos panaudoti terapiniuose methoduose gyvūno kūno svorio padidinimui, apima OB polipeptido antagonistą, geriausiai pasirinktą iš grupės, susidedančios iš antikūno, kuris prisijungia prie OB peptido ir neutralizuoja jo aktyvumą, ob polipeptido fragmento, kuris prisijungia, bet neaktyvuoja OB polipeptido receptoriaus, ir OB polipeptido antagonistą, kuris yra maža molekulė. Šia išradimas taip pat apima atitinkamas kūno išvaizdą gerinančias kosmetines kompozicijas, skirtas individo kūno svorio sumažinimui arba padidinimui; šitokios kompozicijos yra naudingos kosmetikoje individo kūno išvaizdai pagerinti. Tokios kosmetinės kompozicijos skiriamos individui dozėmis, pakankamomis individo kūno svorio sureguliuojimui iki norimos apimties.

Šis išradimas taip pat susijęs su nukleino rūgšties molekulių pagal šį išradimą, o taip pat antiprasminių nukleino rūgšties molekulių, galinčių hibridizuotis su nukleino rūgštimi, koduojančia OB polipeptidą pagal šį išradimą, panaudojimu vaistų (pvz., genų terapijai), skirtų gyvūno kūno svorio modifikavimui, gamyboje. Taip pat apimamas ir OB polipeptido arba antagonistą pagal išradimą panaudojimas vaistų, skirtų gyvūno kūno svorio modifikavimui, gamyboje. Taip sukurti vaistai gali būti naudojami žinduolių kūno svorio modifikavimui, gydant sutrikimus, pasirinktus iš grupės, į kurią įeina diabetas, aukštas kraujo spaudimas ir didelis cholesterolio kiekis, ir kaip dalis kombinuotos terapijos su vaistais, skirtais tokių sutrikimų gydymui. Tokie vaistai gali būti naudojami terapiniuose methoduose, apimančiuose intravenines, intraarterines, intraperitonines,

intramuskulines, subkutanines, nazalines, peroralines arba pulmonarines vaistų įvedimo sistemas.

Čia pateikti duomenys rodo, kad yra nustatyta, kad išradimo OB polipeptidų formą pirmiausiai išskiria žinduolių adipocitai, ir kad polipeptidai funkcionuoja kaip hormonai.

Išradime pateikiami pavyzdžiai demonstruoja, kad OB polipeptidas, kitaip vadinamas "leptinu", cirkuliuoja pelės, žiurkės ir žmogaus plazmoje. Leptino nėra plazmoje, gautoje iš *ob/ob* pelių, jo koncentracija *db/db* pelių plazmoje yra dešimt kartų didesnė, o *fa/fa* žiurkių plazmoje - dvidešimt kartų didesnė. Svarbiausia, kad rekombinantinio leptino kasdieninės injekcijos dramatiškai sumažina *ob/ob* pelių kūno masę, labai paveikia laukinio tipo pelių kūno masę ir neturi įtakos *db/db* pelėms.

Kitu aspektu, vienų rūšių *ob* polipeptidas yra biologiškai aktyvus kitose rūšyse. Pavyzdžiui, žmogaus polipeptidas yra aktyvus pelėse.

Pirmuoju atveju šio išradimo modulatoriai apima nukleino rūgšties molekules, įskaitant rekombinantinės DNR molekules (pvz., kDNR arba vektorių, turintį kDNR arba išsirtą genomine DNR), arba jų degeneracinius variantus, kurie koduoja polipeptidus ir patys tarnauja kaip svorio kontrolės modulatoriai, kaip pažymėta toliau, arba išlaikytus variantus arba jų fragmentus, ypač tokius fragmentus, kuriuose nėra signalinio peptido (čia vadinamas dar subrendusiu OB polipeptidu); polipeptidai turi aminorūgščių sekas, tokias kaip parodyta fig. 1A-E (SEQ ID NO:2), fig. 3 (SEQ ID NO:4), fig. 5 (SEQ ID NO:5) ir fig. 6 (SEQ ID NO:6). Specifiniuose realizavimo variantuose pateiktos pelės ir žmogaus *ob* polipeptidų abiejų variantų sekos. Abu polipeptidai rasti formoje, kurioje pašalintas glutaminas 49, kas gali būti dėl mRNR sujungimo anomalijos. Įvairių rūšių OB polipeptidai gali būti labai homologiški; kaip parodyta fig. 4, pelės ir žmogaus OB polipeptidai yra daugiau nei 80% homologiški.

Nukleino rūgšties molekulės, rekombinantinės DNR molekulės arba klonuoti genai gali turėti nukleotidų sekas arba jos gali būti komplementarios DNR koduojančioms sekoms, parodytoms fig. 1A-E (SEQ ID NO:1) ir fig. 2A ir B (SEQ ID NO:3). Atskiru atveju tokios DNR molekulės gali būti kDNR arba genomine DNR, išskirta iš chromosomų. Nukleino rūgšties molekulės pagal išradimą taip pat gali atitikti 5' ir 3' flankuojančioms DNR sekoms ir introninėms DNR sekoms. Taigi, šis išradimas taip pat susijęs su nukleino rūgšties, turinčios nukleotidų seką, parodytą fig. 1A-E (SEQ ID NO:1)

ir fig. 2A ir B (SEQ ID NO:3), degeneracinių variantų, alelinių variantų ir panašių giminingų molekulių identifikacija.

Išradimo nukleino rūgšties molekulė gali būti DNR arba RNR, įskaitant jų sintetinius variantus, turinčius fosfato arba fosfato analogo, pvz., trifosfato jungtis. Čia turima galvoje ir viengrandininės ir dvigrandininės sekos.

Šis išradimas taip pat susijęs su nukleino rūgšties molekulėmis, skirtomis panaudoti kaip molekuliniai zondai arba kaip pradmenys polimerazinės grandininės reakcijos (PCR) amplifikacijai, t.y. sintetiniai arba gamtiniai oligonukleotidai, turintys seką, atitinkančią fig. 1A-E (SEQ ID NO:1), fig. 2A ir B (SEQ ID NO:3) ir fig. 20 A-C (SEQ ID NO:22-24) parodytos sekos dalį; arba koduojančių sekų 5' ir 3' flankuojančios sekos; arba genominės DNR introninės sekos. Ypatingai, išradime aptariama nukleino rūgšties molekulė, turinti mažiausiai 10 nukleotidų; nukleino rūgšties molekulės seka atitinka to paties skaičiaus nukleotidų seką nukleotidų sekose, parodytose fig. 1A-E (SEQ ID NO:1), fig. 2A ir B (SEQ ID NO:3) ir fig. 20A-C (SEQ ID NO:22) arba yra jai komplementari. Geriau, kai molekulės nukleinorūgšties seka turi mažiausiai 15 nukleotidų. Dar geriau, kai nukleino rūgšties seka turi mažiausiai 20 nukleotidų. Išradimo realizavimo variante, kuriame oligonukleotidas yra zondas, oligonukleotidas yra pažymėtas detektuojama žyme, pvz., radionuklidu (tokiu kaip ^{32}P) arba fermentu.

Dar vienu požiūriu, išradimas yra susijęs su klonavimo vektoriumi, apimančiu nukleino rūgštį pagal išradimą, kurios koduoja ob polipeptidą; ir bakterijų, vabzdžių arba žinduolių ekspresijos vektoriumi, kuris apima nukleino rūgšties molekules pagal išradimą, koduojančias ob polipeptidą, veiksmingai surišta su ekspresijos kontroline seka. Tokiu būdu, išradimas susijęs ir su šeimininko ląstele, tokia kaip bakterijos ląstelė, mielių ląstelė, vabzdžio ląstelė arba žinduolio ląstelė, transfekuota arba transformuota atitinkamu ekspresijos vektoriumi, o tuo pačiu ir su aukščiau minėtų darinių panaudojimu išradimo modulatoriams gauti.

Dar kitu požiūriu, šis išradimas susijęs su antikūnais, kurie rišasi su OB polipeptidu. Tokie antikūnai gali būti sukelti prieš viso ilgio polipeptidą arba prieš jo antigeninius fragmentus. Vienu atžvilgiu, tokie antikūnai inhibuoja funkcinį (t.y. kūno svorio ir riebalų kompozicijos moduliavimo) ob polipeptido aktyvumą. Kitu atžvilgiu, antikūnai gali būti panaudoti cirkuliuojančio ob polipeptido plazmoje arba serume kiekio

nustatymui. Dar kitu atžvilgiu, specifinei sričiai antikūnai, ypatingai monokloniniai antikūnai, gali būti naudojami kaip OB polipeptido struktūros zondai.

Visos aukščiau paminėtos medžiagos čia turi būti laikomos kūno svorio ir riebalinės sudėties modulatoriais, ir, kaip tokios, gali būti naudojamos įvairiomis prasmėmis. Tiksliau, išradime aptariamas tiek diagnostinis, tiek ir terapinis panaudojimas, taip pat tam tikras panaudojimas žemės ūkyje, o taip pat visokios čia apibrėžtų moduliatorių, tiek nukleino rūgšties molekulių, tiek ir peptidų, panaudojimo galimybės. Be to, kūno svorio moduliavimas susijęs su specifine terapine reikšme ir nauda ta prasme, kad būsenos - tiek nutukimas, tiek, atvirkščiai, kacheksija - yra nepageidautos kūno būsenos, ir jos gali būti gydomos, skiriant vieną arba daugiau šio išradimo moduliatorių.

Taigi, yra siūlomas žinduolio kūno svorio moduliavimo būdas, kuris apima baltymo, koduojamo nukleino rūgštimi, turinčia nukleotidų seką, pasirinktą iš sekos, prodytos fig. 1A-E (SEQ ID NO:1), sekos, parodytos fig. 2A ir B (SEQ ID NO:3) ir jų degeneracinių ir alelinių variantų, ekspresijos kontroliavimą. Tokią kontrolę galima realizuoti, įvedant minėtus nukleotidus genų terapijos būdu į paciento arba šeimininko riebalines ląsteles nutukimo sumažinimui arba kontrolei. Atvirkščiai, nukleotidų antagonistų, tokių kaip antiprasminės molekulės, pagaminimas ir skyrimas turėtų būti naudingas ir vykdomas tuo atveju, kai atsiranda ir yra gydomos būsenos, apibūdinamos žymiu svorio praradimu, tokios kaip nervinė anoreksija, vėžys arba AIDS. Tokius darinius reikėtų įvesti, panašiai kaip ir nukleotidus, tiesiogiai į riebalines ląsteles, kad būtų paveikiami tokie pokyčiai.

Atitinkamai baltymai, apibūdinti fig. 1A-E, 3, 5 ir 6 (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 ir SEQ ID NO:6), jų išlaikyti variantai, jų aktyvūs fragmentai ir giminingos mažos molekulės gali būti įjungtos į kompozicijas terapiniam vartojimui, norint sumažinti arba kontroliuoti perdėtą kūno riebumą arba svorio augimą. Atitinkamai gali būti pagaminti ir panašiai panaudoti antikūnai ir kiti minėtų baltyminių medžiagų, tokių kaip jų fragmentai, antagonistai, norint pasiekti atvirkštinį efektą. Taigi, išradimas pirmiausiai yra skirtas farmacinėms kompozicijoms, į kurias įeina šio išradimo OB polipeptidas, arba, kitu atveju, jo antagonistas, sumaišytas su farmaciškai tinkamu nešikliu arba priedu.

Be to, išradimo OB polipeptidas gali būti vartojamas kosmetiniams tikslams, t.y. pagerinti kūno išvaizdą, sumažinant riebalines sankaupas. OB polipeptidas gali būti

vartojamas atskirai arba kartu su kitomis kosmetinėmis priemonėmis tikslui pasiekti, pvz., kosmetine chirurgija.

Šių nukleotidų ir atitinkamų peptidų diagnostinis panaudojimas išsiplečia iki nukleino rūgščių panaudojimo tolimesnių jų alelinių variacijų mutacijų identifikavimui taip, kad išplečiamas aktyvių nukleotidinių medžiagų, naudingų tiek diagnostikoje, tiek ir terapijoje, panaudojimo diapazonas. Atskiru atveju, gali būti nustatomos nagrinėjamų nukleotidų tiek homozigotinės, tiek ir heterozigotinės mutacijos, iš ko galima būtų daryti tikslesnę prielaidą apie pacientų būseną, nustatant individų rizikos faktorių nutukimo prasme. Konkrečiau, dabar yra manoma, kad heterozigotinės mutacijos yra susiję su nedideliu arba vidutiniu nutukimu, tuo tarpu homozigotinės mutacijos yra susiję su labiau išreikšto ir daug didesnio nutukimo būseną. Taigi, gali būti atliekamas DNR testavimas, naudojant aukščiau minėtas atrastas medžiagas, kaip lygio atžymas tikslių ilgalaikių tam tikrų tendencijų prognozių palengvinimui, kad būtų galima rekomenduoti dietos arba kitų asmeninių įpročių pakeitimus, arba tiesioginį terapinį įsikišimą, norint išvengti tokios būsenos.

Šio išradimo naudingumas diagnostikoje susijęs su šio išradimo moduliatorių buvimo ir kiekio išmatavimo metodais ląstelių mėginiuose arba biologiniuose ekstraktuose (arba mėginiuose), paimtuose iš tiriamųjų subjektų, kuriuose galima įvertinti tiek nukleino rūgščių (genominės DNR arba mRNR) ir/arba baltymo kiekius tokiuose testuojamuose mėginiuose. Laikant, kad padidintas nukleotido aktyvumas ir gaunamo baltymo buvimas atspindi subjekto sugebėjimą slopinti nutukimą, terapeutas, analizuojantis tokius nutukusio subjekto rezultatus, galės nustatyti, kad nutukimo priežastis yra kitoks faktorius, o ne disfunkcija šio išradimo nukleotidų aktyvumo ir buvimo atžvilgiu. Atvirkščiai, sumažinti nukleotido ir/arba ekspresuoto baltymo kiekiai, leistų manyti, kad jų kiekius reikia didinti, gydant tokias nutukimo būsenas, ir turėtų būti vykdomas atitinkamas terapinis režimas.

Be to, atrasti ir fig. 1A-E ir 2A ir B pateikti nukleotidai, kaip trumpai paminėta aukščiau, tinka atitinkamų RNR kiekio matavimui. Panašiai gali būti pagaminta ir atitinkamai pažymėta rekombinantinio baltymo medžiaga, atitinkanti fig. 1A-E ir 3 parodytus polipeptidus, ir panaudota, pavyzdžiui, radioimuninėje analizėje, norint,

pavyzdžiui, išmatuoti riebalų ir/arba OB baltymo kiekius plazmoje, arba nustatymui OB receptoriaus buvimo ir kiekio audiniuose, tokiuose kaip pogumburio audinys.

Dar daugiau, šiame išradime svarstoma ne tik nukleotidų ir čia pateiktų baltymų identifikacija, bet ir receptorių tokioms medžiagoms išaiškinimas. Šia prasme fig. 1A-E, 3, 5 ir/arba 6 parodyti polipeptidai gali būti pagaminti ir panaudoti atitinkamos ekspresijos bibliotekos skryningui, norint išskirti aktyvius receptorius. Po to, receptoriai turi būti klonuojami, o po to vienas receptorių arba kartu su ligandu gali būti panaudojamas mažų molekulių, kurios galėtų pasižymėti panašiu į šiuos modulatorius aktyvumu, skryningui.

Be to, šis išradimas yra susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, į kurias įeina kai kurie iš moduliatorių, geriausia polipeptidai, kurių sekos yra pavaizduotos SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 ir SEQ ID NO:6, jų antikūnai, atitinkamos mažos molekulės, kaip agonistai arba jų antagonistai, arba aktyvūs fragmentai, pagamintomis sudarant tokias receptūras, kurios tinka įvairiems vaisto vartojimo būdams, kai tokia terapija yra reikalinga. Tokios receptūros apima farmaciškai tinkamus nešiklius arba kitokias reikiamas pagalbines medžiagas, ir jos turi turėti efektyvius dozių intervalus, kuriuos kiekvienu atveju turi nustatyti klinicistas arba terapeutas.

Taigi, pagrindinis šio išradimo objektas yra čia aprašomas išgrynintos formos kūno svorio modulatoriai, kurie turi tam tikras charakteristikas ir aktyvumą, susijusį su žinduolių nutukimo ir riebalų kiekio kontrole ir jų variacijomis.

Kitas šio išradimo objektas yra pateikti čia nurodytų svorio kontrolės moduliatorių nustatymo ir išmatavimo metodus, kaip efektyvios diagnostikos ir patologinių būsenų, kuriose tokių moduliatorių kiekio kitimai yra arba gali būti charakteringas bruožas, kontrolės priemonės.

Dar kitas šio išradimo objektas yra pateikti metodą ir su juo susijusią test-sistemą medžiagų, tokių kaip vaistai, agentai ir pan., kurie gali būti veiklūs arba imituodami arba inhibuodami moduliatorių pagal išradimą aktyvumą žinduolių atveju, skryningui.

Dar kitas šio išradimo objektas yra pateikti žinduolių gydymo būdą, norint kontroliuoti žinduolių kūno svorį ir riebalų kiekį, ir/arba gydyti tam tikras patologines būsenas, kurių charakteringas bruožas yra nenormalus kūno svorio sumažėjimas arba padidėjimas.

Dar kitas šio išradimo objektas yra paruošti genetinius darinius, skirtus panaudoti genetinėse terapinėse metodikose, ir/arba farmacines kompozicijas palyginamiems terapiniams metodams, kurie apima arba yra paremti vienu arba daugiau moduliatorių, rišančių partnerių arba agentų, kurie gali kontroliuoti jų gaminimąsi, arba kurie imituoja arba slopina jų aktyvumą.

Kiti aspektai ir privalumai paaiškės šios srities specialistams iš toliau duodamo aprašymo apžvalgos, kuri duodama su nuorodomis į žemiau pateiktus iliustracinius brėžinius

Trumpas brėžinių aprašymas

Fig.1 (A-E) parodyta nukleino rūgšties seka (SEQ ID NO:1) ir dedukuota aminorūgščių seka (SEQ ID NO:2), išvesta pelės OB kDNR. Po 39 bazių poros 5' lyderio eina numatytas 167 aminorūgščių atviro skaitymo rėmelis ir apie 3,7 kb 3' netransliuota seka. (Anksčiau pateiktoje paraiškoje Ser. Nr. 08/347563, paduotoje 1994 m. lapkričio 30 d. ir Ser. Nr. 08/438431, paduotoje 1995 m. gegužės 10 d., papildoma 58 bazių 5' nekoduojanti seka, kaip vėliau pasirodė, buvo klonavimo artifaktas. Šis artifaktas neturi reikšmės į kodavimo sritį, 39 bazės 5' nekoduojančią sritį, dabar pavaizduotą fig. 1, arba 3' nekoduojančią geno sritį. Parodyta 3' netransliuotos sekos iš viso apie 2500 bazių porų. Numatytos baltymo sekos analizė iš stebėjimų ir naudojant *SigSeq* kompiuterinę programą rodo signalinės sekos buvimą (pabraukta). Pastebėtas kDNR mikroheterogeniškumas ta prasme, kad apie 70% kDNR turi glutamino kodoną 49 padėtyje ir 30% - neturi (žr. fig. 5 ir 6 *infra*). Ši aminorūgštis yra pabraukta, kaip ir arginino kodonas, kuris yra mutuoatas C57BL/6J *ob/ob* pelėse (1J pelėse).

Fig.2 (A ir B) parodyta nukleino rūgšties seka (SEQ ID NO:3), išvesta žmogaus OB kDNR. Nukleotidai sunumeruoti nuo 1 iki 701, pradedant startine vieta prie 46 nukleotido ir baigiant prie 550 nukleotido.

Fig.3 parodyta pilna dedukuota aminorūgščių seka (SEQ ID NO:4), išvesta žmogaus OB genui, atitinkančiam nukleino rūgšties seką, parodytą fig.2A ir B. Aminorūgštys sunumeruotos nuo 1 iki 167. Signalinės sekos pertraukimo vieta yra po 21 aminorūgšties (Ala); taigi subrendęs baltymas prasideda nuo 22 aminorūgšties (Val) ir tęsiasi iki 167 aminorūgšties (Cys).

Fig.4 duotas palyginimas tarp pelės (SEQ ID NO:2) ir žmogaus (SEQ ID NO:4) dedukuotų aminorūgščių sekų. Žmogaus OB dedukuota aminorūgščių seka yra labai homologiška pelės aminorūgščių sekai. Konservatyvūs pokyčiai pažymėti brūkšneliais, o nekonservatyvūs - žvaigždutėmis. Kintamas glutamino kodonas yra pabrauktas, kaip ir neprasminės mutacijos padėtis C57BL/6J *ob/ob* (1J) pelėse. Iš viso yra 83% aminorūgščių identiškumo, nors rasti tik aštuoni pakeitimai tarp valino prie 22 kodono (signalinės sekos peraugimas betarpiškai žemyn einančia kryptimi) ir cisteino 117 padėtyje.

Fig.5 parodyta pilno ilgio aminorūgščių seka (SEQ ID NO:5), išvesta pelės OB genui, kaip parodyta fig. 3, tik 49 padėtyje nėra glutamino. Aminorūgštys sunumeruotos nuo 1 iki 166. Signalinės sekos skilimo vieta yra po 21 aminorūgšties (Ala) (taigi prieš glutamino 49 deleciją); taigi subrendęs baltymas prasideda nuo 22 aminorūgšties (Val) ir tęsiasi iki 166 aminorūgšties (Cys).

Fig.6 parodyta pilna dedukuota aminorūgščių seka (SEQ ID NO:6) išvesta žmogaus OB genui, kaip parodyta fig. 4, tik 49 padėtyje nėra glutamino. Aminorūgštys sunumeruotos nuo 1 iki 166. Signalinės sekos skilimo vieta yra po 21 aminorūgšties (Ala) (taigi prieš glutamino 49 deleciją); taigi subrendęs baltymas prasideda nuo 22 aminorūgšties (Val) ir tęsiasi iki 166 aminorūgšties (Cys).

Fig.7 (A) *ob* padėties pelių chromosomoje fizikinis žemėlapis, ir YAC ir P1 klonavimo žemėlapiai. "M" ir "N" atitinka *MuI* ir *NotI* restrikcijos vietas. Skaiciai atitinka individualius gyvuliukus, kurie buvo rekombinantiniai 1606 mejozių, kurios buvo pažymėtos, *ob* srityje. Met, Pax 4, D6Rck39, D6Rck13 ir Cpa atitinka padėtis *ob* srityje, kuri rišasi su DNR zondais. YAC buvo išskirtos, naudojant D6Rck13 ir Pax-4 kaip zondus, o galai buvo regeneruoti, naudojant vektorių PCR ir/arba plazmidės galo regeneraciją ir naudojami vėl naujų YAC išskyrimui. (B) Gauta YAC yra sankaupa. Viena iš YAC šioje sankaupoje, Y902A0925, buvo chimerinė. Kiekvienas iš zondu, naudotų rekombinantinių gyvuliukų genotipo nustatymai, yra pažymėti skliausteliuose. (6) atitinka YAC 107 (5) atitinka M16(+) (arba M16(pLUS)); (4) atitinka *adu* (+); (3) atitinka *aad*(pICL); (2) atitinka 53(pICL); ir (1) atitinka 53(+). (C) P1 yra sankaupa bakteriofago P1 klonų, išskirtų, naudojant pasirinktus YAC galinius zondus. *ob* genas buvo išskirtas P1 klone, išskirtame naudojant YAC YB6S2F12 periferinį galą (galą (4)) (kitai dar vadinamą *adu*(+)).

Fig. 8 parodyta 192 nepriklausomų izoliatų iš ketvirtojo egzono sulaikymo bandymo, kurie buvo PCR amplifikuoti ir charakterizuoti, nudažymo etidžio bromidu fotografija.

Fig. 9 yra PCR-amplifikuotų klonų, kuriuose įtariama, kad yra *ob*, nudažymo etidžio bromidu fotografija. Kiekvienas iš 7 klonų, kuris nėra artifaktas, reamplifikuotas, naudojant PCR, atlikta jų elektroforezė ant 1% agarozės gelio TBE, ir nudažyti etidžio bromidu. Dydžio žymekliai (tolimiausias kairysis nenumeruotas takelis) yra komerciškai gaunamos "1 kb kopetėlės". 1 takelis - klonas 1D12, turintis "HIV" seką, 2 takelis - klonas 1F1, naujas klonas už *ob* srities, 3 takelis - klonas 1H3, 4 takelis - klonas 2B2, identiškas 1F1, 5 takelis - klonas 2G7, kuris turi *ob* egzoną, 6 takelis - klonas 2G11, kuris yra identiškas 1F1, 7 takelis - klonas 2H1, kuris neturi intarpo.

Fig. 10 duota 2G7 klonų seka (SEQ ID NO:7), į kuria įeina egzonas, koduojantis dalį OB geno. Pradmenų sekos, naudojamos šio egzono amplifikacijai, figūroje yra apibrėžtos stačiakampiu (SEQ ID NO:8 ir 9).

Fig. 11 (A) mRNR iš tos pačios pelės skirtingų audinių atvirkštinė transkripcinė PCR analizė su 267 pradmenimis ir aktino pradmenimis. RT-PCR reakcijos buvo atliktos, naudojant 100 ng bendro RNR reverso, transkribuoto oligo dT kaip pradmeniu pirmos kDNR grandinės sintezei. PCR amplifikacija buvo vykdoma 35 ciklus, atliekant 94° denatūraciją 1'; 55° hibridizaciją 1' ir 72° pailginimą 2', esant 1' antrajam pailginimui per ciklą. RT-PCR produktai išskirstyti 2% žemos lydymosi temperatūros agarozės geliuose 1×TBE buferyje. (B) mRNR iš įvairių pelės organų notherno blotingas, naudojant PCR žymėtą 267 kaip zondą. Vykdoma 10 μg bendros RNR iš kiekvieno audinio elektroforezė ant agarozės gelio su formaldehidu. Mėginys hibridizuojamas 65° temperatūroje Rapid Hybe (Amersham) aparate. Autoradiografiniai signalai pasirodo po 1 h ekspozicijos; parodyti eksperimentai yra 24 h ekspozicijos rezultatai.

Fig.12 (A) RT-PCR reakcijos su riebalinėmis ląstelėmis (baltasis adipozinis audinys) RNR iš įvairių išvardintų pelių linijų nudažymo etidžio bromidu vaizdas. Bendroji RNR (100 ng) kiekvienam mėginiui buvo atvirkščiai transkribuota, naudojant oligo dT ir atvirkštinę transkriptazę, ir susidariusi viengrandinė kDNR buvo PCR amplifikuota su 267 pradmenimis (apatinės juostos) arba aktino pradmenimis (viršutinės juostos). Ir 267, ir aktino pradmenys dalyvavo toje pačioje PCR reakcijoje. Produktai

perleisti per 1% agarozės TBE gelį. (B) Northern analizė atitinkanti (A). Išskirta 10 μ g riebalinių ląstelių (baltojo adipozinio audinio) RNR iš kiekvienos nurodytos linijos ir zonuota su PCR žymėtu 267 zonu, kaip aukščiau nurodyta fig. 11 B. Rastas maždaug 20 kartų 267 mRNR padidėjimas baltojo riebalų RNR iš C57BL/6J *ob/ob* (1J) linijos, lyginant su liesomis tokiomis pačiomis linijomis. Ir RT-PCR, ir northern eksperimentuose nėra pastebimo 267 RNR signalo iš SM/Ckc-+^{Dac}*ob^{2J}/ob^{2J}* (2J) pelių net ir po dviejų savaitių ekspozicijos. Parodyta 24 h autoradiografinė ekspozicija. Tas pats filtras hibridizuotas su aktino zonu (apatinė figūros dalis).

Fig. 13 yra papildomų 2J gyvuliukų ir kontrolinių gyvuliukų northern analizė, kuri patvirtina *ob* RNR 2J iš gyvuliukų nebuvimą. Northern analizė atlikta taip, kaip nurodyta fig. 11 ir 12. Šiuo atveju kontrolinė RNR buvo ap2 specifinis transkriptas riebalams. Nėra pastebimo ap2 juostų tankio kitimo.

Fig.14 palyginama C57BL/6J (normalių) ir C57BL/6J *ob/ob* (1J) pelių DNR seka taškinės mutacijos srityje, kurioje atsiranda įterptas priešsubrendęs stop-kodonas (neprasminė mutacija) mutantinės linijos kDNR. *ob/ob* pelės turi C→T mutaciją, kurioje yra pakeista arginino liekana 105 padėtyje. Šis bazės pakeitimas parodytas automatizuoto DNR sekų analizatoriaus duodamoje kreivėje. RT-PCR atlikta naudojant baltojo riebalų RNR iš abiejų linijų (+/+ ir *ob/ob*), naudojant pradmenis iš 5' ir 3' netransliuotų sričių. PCR reakcijos produktai valyti, naudojant gelį, ir tiesiogiai sekvenuoti rankiniu būdu, bei naudojant Applied Biosystems, Inc. 373a automatinį sekų analizatorių su pradmenimis išilgai abiejų koduojančių sekų grandinių.

Fig.15 (A) Genominės DNR iš kiekvienos išvardintos pelės linijos southern blotingas. Apie 5 μ g DNR (išvestos iš genominės DNR, gautos iš kepenų, inkstų arba blužnies) suskaldyta nurodytu restrikcijos fermentu. Tada atlikta DNR elektroforezė 1% agarozės TBE gelyje ir analizuota su PCR žymėtu 267. Restrikcinis skaldymas su *Bg/II* parodė *Bg/II* fragmento SM/Ckc-+^{Dac}*ob^{2J}/ob^{2J}* (2J) DNR dydžio padidėjimą apie 9 kb (didžiausias). RFLP negalima nustatyti su kitais restrikcijos fermentais. Preliminarus genominės DNR restrikcijos žemėlapis rodo, kad polimorfinė *Bg/II* vieta yra 7 kb prieš transkripcijos starto vietą. Nė vienas iš bandytų fermentų nesitęsė toliau mRNR starto vietos. (B) *Bg/II* polimorfizmo segregacija SM/Ckc-+^{Dac}*ob^{2J}/ob^{2J}* linijoje. Nustatyti genotipai šešių nutukusių ir penkių liesų progeninių formų toje pačioje koizogeninės

SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J} (2J) kolonijoje, nustatant Bg/II polimorfizmą, kaip parodyta (A). Visi fenotipiškai nutukę gyvuliukai buvo homozigotiniai didžiajam aleliniam polimorfiniam Bg/II fragmentui. DNR "kontroliniame" takelyje buvo pagaminta iš negiminingos SM/Ckc-+^{Dac}+/+ pelės, išaugintos atskirai nuo SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J} kolonijos.

Fig.16 yra *Eco*RI suskaldytos genominės DNR iš išvadintų rūšių southerno blotingas, naudojant OB kDNR kaip zondą (t.y. zoo-blotą). Kiekvieno stuburinio mėginyje matomi hibridizacijos signalai, net ir po vidutinio stiprumo hibridizacijos. Katės DNR šiame eksperimente buvo šiek tiek degraduota. Suskaldyta DNR buvo perleidžiama per 1% agarozės TBE gelį ir perkelta į imobiloninę membraną zondavimui. Filtras hibridizuotas 65° temperatūroje, plaunamas 2×SSC/0.2% SDS 65° temperatūroje du kartus po 20 min. ir eksponuojamas tris dienas, naudojant Kodak (Rochester, N. Y.) X-OMAT filmą.

Fig.17 parodyta vektoriaus pET-15b (Novagen) ekspresijos klonavimo sritis (SEQ ID NOS:11 ir 12).

Fig. 18 parodyta rekombinantinio subrendusio pelės *ob* suliejimo su His-tag (A) ir subrendusio žmogaus His-tag (B) eliuato iš His-rišančios dervos (Ni) analizė. Bakterijos buvo transformuotos pETM9 ir pETH14 vektoriais. Indukavus 1 mM IPTG optimaliose sąlygose, transformuotos bakterijos galėjo produkuoti 100-300 µg/ml OB sulieto baltymo pirmiausia inkliūzijos kūneliuose. Inkliūzijos kūneliai soliubilizuoti 6 M guanidino-HCl arba šlapalu, o sulietas baltymas (esantis lizavimo nuopile) buvo supiltas į His-rišančios dervos (Ni) kolonėlę 10-je ml 1×rišančiame buferyje su šlapalu. Kolonėlė laipsniškai plaunama 20 µM, 60 µM ir 300 µM imidazolo 5 ml porcijomis, ir gale - desorbuojančiu buferiu. Porcijos buvo analizuojamos, norint nustatyti, ar yra OB sulietas polipeptidas, naudojant 15% akrilamido gelį. Kiekviename takelyje buvo 100 µl bakterinio ekstrakto ekvivalentas.

Fig.19 (A) OB RNR transliacija *in vitro*. Žmogaus OB kDNR buvo subklonuota į pGEM vektorių. Plazmidė buvo linearizuota, o RNR plus-grandinė buvo sintezuota, naudojant Sp6 polimerazę. Sintezuota *in vitro* RNR buvo transliuota, esant arba nesant kanino pankreatinėms mikrosominėms membranoms. Apie 16 kD pirminės transliacijos produktas buvo matomas po *in vitro* transliacijos. Pridėjus mikrosominių membranų į

reakciją, pasirodo antrasis transliacijos produktas, kuris yra apie 2 kD mažesnis negu pirminės transliacijos produktas. Interleukino-1 α RNR transliacijos produkto, kuriame nėra koduojančios signalinės sekos, dydis nepasikeitė, pridėjus mikrosominių membranų. Šie duomenys rodo, kad yra funkcinė signalinė seka. (B) *In vitro* transliacija, esant arba nesant proteinkinazei K. Apdorojimas proteaze davė pilną 18 kD transliacijos produkto proteolizę, tuo tarpu 16 kD apdorota forma išliko nepakitusi. Mikrosomos pralaidumo padidinimas su 0.1% TRITON-X100 apdorotą formą padaro jautrią proteazei. Šie rezultatai rodo, kad produktas transliuojamas į mikrosomos ertmę.

Fig. 20 (A-E) Žmogaus OB geno seka (SEQ ID Nos:22-24). (F) Pelės OB geno scheminė diagrama. (G) Žmogaus OB geno scheminė diagrama. (F) ir (G) startinis ir stop-kodonai pabraukti. Nėra įrodymo, kad žmogaus gene pirmasis intronas yra homologiškas pelės pirmajam intronui, bet negalima teigti, kad jis neegzistuoja.

Fig. 21 duotas vienos iš klonavimo strategijų, naudotų rekombinantinei OB ekspresijai *Pichia* mielėse gauti, scheminis brėžinys. (A) OB ekspresijos vektorius su α -persidengimo faktoriaus signaline seka. (B) Rekombinantinio sulieto baltymo, įskaitant aminorūgščių seką (SEQ ID NO:24), struktūros scheminis brėžinys, rodantis *XhoI* vietą ir numatomas KEX-2 ir STE-13 skaldymo vietas bei N-galines perteklines aminorūgštis, esančias po KEX-2 skaldymo (SEQ ID NO:27). (C) Subrendusio OB gavimo alternatyvi strategija apima gavimą produkto su aminorūgščių seka, atitinkančią *XhoI* skaldymo vietą ir KEX-2 skaldymo vietą, einančią betarpiškai subrendusio ob polipeptido sekos (SEQ ID NO:28) kryptimi.

Fig. 22 Alternatyvi ekspresijos strategija *Pichia*. (A) OB suliejimo su His-tag ekspresijos vektorius, pritaikytas iš pET ekspresijos sistemos, kontroliuojant α -persidengimo faktoriaus signalinę seką (SEQ ID NO:33). (B) Rekombinantinio OB sulieto baltymo, turinčio His-tag, kuriame yra α -persidengimo faktoriaus signalinė seka, KEX-2 ir STE skaldymo vietos, His-tag ir trombino skaldymo vietos, kurios turi duoti OB su trimis perteklinių N-galinių aminorūgščių liekanomis, struktūros scheminis brėžinys..

Fig. 23 (A) Pelės OB (abi mikroheterogeninės formos, t.y. turinčios ir neturinčios Gln 49) ekspresijos PAGE analizė transformuotose *Pichia* mielėse. Transformuotų mielių kultūrų skystyje matoma laukiama apie 16 kD juosta (antrasis ir trečiasis takeliai), bet nematoma heterotransformuotų mielių kultūrų skystyje (pirmasis takelis). (B) Dalinai

išvalyto karboksimetilceliulioze rekombinantinio OB PAGE analizė. Apie 16 kD juosta labai gerai matoma išėjusiose iš kolonėlės 3 ir 4-je frakcijose; eliucija buvo vykdoma 250 mM NaCl. 1 takelis - įdėtas mėginys, 2 takelis - pilnas išplovimas; 3-5 takeliai - frakcijos, eliuotos 250 mM NaCl.

Fig. 24 rodo, kad OB baltymas cirkuliuoja pelės plazmoje. (A) Imunonuosėdos iš pelės kraujo. 0,5 ml pelės plazmos preliminariai nuskaidrinta nekonjuguota sefaroze ir inkubuota per naktį su imunoišvalytais anti-OB antikūnais, konjuguotais su sefarozės 4B rutuliukais. Imunonuosėdos atskirtos, panaudojant 15% SDS-PAGE gelį, perkeltos ir atliktas vesterno blotingas su anti-OB antikūnu. Baltymas, turintis apie 16 kD molekulinį svorį, migravo į tą pačią vietą, kaip ir subrendęs pelės ob baltymas, ekspresuotas mielėse. Baltymo nebuvo C57BL/6J *ob/ob* pelių plazmoje, o jo kiekis padidėjo dešimt kartų C57BLB/Ks *db/db* pelių plazmoje, lyginant su laukinio tipo pelėmis. Laikoma, kad *db* pelėse vyksta padidintas OB baltymo pasigaminimas. (B) Padidinti OB kiekiai riebiose žiurkėse. Riebi žiurkė yra nutukusi dėl pradingusios mutacijos žiurkės 5 chromosomoje. Genetiniai duomenys leidžia manyti, kad yra defektas tame pačiame gene, mutuotame *db* pelėse. Buvo imunonusodinta riebių pelių ir jų liesų partnerių plazma ir atlikti vesterno blotingai. Mutantinių gyvuliukų atveju matomas 20 kartų padidintas cirkuliuojančio OB kiekis. (C) OB baltymo kiekio nustatymas pelės plazmoje. Į *ob* pelių plazmą pridedama vis didėjantys kiekiai rekombinantinio pelės baltymo iki 100 λ ir imunonusodinama. Vesterno blotingo signalų intensyvumai palyginti su 100 λ laukinio tipo pelių intensyvumais. Didėjant rekombinantinio baltymo kiekiui, matomas tiesinis signalo intensyvumo didėjimas, kas rodo, kad imunonusodinimas buvo atliktas, esant antikūno pertekliui. Panašūs signalai matomi laukinio tipo plazmos mėginiuose, o mėginys su 2 ng rekombinantinio baltymo rodo, kad pelės plazmoje cirkuliuojantis kiekis yra apie 20 ng/ml. (D) OB baltymas adipozinio audinio ekstraktuose. Pelės adipozinio audinio citoplazmos ekstraktai buvo pagaminti iš *db* ir laukinio tipo pelių. Vesterno blotingas rodo, kad ekstraktuose, gautuose iš *db* pelių, yra padidinti 16 kD baltymo kiekiai.

Fig. 25 rodo, kad žmogaus plazmoje cirkuliuoja įvairūs OB baltymo kiekiai. (A) Žmogaus plazmos vesterno blotingas. Plazmos mėginiai gauti iš šešių liesų savanorių. Imunonusodinimas ir vesterno blotingas rodo, kad yra imunoreaktingas 16 kD baltymas, kurio dydis yra identiškas rekombinantiniam 146 aminorūgščių žmogaus baltymui,

ekspresuotam mielėse. Kiekviename iš šešių mėginių matomi skirtingi baltymo kiekiai. (B) Žmogaus ob ELISA. Mikrotitrų plokštelės buvo padengtos anti-žmogaus imunoišgrynintais OB antikūnais. Į plokšteles įdėti žinomi rekombinantinio baltymo kiekiai ir detektuota, naudojant imunoišgrynintus, biotinu paveiktus anti-ob antikūnus. Standartinei kreivei gauti braižoma optinio tankio priklausomybė nuo žinomų OB koncentracijų, esant 414 nm. Gauta standartinė kreivė rodo, kad bandyme galima detektuoti 1 ng/ml arba daugiau žmogaus OB baltymo. (C) OB baltymo kiekio nustatymas žmogaus plazmoje. ELISA imunotyrimas atliktas, naudojant 100 λ plazmos iš šešių liesų savanorių, ir standartai panaudoti B pelyje. Matomi OB baltymo kiekiai yra nuo 2 ng/ml HP1 atveju ir 15 ng/ml HP6 atveju. Šie duomenys koreliuoti su vesterno blotingo duomenimis A pelyje.

Fig. 26 rodo, kad OB baltymas sudaro inter- ir intramolekulinius disulfidinius ryšius. (A) Vesterno blotingas redukuojančiose ir neredukuojančiose sąlygose. Pakartoti pelės ir žmogaus vesterno blotiniai, pridėjus ir ne pridėjus į mėginio buferį redukcijos agentų. Kai mėginio buferyje nėra β -merkaptioetanolio, *db* plazmos imunonuosėdos migruoja, esant 16 kD ir 32 kD molekulinėms masėms. Pridėjus į buferį β -merkaptioetanolio, 32 kD medžiaga išnyksta (žr. fig. 24). Šis rezultatas pasikartoja, kai pelės baltymas yra ekspresuotas mielėse (*Pichia pastoris*). Šiuo atveju pelės OB baltymas migruoja į dimero padėtį. Kai yra redukuojančios medžiagos, išvalytas rekombinantinis pelės baltymas migruoja, esant 16 kD apytikrei molekulinei masei, kas rodo, kad 32 kD molekulinė forma yra vienos arba dviejų intermolekulinių disulfidinių ryšių rezultatas. Žmogaus baltymas ekspresuotas *in vivo* ir *Pichia pastoris* migruoja, esant 16 kD molekulinei masei tiek redukuojančiose, tiek oksidacinėse sąlygose (duomenys neparodyti). (B) Žmogaus baltymas ekspresuotas mielėse turi intramolekulinį disulfidinį ryšį. Sekretuoti baltymai paprastai turi teisingą konformaciją, kai jie ekspresuojami *Pichia pastoris* ekspresijos sistemoje. Subrendęs žmogaus baltymas iš 146 aminorūgščių buvo ekspresuotas *Picia pastoris* ir išskirtas iš mielių terpės, naudojant dviejų stadijų gryninimo metodiką, apimančią IMAC ir gel-filtraciją. Išvalytas baltymas analizuotas masių spektrometrijos metodu prieš ir po skaldymo bromcianu. Bromcianas skaldo prie metionino liekanos karboksi-galo. Rekombinantinio pelių baltymo molekulinė masė buvo 16024 ± 3 Da (išskaičiuota molekulinė masė = 16024 Da). Bromcianas skaldo baltymą prie

trijų metioninų baltymo sekoje prie 75, 89 ir 157 aminorūgščių. Bromciano fragmentas, turintis išmatuotą 8435.6 Da masę atitinka 90-157 ir 158-167 aminorūgštis, sujungtas disulfidiniu ryšiu tarp cys-117 ir cys-167 (išskaičiuota molekulinė masė=8434.5 Da). N.D.= nenustatyta.

Fig. 27 vaizduoja bioaktyvaus rekombinantinio baltymo gavimą. Nukleotidų seka, atitinkanti 145 aminorūgščių subrendusį pelės OB baltymą, buvo klonuota į pET 15b ekspresijos vektorių. Šis pET vektorius įterpia polihistidino traktą (His-tag) klonuotos sekos kryptimi, kas leidžia atlikti efektyvų gryninimą naudojant imobilizacinę metalų afininę chromatografiją (IMAC). Iš pradžių rekombinantinis bakterinis baltymas paskirstomas netirpioje membraninėje frakcijoje po bakterijų lizavimo. Membraninė frakcija soliubilizuojama, panaudojant guanidino hidrochloridą, ir užpilama ant IMAC kolonėlės. Baltymas laipsniškai eliuuojamas vis didinant imidazolo koncentraciją, kaip parodyta figūroje. Eliuotas baltymas renatūruojamas, ir veikiamas trombinu, kad būtų pašalinamas His-tag, kaip aprašyta žemiau. Galutinė tirpaus baltymo išeiga buvo 45 ng/ml bakterinės kultūros.

Fig. 28 rodo OB baltymo biologinius efektus. Maisto sunaudojimo (A-C paneliai) ir kūno svorio (D-F paneliai) priklausomybė nuo laiko. Dešimties gyvuliukų grupės gavo OB baltymo, kurio dozė buvo 5 mg/kg/per dieną (užtušuoti kvadratai), kasdienines PBS injekcijas (užtušuoti skrituliukai) arba negavo preparato (užtušuoti trikampiai). Bandomosios grupės buvo C57B1/6J *ob/ob* pelės (A ir D paneliai), C57B1/Ks *db/db* pelės (B ir E paneliai) ir CBA/J+/+ pelės (C ir F paneliai). Pelių maisto sunaudojimas buvo matuojamas kasdien, o kūno svoris nustatomas kas trys-keturių dienas, kaip nurodyta figūroje. (Kūno svorio skalė gramais buvo skirtinga laukinio tipo pelėms, lyginant su *ob* ir *db* pelėmis). *ob* pelių, gavusių baltymą, maisto sunaudojimas sumažėjo po pirmosios injekcijos ir stabilizavosi po keturių dienų, esant apie 40% kiekiui, imant nuo netikrų injekcijų grupės ($p<0.001$). Šių gyvuliukų kūno svoris sumažėjo vidutiniškai 1,3 gramų/per dieną ir stabilizavosi po trijų savaitių, esant apie 60% nuo pradinio svorio ($p<0,0001$). *db* pelėms baltymo efekto nepastebėta. Nedideli, tačiau reikšmingi kūno svorio efektai pastebėti CBA/J pelėms dviejuose pirmuosiuose taškuose ($p<0,02$). Kiekvieno matavimo standartinė paklaida pavaizduota brūkšniu, o statistinis šių rezultatų reikšmingumas parodytas 1 lentelėje.

Fig. 29 rodo *ob* pelių porinio maitinimo rezultatus. (A) keturių C57B1/6J *ob/ob* pelių grupė buvo maitinama, duodant maisto kiekį, lygų kiekiui, sunaudotam grupės *ob* pelių, gavusių rekombinantinio baltymo. Abiejų grupių svorio sumažėjimas buvo skaičiuojamas po 5, 6 ir 12 dienų. Pelės, kurioms buvo apribotas maistas (užstrichuoti stačiakampiai), prarado mažiau svorio, negu *ob* pelės, gavusios baltymo (užtušuoti stačiakampiai) ($p < 0,02$). Šie rezultatai rodo, kad OB baltymo svorį mažinantis efektas yra efektas tiek į maisto, tiek ir į energijos sąnaudas. (B) Paveiktos *ob* pelės fotografija. Parodytos dvi C57B1/6J *ob/ob* pelės. Kairioji pelė gavo PBS ir svėrė 65 gramus. Dešinioji pelė gavo rekombinantinio OB baltymo kasdienes injekcijas. Pradinis šio gyvuliuko svoris taip pat buvo 65 gramai, o svoris po trijų savaičių poveikio baltymu buvo 38 gramai. (C) Paveiktų ir nepaveiktų baltymu C57B1/6J *ob/ob* pelių kepenys. Pelės, gavusios PBS, kepenys buvo didelės ir riebios ir svėrė 5,04 gramo. Pelės, gavusios rekombinantinio *ob* baltymo, kepenų išvaizda normali ir jos svėrė 2,23 gramo.

Fig. 30 rodo *ob* adipozinio audinio hibridizaciją *in situ*. Prasminė ir antiprasminė *ob* RNR pažymėta *in vitro*, naudojant Sp6 ir T7 polimerazę ir digoksigeniną. Pažymėtos RNR buvo hibridizuojamos su imobilizuotomis parafine adipozinio audinio iš aštuonių savaičių amžiaus C57B1/Ks pelių (pažymėtų laukinis tipas) ir C57B1/Ks *db/db* pelių (pažymėtų *db*) antsklidžio išpjovomis. Figūroje parodyta, kad pasirodo lipidų lašeliai kaip nenudažytos vakuolės ląstelių viduje. Citoplazma yra plonas apvadas ląstelių periferijoje ir nesiskiria nuo ląstelės membranos. Hibridizacija su visais adipocitais šioje srityje buvo nustatyta laukinio tipo pjūviuose tik naudojant antiprasminį zondą ir matomi labai padidinti kiekiai audinio iš *db/db* gyvuliukų audinio pjūviuose.

Fig. 31 rodo, kad OB RNR yra ekspresuojama adipocituose *in vivo* ir *in vitro*. Atlikta visos RNR (10 mikrogramų) iš keleto įvairių šaltinių blotuotų ir hibridizuotų su *ob* zondų elektroforezė. Pirmiausia, adipocitų gryninimui panaudoti ląstelių plaukiamumo skirtumai po skaldymo kolagenaze. OB RNR buvo tik adipocitų frakcijoje. S takelis rodo stromovaskulinę frakciją, o A - adipocitų frakciją. Be to, OB RNR neekspresuojama nediferencijuotų 3T3-442 preadipocitų ląstelių (U takelis). Diferencijuoti adipocitai iš šių ląstelių linijų ekspresuoja aiškiai nustatomus OB mRNR kiekius (D takelis).

Fig. 32 rodo, kad OB RNR yra ekspresuojama visose adipozinio audinio sankaupose. Visos tirtos adipozinio audinio sankaupos ekspresavo *ob* RNR. Kirkšnies

riebalinis audinys ekspresavo šiek tiek mažesnius RNR kiekius, nors buvo signalų lygių skirtumai įvairiuose eksperimentuose. (Fig. 31A) 1 takelis - antsėklidžio, 2 - kirkšnies, 3 - pilvo, 4 - priegimdžio riebaliniai audiniai. Rudieji riebalai taip pat ekspresavo nedidelius OB RNR kiekius. (Fig. 31B) OB ekspresijos kiekiai ruduosiuose riebaluose buvo nepakitę gyvuliukų, laikytų 4 °C temperatūroje vieną savaitę, atveju, nors rudiems riebalams specifinės UCP RNR, žinomos, kad ją sukelia šaltis, kiekis padidėjo penkis kartus.

Fig. 33 atvaizduota OB RNR ekspresija *db/db* ir aukso tiogliukoze apdorotose pelėse. Atlikta bendros RNR iš aukso tiogliukoze (GTG) apdorotų pelių ir *db/db* pelių priegimdžio riebalinio audinio elektroforezė ir northerno blotingas. Yra žinoma, kad apdorojus vienkartinę GTG doze, sukeliamas nutukimas, indukuojant specifinius pagumburio pakenkimus. (A) Vieno mėnesio amžiaus CBA žiurkių patelės buvo paveiktos GTG (0,2 mg/g) ir gaunamas >20g apdorotų gyvuliukų svorio padidėjimas, lyginant su kontroliniais gyvuliukais (<5g). (B) OB mėginio su RNR iš *db/db* ir GTG apdorotų pelių hibridizacija rodo 20 kartų *ob* RNR kiekio padidėjimą, lyginant su kontroline RNR (aktinas arba GAPDH).

Fig. 34 vaizduoja žmogaus RNR northerno blotingo analizę. Northerno blotai, turintys 10 mg bendrosios RNR iš žmogaus adipozinio audinio (FAT, A panelis) ir 2 mg poliA+RNR iš kitų žmogaus audinių (B panelis) hibridizuoti su žmogaus *ob* arba žmogaus β-aktino zondais, kaip nurodyta figūroje. Matomas intensyvus signalas širdies (HE) ir placentos (PL) atveju, tačiau OB RNR nerasta smegenyse (BR), plaučiuose (LU), kepenyse (LI), skeletiniuose raumenyse (SM), inkstuose (KI) ir kasoje (PA). Kiekvienu atveju nurodyta autoradiografinės ekspozicijos trukmė.

Fig. 35 vaizduoja YAC sandarą, turinčią žmogaus OB geną ir 8 mikrosatelitinius markerius. Atvaizduota YAC paremta turinčio žmogaus OB geno STS kiekio 7 chromosomos žemėlapis, gautas panaudojant SEGMAP/version 3.29 [Green *et al.*, *PCR Methods Applic.*, 1:77-90 (1991)]. Viršuje išvardinti 19 vienodai išdėstyti STS (žr. 3 lentelę). 8 mikrosatelitams specifiški STS pažymėti žvaigždutėmis (žr. 4 lentelę). Taip pat parodyti STS, atitinkantys *Pax4* ir OB genams, o taip pat numatytos centromero (CEN) ir 7q telomero (TEL) padėties sandaros atžvilgiu. Kiekvienas iš 43 YAC klonų pažymėtas horizontaliu brūkšniu, kurio pavadinimas duotas kairėje, o įvertintas YAC dydis (kb, išmatuotas pulsuojančio lauko gel-elektroforezės būdu) duotas skliausteliuose. STS

buvimas YAC pažymėtas užtušuotu ratuku atitinkamoje padėtyje. Jei STS atitinka įterptą YAC galą, apie atitinkamą ratuką nubraižytas kvadratas tiek viršuje (prie STS pavadinimo), tiek ir YAC, iš kurio jis buvo išvestas, gale. Penkių YAC apačioje (žemiau horizontalios punktyrinės linijos) vieno arba daugiau STS, kurių buvimo tikėtasi (remiantis nustatyta STS eile), nebuvo rasta (tai buvo nustatyta, testuojant atskiras YAC su atitinkamais STS specifiniais PCR bandymais mažiausiai du kartus), ir jie pažymėti neužtušuotais ratukais atitinkamose padėtyse. Dauguma YAC buvo išskirta iš bibliotekos, išvestos iš žmogaus-žiurkėno hibridinių ląstelių [Green et al., *Genomics*, 25:170-183 (1995)]; nurodyti jų pradiniai pavadinimai. Likusios YAC buvo išskirtos iš bendrų žmogaus genomo bibliotekų, ir jų padėtys pradinėje bibliotekoje duotos 3 lentelėje. Trijų YAC, kurio buvo rastos panaudojant FISH analizę, 7q31.3 žemėlapiu nustatymui, pavadinimai apibrėžti keturkampiais (yWSS691, yWSS999 ir yWSS2935). Sankaupa parodyta "neiškaičiuotoje" formoje, kur YAC dydžiai nepanaudoti klonų persiklojimo arba STS atstumų įvertinimui, ir todėl parodyti atstumai yra vienodi. "Iškaičiuotoje" formoje, kurioje santykinų atstumų, skiriančių kiekvieną gretimų STS porą, įvertinimui panaudoti YAC dydžiai, o taip pat ir klonų persiklojimo dydis, bendra YAC sankaupa apima net daugiau nei 2 Mb.

SMULKUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šis išradimas yra susijęs su baltymo, čia vadinamo ob polipeptidu arba leptinu, bei nukleino rūgščių, koduojančių baltymą, įskaitant jų degeneracines variacijas, pvz., kurios įterpia optimalius ekspresijos kodonus į atitinkamą ekspresijos sistemą, išaiškinimu ir atradimu; šis baltymas rodo sugebėjimą dalyvauti žinduolio kūno svorio kontrolėje. Išradimo nukleino rūgštys atstovauja koduojančias sekas, atitinkančias pelės ir žmogaus OB polipeptidą, kuris, kaip manoma, vaidina esminį vaidmenį kūno svorio ir nutukimo reguliavime. Čia pateikti duomenys rodo, kad išradimo nukleino rūgščių polipeptidinių produktą išskiria ląstelės, kurios jį ekspresuoja, ir, kad polipeptidas funkcionuoja kaip hormonas. Papildomi eksperimentiniai duomenys rodo, kad OB polipeptidas yra labai efektyvus, gydant pelių, turinčių *ob* geno mutaciją, nutukimą. Be to, didelės OB

polipeptido porcijinės dozės arba vidutinės tęstinės dozės veikia į normalių (laukinio tipo) pelių svorio sumažėjimą.

Be to, čia pateikti pavyzdžiai rodo, kad OB polipeptidas, kitaip čia vadinamas “leptinu”, cirkuliuoja pelės, žiurkės ir žmogaus plazmoje. Leptino nėra *ob/ob* pelių plazmoje, *db/db* pelių plazmoje jo koncentracija yra dešimt kartų didesnė, o *fa/fa* žiurkių plazmoje - dvidešimt kartų didesnė. Ypatingai svarbu, kad rekombinantinio leptino kasdienės injekcijos drastiškai mažina *ob/ob* pelių kūno masę, pastebimai veikia laukinio tipo pelių kūno svorį ir neturi įtakos *db/db* pelėms.

Dar kitu požiūriu, vienų rūšių OB polipeptidas yra biologiškai aktyvus kitose rūšyse. Ypatingai žmogaus OB polipeptidas yra aktyvus pelėse.

Pirmiausiai šis išradimas yra skirtas medžiagų, kurios funkcionuoja kaip žinduolių kūno svorio modulatoriai, identifikavimui. Šis išradimas yra susijęs su tam tikrų nukleino rūgščių, kurios atitinka OB geną arba jo koduojančią sritį tiek pelėse, tiek ir žmonėse, išskyrimu, išvalymu ir sekų nustatymu, o taip pat ir su atitinkamais polipeptidais, kuriuos ekspresuoja šios nukleino rūgštys. Taigi, šis išradimas apima atradimą nukleino rūgščių, kurios duotos fig. 1A-E (SEQ ID NO:1) ir fig. 2A ir B (SEQ ID NO:3), jų degeneracinių variantų, alelių ir fragmentų, kurie visi pasižymi kūno svorio ir nutukimo moduliacijos aktyvumu. Šių nukleino rūgščių atitikimas OB genui pranašauja jų didelę įtaką į būsenas, tokias kaip nutukimas, o taip pat ir į kitas ligas ir disfuncijas, kuriose nenormalus kūno svoris yra duodantis įnašą faktorius. Išradimas išsiplėčia iki baltymų, kuriuos ekspresuoja išradimo nukleino rūgštys, ypač iki tokių baltymų, kurie pavaizduoti fig. 1A-E (SEQ ID NO:2), fig. 3 (SEQ ID NO:4), fig. 5 (SEQ ID NO:5) ir fig. 6 (SEQ ID NO:6), o taip pat išsaugotų variantų, aktyvių fragmentų ir giminingų mažų molekulių.

Kaip buvo minėta anksčiau, svorio kontrolės moduliaciniai peptidai, jų rišantys partneriai arba kiti ligandai bei agentai, pasižymintys jų imitavimu arba antagonizmu jiems, arba kontroliuojantys jų gaminimąsi, gali būti paruošiami farmacinių kompozicijų pavidalu kartu su tinkamu nešikliu, turinčių pakankamą efektyvumą, kad jas būtų galima vartoti įvairiais būdais pacientų, kurie pasižymi nenormaliais kūno svorio nukrypimais arba yra nutukę, kai šie nukrypimai yra atskiri arba jie sudaro dalį nepalankių medicininių būsenų, tokių kaip vėžys arba AIDS, gydymui. Gali būti panaudoti įvairūs vaistų vartojimo būdai, įskaitant oralinį, nazalinį ir kitus transmukozinio vartojimo būdus, parenterines

metodikas, tokias kaip subkutaninės, intraveninės ir intraperitoninės injekcijos, kateterius ir pan. Atpažinimo faktorių arba jų subvienetų vidutiniai kiekiai gali kisti, konkrečiu atveju jie turi priklausyti nuo kvalifikuoto gydytojo arba veterinoriaus rekomendacijų ir nurodymų.

Išeinant iš to, kas aprašyta aukščiau, gali būti pagaminta test-sistema, skirta potencialių vaistų, galinčių imituoti arba antagonizuoti svorio moduliatorių aktyvumą, skyrinui. Svorio modulatorius gali būti įvestas į test-sistemą, o laukiamas vaistas gali būti taip pat įvestas į gaunamą ląstelių kultūrą, ir po to ši kultūra yra tiriama, stebint ar yra ląstelių aktyvumo pakitimai, atsiradę arba dėl to, kad buvo pridėtas vien tik laukiamas vaistas, arba dėl to, kad buvo pridėti žinomo svorio modulatoriaus tam tikri kiekiai.

Kaip anksčiau minėta, čia aprašyto OB geno molekulinis klonavimas leido identifikuoti klasę medžiagų, kurio funkcionuoja molekuliniame lygyje, moduluodamos žinduolio kūno svorį. Moduliatorių pagal išradimą atradimas turi svarbią reikšmę mitybos sutrikimų diagnozavimui ir gydymui, įskaitant, bet neapsiribojant, nutukimą, svorio praradimą, susijusį su vėžiu, ir gydant ligas, susijusias su nutukimu, tokias kaip hipertenzija, širdies ligos ir II tipo diabetas. Be to, šio geninio produkto panaudojimas galimas ir žemės ūkyje, tais atvejais, kai norima moduluoti naminių gyvulių kūno svorį. Pagaliau, priimant dėmesį, kad vienas arba daugiau šio išradimo moduliatorių yra sekretuotos molekulės, jie gali būti naudojami biocheminiam jų receptorių išskyrimui, naudojant klonavimo ekspresijos technologiją. Toliau duodamas aptarimas apie OB geną gali būti bendrai taikomas klasei moduliatorių, kurie sudaro šio išradimo dalį ir tokiu būdu turi būti suderintas laisvumas ir tokios interpretacijos sfera.

Kaip aukščiau minėta, OB polipeptido funkcinis aktyvumas gali būti įvertintas transgeniniu būdu. Šiuo požiūriu, gali būti panaudotas transgeninis pelės modelis. *ob* genas gali būti panaudotas komplementacijos tyrimuose, naudojant transgenines peles. Transgeniniai vektoriai, įskaitant virusinius vektorius arba kosmidinius klonus (arba fagų klonus), atitinkantys laukinio tipo kandidatinio geno lokusus, gali būti konstruojami, naudojant išskirtą *ob* geną. Kosmidės gali būti įvedamos į transgenines peles, naudojant aprašytas metodikas [Jaenisch, *Science*. 240:1468-1474 (1988)]. Tokie dariniai įvedami į vaisingus kiaušinėlius, gautus iš interkroso tarp F1 C57BL/6J *ob/ob* X DBA interkroso palikuonių. Tokiems krosams reikia naudoti C57BL/6J *ob/ob* kiaušidžių transplantantus,

norint gauti F1 gyvuliukus. Kaip kontrolinija yra naudojamos DBA/2J pelės, nes jos turi ... plaukų spalvą, kas yra svarbu, naudojant kiaušidžių transplantantus. Genotipas prie *ob* lokusų kosmidiniuose transgeniniuose gyvuliukuose gali būti nustatytas dauginant gyvuliukus su tamptariai surištomis RFLP arba mikrosatelitais, kurie flankuoja mutaciją ir kurie yra polimorfiniai tarp palikuonių linijų. Komplementacija bus pademonstruota tuo atveju, kai tam tikras darinys duos genetiškai nutukusį F2 gyvuliuką (tai galima nustatyti panaudojant RFLP analizę), liesą ir nediabetinį. Šiomis sąlygomis galutiniam komplementacijos patvirtinimui reikia, kad *ob/ob* arba *db/db* gyvuliukas, turintis transgeną, būtų sukryžmintas su *ob/ob* arba *db/db* kiaušidžių transplantantais. Šiame krose visi N2 gyvuliukai, kurie neturi transgeno, bus nutukę ir turės insulinui rezistentišką diabetą, o tie gyvuliukai, kurie turi transgeną, bus liesi ir turės normalias gliukozės ir insulino koncentracijas plazmoje. Genetine prasme, transgenas veikia kaip supresoriaus mutacija.

Kitu atveju, OB genai gali būti nustatomi, tiriant jų fenotipinius efektus, kai ekspresuojama antiprasminė orientacijoje laukinio tipo gyvuliukuose. Tokiu atveju slopinama laukinio tipo alelio ekspresija, ir gaunamas mutantinis fenotipas. RNR-RNR duplekso susidarymas (antiprasmė-prasmė) trukdo normaliam mRNR valdymui, ir taip dalinai arba pilnai pašalinamas laukinio tipo geno efektas. Ši metodika buvo panaudota TK sintezės audinio kultūroje inhibavimui ir *Kruppel* mutacijų *Drosophila* bei *Shiverer* mutacijų pelėse fenotipų gavimui [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)]. Svarbus tokio priėjimo privalumas yra tas, kad visos giminingos mRNR ekspresijos efektyviam inhibavimui reikalinga tik nedidelės geno dalies ekspresija. Tuo atveju bus įvestas antiprasminis transgenas, kontroliuojamas nuosavo promotoriaus arba kito promotoriaus, ekspresuoto tinkamo ląstelių tipo ir patalpintas aukščiau SV40 poliA vietos. Šis transgenas bus panaudotas transgeninėms pelėms gauti. Transgeninės pelės taip pat bus paveiktos kiaušidžių transplantantais, norint nustatyti ar *ob* heterozigotos yra jautresnės antiprasminio darinio efektams.

Toliau, OB geno produkto (OB polipeptido arba baltymo) biocheminės funkcijos išaiškinimas yra naudingas, identifikuojant mažas molekules-agonistus arba -antagonistus, kurios veikia jo aktyvumą.

Šiame aprašyme bus apibrėžti naudojami terminai, kurie yra duodami, pavyzdžiui, žemiau.

Terminas “kūno svorio modulatorius”, “modulatorius”, “modulatoriai” bei kitokie specifiniai neišvardinti variantai, kurie gali būti čia vartojami visame šios paraiškos aprašyme ir apibrėžtyje, atitinka vienu atveju tiek nukleotidus, tiek ir baltyminę medžiagą; pastaroji apima ir atskirus, ir mišrius baltymus. Tiksliau, aukščiau minėti terminai apima nukleotidus ir DNR, kurių sekos čia aprašytos ir pateiktos fig. 1A-E (SEQ ID NO:1) ir fig. 2A ir B (SEQ ID NO:3). Panašiai, baltymai, turintys čia aprašytus aminorūgščių sekų duomenis, pateiktus fig. 1A-E (SEQ ID NO:2) ir fig. 3 (SEQ ID NO:4) yra panašiai nagrinėjami kaip turintys aktyvumą vaizdą, išdėstytą visų medžiagų atžvilgiu tiek aprašyme, tiek ir apibrėžtyje. Atitinkami nukleotidai, pasižymintys iš esmės tokiu pačiu arba kitokiu aktyvumu, yra panašiai nagrinėjami, įskaitant iš esmės homologiškus jų analogus ir alelinius variantus. Taip pat panašiai nagrinėjami ir baltymai, pasižymintys iš esmės tokiu pačiu arba kitokiu aktyvumu, įskaitant apgalvotai modifikuotus baltymus, tokius kaip, pavyzdžiui, kryptingą mutagenezę, arba atsitiktinai modifikuotus per mutacijas šeimininko, kuris produkuoja modulatorius, organizme.

Kompozicija, kurioje yra “A” (kur “A” yra vienas baltymas, DNR molekulė, vektorius, rekombinantinio šeimininko ląstelė ir t.t.) laikoma iš esmės neturinti “B” (kur “B” yra vienas arba daugiau užteršiančių baltymų, DNR molekulių, vektorių ir t.t., išskyrus racemines “A” formas), jeigu “A” kompozicijoje yra bent 73% pagal svorį baltymų, DNR, vektorių (priklausomai nuo kategorijos, kuriai priklauso A ir B medžiagos). Geriausia, kai “A” kiekis A+B medžiagų kompozicijoje sudaro bent apie 90% pagal svorį, o dar geriau - jei 99% pagal svorį. Taip pat pageidautina, kad kompozicijoje, kuri iš esmės yra neužteršta, būtų tik vieno molekulinio svorio medžiagos, turinčios dominančių medžiagų aktyvumą arba charakteristikas.

OB polipeptidai

Terminas “baltymas”, kuris reiškia gamtoje atsirandantį polipeptidą ir “polipeptidas” čia naudojami pakaitomis *ob* geno produkto ir jo variantų atžvilgiu.

Terminas “subrendęs baltymas” arba “subrendęs polipeptidas” ypatingai reiškia OB geno produktą su pašalinta signaline seka (arba sulieto baltymo partneriu).

Kaip aukščiau minėta, specifiniuose realizavimo variantuose ob polipeptidai pagal išradimą apima polipeptidus, turinčius čia parodytas aminorūgščių sekas, pvz., SEQ ID NOS:2, 4, 5, 6 ir t.t., įskaitant ob polipeptidą, modifikuotą pakeičiant konservatyvią aminorūgštį, o taip pat jų biologiškai aktyvius fragmentus, analogus ir jų darinius. Čia naudojamas terminas “biologiškai aktyvus” reiškia specifinį polipeptido poveikį, įskaitant, bet neapsiribojant, specifinį susirišimą, pvz., su receptoriumi, antikūnu arba kita atpažįstančia molekule; signalo perdavimo kelių aktyvaciją molekuliname lygyje; ir/arba fiziologinių efektų, kuriuose tarpininkauja ob polipeptidas *in vivo*, indukciją (arba inhibiciją antagonistais). OB polipeptidai, įskaitant fragmentus, analogus ir darinius, gali būti pagaminti sintezės būdu, pvz., panaudojant gerai žinomas kietafazės arba tirpalo fazės peptidų sintezės metodikas. Pageidautina naudoti kietafazės sintezės metodiką. Kitu būdu, išradimo OB polipeptidai gali būti pagaminti, naudojant gerai žinomas genų inžinerijos metodikas, kaip aprašyta *infra*. Dar kitame realizavimo variante OB polipeptidas gali būti išskirtas, pvz., imunoafininio valymo būdu iš biologinio skysčio, tokio kaip plazma, serumas arba šlapimas (bet jais neapsiribojant), geriausia iš žmogaus plazmos, serumo arba šlapimo, o dar geriau iš subjekto, turinčio padidintą šio polipeptido ekspresiją, tokio kaip nutukęs asmuo, sergantis dėl OB receptoriaus mutacijos arba nutukimu, susijusiu su mutacija, atitinkančiu “riebumą”.

OB polipeptido fragmentai

Specifiniame realizavimo variante, šiame išradime svarstoma, kad gali būti svarbūs natūraliai atsirandantys OB polipeptido fragmentai. Peptido seka apima daugelį vietų, kurios dažniausiai yra proteolitinio skaldymo taikinys, pvz., arginino liekanos. Yra tikimybė, kad pilno ilgio polipeptidas gali būti suskaldytas vienoje arba keliuose tokio skaldymo vietose, susidarant biologiškai aktyviems fragmentams. Tokie biologiškai aktyvūs fragmentai gali arba agonizuoti arba antagonizuoti OB polipeptido funkcinį aktyvumą kūno svorio mažinimo atžvilgiu.

OB polipeptido analogai

Šiame išradime atskirai svarstomas OB peptido analogų, kurie yra charakterizuojami kaip turintys OB polipeptido biologinį aktyvumą, pvz., galintys specifiškai rištis su rišančiu ob peptido partneriu, tokie kaip OB receptorių, gavimas. Viena realizavimo variante analogas agonizuoja OB aktyvumą, t.y. jis funkcionuoja panašiai kaip ob peptidas. Geriau, kai OB agonistas yra efektyvesnis už natyvų baltymą. Pavyzdžiui, OB agonisto analogas gali rištis su OB receptoriais su didesne trauka arba rodo ilgesnį gyvavimo puslankį *in vivo*, arba stebimi abu šie atvejai. Vis tik aptariami ir OB peptido agonisto analogai, kurie yra mažiau efektyvūs, nei natyvus baltymas. Kita realizavimo variante analogas antagonizuoja OB aktyvumą. Pavyzdžiui, OB analogas, kuris rišasi su OB receptoriais, bet neindukuoja signalo perdavimo, gali konkuruojančiai inhibuoti natyvaus OB rišimąsi su receptoriais ir taip sumažinti OB aktyvumą *in vivo*. Toks OB antagonistų analogas gali taip pat turėti skirtingas nuo ob peptido savybes, pvz., ilgesnį (arba trumpesnį) gyvavimo puslankį *in vivo*, didesnę (arba mažesnę) rišimosi su OB receptoriais trauką, arba gali būti abu šie atvejai.

Viena šio išradimo realizavimo variante OB peptido analogas yra OB peptidas, modifikuotas pakeičiant aminorūgštis polipeptido padėtyse, kurios nėra esminės struktūros arba funkcijos požiūriu. Pavyzdžiui, kadangi yra žinoma, kad žmogaus OB peptidas yra biologiškai aktyvus pelėse, galima laukti, kad skirtingų aminorūgščių liekanų pakeitimas žmogaus sekoje, lyginant su pelės aminorūgščių seka, duos naudingus OB peptido analogus. Pavyzdžiui, serino liekanos 53 padėtyje arba 98 padėtyje arba abiejose (nepakeista peptido seka yra pavaizduota fig. 4) žmogaus peptide gali būti pakeistos, pvz., glicinu, alaninu, valinu, cisteinu, metioninu ar treoninu. Panašiai arginino liekana 92 padėtyje (fig.4) gali būti pakeista, pvz., asparaginu, lizinu, histidinu, glutaminu, glutamino rūgštimi, asparto rūgštimi, serinu, treoninu, histidinu ar cisteinu. Dar kartą grįžtant prie fig. 4, kitos aminorūgštys žmogaus OB peptide, kurios gali būti pakeistos, yra histidinas 118 padėtyje, triptofanas 121 padėtyje, alaninas 122 padėtyje, glutamino rūgštis 126 padėtyje, treoninas 127 padėtyje, leucinas 128 padėtyje, glicinas 132 padėtyje, glicinas 139 padėtyje, triptofanas 159 padėtyje, ir glicinas 166 padėtyje. Kita realizavimo variante gali būti pakeista viena arba daugiau 121-128 liekanų (kaip parodyta fig. 4), pvz., glicinas

arba alaninas, arba pakeičiamos kai kurios liekanos, išskyrus seriną 123 padėtyje arba leuciną 125 padėtyje.

Kitame realizavimo variante OB polipeptido analogas, geriausia žmogaus OB polipeptidas, yra sutrumpinta polipeptido forma. Pavyzdžiui, jau buvo parodyta, kad glutamino liekana 49 padėtyje nėra esminė ir ji gali būti pašalinta iš peptido. Panašiai galima pašalinti kai kurias arba visas skirtingas aminorūgščių liekanas 121-128 padėtyse. Be to, išradime aptariamas OB analogo, turinčio minimalią aminorūgščių seką, reikalingą biologiniam aktyvumui, pagaminimas. Tą galima nesunkiai nustatyti, pvz., tikrinant OB fragmentų aktyvumą jų sugebėjimo susirišti su OB specifiniais antikūnais atžvilgiu, natyvaus OB polipeptido aktyvumo inhibavimą arba natyvaus OB peptido agonizavimą. Viename realizavimo variante išradime siūlomas sutrumpintas OB polipeptidas, turintis kilpinę struktūrą, sudarytą per disulfidinį ryšį, kuris susidaro tarp cisteino liekanų 117 ir 167 padėtyse (kaip parodyta fig. 4). Kitame realizavimo variante sutrumpintas analogas atitinka aminorūgščių seką nuo 22 liekanos (kuri eina po laukiamos signalinio peptido skaldymo vietos) iki 53 liekanos (aminorūgšties liekana, esanti prieš pat lanksčios kilpos sritį, nustatomą limituotos proteolizės būdu, po kurios atliekama OB polipeptido masių spektrometrinė analizė; žr. Cohen *et al.*, *Protein Science*, 4:1088 (1995)). Kitame realizavimo variante sutrumpintas analogas atitinka aminorūgščių seką nuo 61 liekanos (liekana einanti tuojau pat po lanksčios kilpos srities; tas buvo nustatyta panaudojant OB polipeptido limituotą proteolizę ir masių spektrometrinę analizę) iki 116 liekanos (liekana, esanti prieš pirmąją cisteino liekaną). Dar viename realizavimo variante sutrumpintas analogas atitinka aminorūgščių seką nuo 61 iki 167 aminorūgšties.

Be to, yra pakeista viena arba daugiau lanksčios kilpos liekanų ties 54 ir 60 liekanomis. Pavyzdžiui, viena arba daugiau liekanų gali būti pakeistos lizinu, glutamino rūgštimi arba cisteinu (geriau lizinu) kryžminiam sujungimui, pvz., su polimeru, nes lanksčios kilpos struktūros yra pageidautinos baltymo darinių susidarymo vietos. Kitu atveju, liekanos lanksčios kilpos padėtyse gali būti pakeistos aminorūgščių liekanomis, kurios yra labiau atsparios proteolizei, bet išlaiko lanksčią struktūrą, pvz., vienu arba keletu prolinų. Dar viename realizavimo variante nagrinėjamas pakeitimas aminorūgščių liekanų, kurios toliau gali būti panaudotos dariniams gauti, kad jie būtų atsparesni degradacijai, pvz., proteolizei.

Šios srities specialistams bus suprantama, kad aukščiau aprašytų fragmentų dydžiai yra apytikriai, ir, kad prie vieno arba dviejų galų gali būti prijungta nuo vienos iki maždaug penkių aminorūgščių, arba minėtuose sutrumpintuose analoguose gali būti įterpiama į polipeptido arba jo fragmentų vidurį, išskyrus tai, kad disulfidiniu ryšiu sujungtuose kilpą turinčiuose analoguose cisteino liekanos turi išlikti.

Buvo nustatyta, kad pelės OB peptidas turi 50% α -spiralinės dalies, o žmogaus OB polipeptidas turi apie 60% α -spiralinės dalies, kas matosi iš rekombinantinių peptidų cirkuliarinio dichroizmo duomenų beveik fiziologinėse sąlygose. Iš to seka, kad kitame realizavimo variante aminorūgščių liekanos gali būti pakeistos liekanomis, kad susidarytų OB polipeptido analogai, kurie turėtų polinkį sudaryti, arba kurie sudarytų stabilesnes α -spiralines struktūras. Pavyzdžiui, labiau susidarytų α -spiralinė struktūra, jei Glu, Ala, Leu, His, Trp būtų įvedami kaip pakaitai vietoje natyviame OB polipeptide esančių aminorūgščių liekanų. Geriausiai naudoti įprastus aminorūgščių pakeitimus, pvz., pakeisti asparagino rūgštį 29, 30, 44, 61, 76, 100 ir/arba 106 padėtyje (kaip parodyta fig. 4) glutamino rūgštimi(s) (Glu); pakeisti izoleuciną(us) leucinu; pakeisti gliciną arba valiną arba kitą skirtingą aminorūgštį alaninu (pvz., žmogaus OB polipeptide 53 padėtyje esanti seriną alaninu), pakeisti argininą arba liziną histidinu ir pakeisti tiroziną ir/arba fenilalaniną triptofanu. α -Spiralinės struktūros kiekio arba, kas dar svarbiau, stabilumo padidinimas gali duoti OB analogą, pasižymintį didesniu aktyvumu, padidinta surišimo geba arba ilgesniu gyvavimo puslaikiu. Specifiniame realizavimo variante yra padidintas OB peptido, atitinkančio 22-53 aminorūgštis, dalies spiralinės struktūros susidarymo potencialas. Kitame realizavimo variante yra padidintas 61-116 aminorūgščių liekanų spiralinės struktūros susidarymo potencialas arba stabilumas. Dar viename realizavimo variante yra padidintas disulfidinės kilpinės struktūros, atitinkančios 117-167 aminorūgštis, spiralinės struktūros susidarymo potencialas. Aptariamai taip pat ir OB analogai, turintys padidintą α -spiralės susidarymo potencialą arba stabilumą daugiau nei vienoje iš aukščiau minėtų dalių. Dar viename realizavimo variante išskiriami sutrumpinti OB polipeptido analogai, į kuriuos įeina formuojančios struktūrą, pvz., formuojančios spiralę aminorūgščių liekanos, kad būtų kompensuojamas polipeptido fragmentų didesnis polinkis nestabilios struktūros susidarymui.

Analogus, tokius kaip fragmentai, galima gauti, pavyzdžiui, panaudojant svorio modulatoriaus peptidinės medžiagos skaldymą pepsinu. Kiti analogai, tokie kaip mutacijas turinčios molekulės, gali būti gaunami, panaudojant svorio moduliatorių koduojančių sekų standartinę kryptingą mutagenezę. Analogai, pasižymintys “svorio moduliavimo aktyvumu”, tokie kaip mažos molekulės, funkcionuojančios kaip promotoriai arba inhibitoriai, gali būti identifikuojamos žinomais *in vivo* ir/arba *in vitro* bandymais.

Mažos molekulės-analogai ir OB polipeptido peptidiniai imitatoriai

OB polipeptido, geriausiai žmogaus OB polipeptido, struktūra gali būti tiriama įvairiais žinomais būdais. Baltymo seka gali būti charakterizuojama, panaudojant hidrofiliškumo analizę [pvz., Hopp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:3824 (1981)]. Hidrofiliškumo profilis gali būti panaudotas OB polipeptido hidrofobinių ir hidrofilinių sričių identifikavimui, kuris gali parodyti sritis, paslėptas susilanksčiusio polipeptido viduje, ir sritis, esančias polipeptido išorėje. Be to, gali būti atlikta antrinės struktūros analizė [pvz., Chou *et al.*, *Biochem.*, 13:222 (1974)], norint nustatyti OB polipeptido sritis, kurios apsprendžia specifines antrinės struktūras. Numatytų arba nustatytų struktūrų, įskaitant antrinės struktūros numatymą, manipuliaciją galima atlikti, naudojant šioje srityje žinomas kompiuterines programas.

Apsirūpinus nemažu rekombinantinio OB polipeptido kiekiu pagal šį išradimą, galima atlikti kiekybinį polipeptido struktūros įvertinimą. Ypatingai turint pakankamai medžiagos, galima atlikti branduolių magnetinio rezonanso (BMR), infraraudonųjų spindulių (IR), Ramano ir ultravioletinių spindulių (UV), ypač cirkuliarinio dichroizmo (CD), spektrinę analizę. Ypatingai BMR yra labai galingas molekulių, esančių tirpale, kuriame artimiau priartėjama prie jų natyvaus apsupimo, struktūrinės analizės metodas [Marion *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 113:967-974 (1983); Bar *et al.*, *J. Magn. Reson.*, 65:355-360 (1985); Kimura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1681-1685 (1980)]. Taip pat gali būti panaudoti ir kiti struktūrinės analizės metodai. Tarp jų patenka, bet neapsiribojama, rentgeno spindulių kristalografija [Engstrom, *Biochem. Exp. Biol.*, 11:7-13 (1974)].

Dar kitame realizavimo variante OB polipeptido analogas gali būti tyrinėjamas, norint nustatyti, ar jis susijungia su antikūnu, specifiniu natyviu OB polipeptidui arba jo specifiniams fragmentams. Susijungimo laipsnis duoda informaciją apie baltymų struktūrinę homologiją arba panašumą, arba apie sričių, atitinkančių polipeptido dalis, kurios buvo panaudotos fragmentams specifiškiems antikūnams gauti, prieinamumą.

OB analogų skryningas

Polipeptidų analogų skryningui yra žinomos įvairios skryningo metodikos. Gaunami įvairių chemikalų rinkiniai. Tuo būdu, šiame išradime nagrinėjamas tokių rinkinių, pvz., sintetinių junginių, sukurtų per ilgą tyrimų laikotarpį, gamtinių junginių rinkinių ir kombinuotų rinkinių, kaip smulkiau aprašyta, *infra*, kaip OB polipeptido analogų skryningas. Viename realizavimo variante šiame išradime aptariamas tokių rinkinių, kaip junginių, kurie rišasi su anti-OB polipeptido antikūnais, geriausia anti-žmogaus ob polipeptido antikūnais, skryningas. Kitu požiūriu, jeigu yra identifikuotas OB receptoriaus (žr. *infra*), gali būti panaudota bet kokia žinoma skryningo metodika, norint atrinkti OB receptoriaus agonistus arba antagonistus. Šiame išradime aptariama mažų molekulių-ligandų arba ligandų analogų ir imitatorių, o taip pat gamtinių ligandų, kurie rišasi arba agonizuoja arba antagonizuoja OB receptoriaus aktyvavimą *in vivo*, skryningas.

Pirminės receptoriaus sekos žinojimas ir šios sekos panašumas su žinomos struktūros baltymais gali duoti pradinį raktą baltymo agonistų arba antagonistų nustatymui. Antagonistų identifikavimas ir skryningas yra dar labiau palengvinamas, nustatant baltymo struktūrines ypatybes, pvz., panaudojant Rentgeno spindulių kristalografiją, neutronų difrakciją, branduolių magnetinio rezonanso spektrometriją ir kitas struktūros nustatymo metodikas. Tokios metodikos duoda galimybę racionaliai konstruoti arba identifikuoti agonistus ir antagonistus.

Kitame priėjime didelių rinkinių gavimui naudojamas rekombinantinis bakteriofagas. Naudojant šį "fago metodą" [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)], gali būti gaminami labai dideli rinkiniai (10^6 - 10^8 cheminių darinių). Antrajame priėjime pirmiausia naudojami cheminiai metodai, kurių pavyzdžiais gali būti

Geysen metodas [Geysen *et al.*, *Molecular Immunology*, 23:709-715 (1986); Geysen *et al.*, *J. Immunologic Method*, 102:259-274 (1987)] ir neseniai aprašytas Fodor *et al.*, *Science*, 251:767-773 (1991) metodas. 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 (US patentas Nr. 4631211, publikuotas 1986 m. gruodžio mėn.) ir Rutter *et al.* (US patentas Nr. 5010175, publikuotas 1991 m. balandžio mėn.) aprašo peptidų mišinių, kurie gali būti tiriami kaip agonistai arba antagonistai, gavimo būdus.

Kitu aspektu sintetiniai rinkiniai [Needels *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10700-10704 (1993); Lam *et al.*, WO 92/00252, abu čia duodami pilnai] ir panašūs gali būti panaudoti OB receptoriaus ligandų pagal šį išradimą skryningui. Esant tokiems rinkiniams, galima nustatyti receptoriaus antagonistus, panaudojant ląstelių, kurios ekspresuoja receptorių, neklonuojant OB receptoriaus.

Kitu būdu, gali būti atlikti tirpaus ligando susijungimo su ląstelėmis, kurios ekspresuoja OB receptoriaus ligando rišančios vietos rekombinantines formas, bandymai. Tirpūs ligandai gali būti lengvai gaunami kaip rekombinantinis arba sintetinis OB polipeptidas.

Galima atlikti skryningą su rekombinantinėmis ląstelėmis, kurios ekspresuoja OB receptorių, arba, kitaip, panaudojant išvalytą receptoriaus baltymą, pvz., gautą rekombinantiniu būdu, kaip aprašyta aukščiau. Pavyzdžiui, rinkinių skryningui gali būti panaudotas žymėto, tirpaus arba soliubilizuoto OB receptoriaus, kuris turi ligandą rišančią molekulinę dalį, sugebėjimas surišti ligandą, kaip aprašyta aukščiau duotuose literatūros šaltiniuose.

OB polipeptidų dariniai

Bendrai imant, galima pagaminti šio baltymo (naudojamas terminas “baltymas” čia apima “polipeptidą”, jeigu kitaip nepažymėta) darinius, prijungiant vieną arba daugiau cheminių liekanų prie baltymo liekanos. Chemiškai modifikuoti dariniai toliau gali būti panaudoti intraarterinio, intraperitoninio, intraraumeninio, subkutaninio, intraveninio, peroralinio, nazalinio, rektalinio, bukalinio, poliežuvinio, pulmonalinio, topinio, transderminio vartojimo būdams skirtų kompozicijų gavimui. Buvo rasta, kad biologiškai

aktyvių baltymų cheminė modifikacija duoda papildomą naudą, esant tam tikroms aplinkybėms, tokią kaip terapinio baltymo stabilumo ir cirkuliacijos laiko padidėjimas ir imunogeniškumo sumažėjimas. Žr. US patentą Nr. 4179337 (Davis *et al.*, publikuotas 1979 m. gruodžio 18 d.). Apžvalga duota Abuchowski *et al.*, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", in *Enzymes as Drugs*, pp. 367-383, Holcenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, (1981). Apžvalginis straipsnis, aprašantis baltymo modifikaciją ir sulietus baltymus yra Francis, *Focus on Growth Factors*, 3:4-10 (1992).

Cheminės medžiagos dariniams gauti

Cheminės medžiagos, tinkamos dariniams gauti, gali būti pasirinktos iš vandenyje tirpių polimerų. Pasirinktas polimeras turi būti tirpus vandenyje, kad prie jo prijungtas baltymas neiškristų į nuosėdas vandeninėje terpėje, tokioje kaip fiziologinė terpė. Geriausia, kad galutinis produktas, skirtas terapiniam naudojimui, būtų sujungtas su farmaciškai tinkamu polimeru. Šios srities speciaslistas gali parinkti pageidaujamą polimerą, remiantis tokiais svarstymais, ar polimero/baltymo konjugatas bus naudingas terapijoje ir, jeigu taip, pasirinks norimą dozę, cirkuliacijos laiką, atsparumą proteolizei ir t.t. Išradimo baltymams ir peptidams šiuos parametrus galima nustatyti, panaudojant čia duodamus bandymus.

Polimerų molekulės

Vandenyje tirpus polimeras gali būti pasirinktas iš grupės, kurią sudaro, pavyzdžiui, polietilenglikolis, etileno glikolio/propileno glikolio kopolimerai, karboksimetilceliuliozė, dekstranas, polivinilo alkoholis, polivinilpirilidonas, poli-1,3-dioksolanas, poli-1,3,6-trioksanas, etileno/maleino anhidrido kopolimeras, poliaminorūgštys (kopolimerai arba bet kokie kopolimerai) ir dekstranas arba poli(n-vinilpirolidon)polietileno glikolis, propileno glikolio kopolimerai, polipropileno oksido/etileno oksido kopolimerai, polioksietilinti polioliai ir polivinilo alkoholis. Polietileno glikolio propionaldehidas turi privalumų gamyboje dėl to, kad vandenyje jis yra stabilus.

Polimeras gali būti bet kokio molekulinio svorio; jis gali būti šakotas arba nešakotas. Polietilenglikolio atveju tinkamiausias molekulinis svoris yra maždaug 2-100 kDa ribose (terminas „maždaug“ reiškia, kad polietilenglikolio preparatuose kai kurios molekulės svers daugiau, kai kurios mažiau, nei nurodytas molekulinis svoris); toks svoris palengvina gamybą ir panaudojimą. Gali būti naudojamos ir kitokio dydžio molekulės, priklausomai nuo norimo terapinio profilio (pvz., norimos išskyrimo trukmės, įtakos (jeigu tokia yra) į biologinį aktyvumą, vartojimo palengvinimo, antigeniškumo laipsnio arba jo nebuvimo ir kitų žinomų polietilenglikolio efektų terapiniam baltymui arba analogui).

Polimero/baltymo santykis

Taip prijungtų polimero molekulių skaičius gali būti kintamas, ir šios srities specialistas galės užtikrinti jo efektą į poveikį. Gali būti pagaminti monodariniai, arba di-, tri-, tetradariniai arba jų kombinacijos su ta pačia arba skirtingomis cheminėmis medžiagomis (pvz., polimerais, tokiais kaip skirtingo svorio polietilenglikoliai). Polimero molekulių santykis su baltymo (arba peptido) molekulėmis keisis, keičiantis jų koncentracijoms reakcijos mišinyje. Bendrai imant, optimalus santykis (reakcijos efektyvumo požiūriu, t.y. kad nelieka nesureagavusio baltymo arba polimero) bus apspredžiamas faktoriais, tokiais, kaip norimas darinio sudarymo laipsnis (pvz., mono-, di-, tri- ir t.t.), pasirinkto polimero molekulinis svoris, ir priklausys nuo to, ar polimeras yra šakotas ar nešakotas, ir nuo reakcijos sąlygų.

Cheminės medžiagos prijungimas prie baltymo

Polietilenglikolio molekulės (arba kitokios cheminės medžiagos) turi būti prijungiamos prie baltymo, atsižvelgiant į funkcinį poveikį arba baltymo antigenines sritis. Yra daugybė prijungimo būdų, prieinamų šios srities specialistui, pvz., EP 0 401 384 čia duodamas kaip literatūros šaltinis (PEG prijungimas prie G-CSF). Žr. taip pat Malik *et al.*, *Exp. Hematol.*, 20:1028-1035 (1992) (aprašanti GM-CSF polietilenglikolinimą, naudojant trezilo chloridą). Pavyzdžiui, polietilenglikolis gali būti kovalentiškai prijungtas per aminorūgščių liekanas, panaudojant reaktingas grupes, tokias kaip laisva amino- arba

karboksi-grupė. Reaktingos grupės yra tokios, prie kurių gali būti prijungta aktyvuoto polietilenglikolio molekulė. Aminorūgščių liekanos, turinčios laisvą aminogrupę, gali būti lizino liekanos ir N-galinės aminorūgšties liekanos, o liekanos, turinčios laisvą karboksigrupę, gali būti asparto rūgšties liekana, glutamino rūgšties liekana ir C-galinės aminorūgšties liekana. Sulfhidrilo grupės taip pat gali būti panaudotos, kaip reaktingos grupės polietilenglikolio molekulės(ių) prijungimui. Terapiniams tikslams geriausia prijungti prie aminogrupės, tokios kaip N-galinė grupė arba lizino grupė. Jeigu norima, kad susidarytų receptorinis ryšys, reikia vengti prijungimo prie liekanų, svarbių receptorinio ryšio susidarymui.

Baltymai, turintys chemiškai modifikuotą N-galą

Gali būti pageidaujamas baltymas, turintis chemiškai modifikuotą N-galą. Naudojant polietilenglikolį tokių kompozicijų iliustravimui, galima pasirinkti įvairias polietilenglikolio molekules (pagal molekulinį svorį, išsišakojimą ir t.t.), polietilenglikolio molekulių santykį su baltymo (arba peptido) molekulėmis reakcijos mišinyje, vykdomos polietilenglikolinimo reakcijos tipą ir pasirinkto N-gale polietilenglikolinto baltymo gavimo būdą. N-gale polietilenglikolinto preparato gavimo būdas (t.y. šios medžiagos atskyrimas nuo kitų monopolietilenglikolintų medžiagų, jeigu to reikia) gali būti N-gale polietilenglikolintos medžiagos išskyrimas iš polietilenglikolintų baltymo molekulių populiacijos. Selektivi N-galo cheminė modifikacija gali būti realizuota, panaudojant redukcinį alkilinimą, kuriame naudojamas skirtingų tipų pirminių aminogrupių (lizino lyginant su N-galine aminogrupe) skirtingas reaktingumas, ypač tinkamas baltymo dariniams gauti. Esant atitinkamoms reakcijos sąlygoms, galima pasiekti iš esmės selektyvų baltymo N-galinio darinio gavimą su karbonilo grupę turinčiu polimeru. Pavyzdžiui, galima selektyviai polietilenglikolinti baltymo N-galą, vykdant reakciją tokiame pH, kuris leidžia pasinaudoti lizino liekanų ϵ -aminogrupių ir baltymo N-galinės aminogrupės pK_a skirtumais. Tokioje selektyvioje darinių gavimo reakcijoje kontroliuojamas vandenyje tirpaus polimero prijungimas prie baltymo: daugiausia vyksta polimero prijungimas prie baltymo N-galo, o kitos reaktingos grupės, tokios kaip lizino šoninės aminogrupės beveik nėra modifikuojamos. Naudojant redukcinį alkilinimą,

vandenyje tirpus polimeras turi būti aukščiau aprašyto tipo ir turi turėti vienintelę reaktingą aldehydo grupę susijungimui su baltymu. Gali būti panaudotas polietilenglikolio propionaldehidas, turintis vienintelę reaktingą aldehydo grupę.

Nukleino rūgštys, susijusios su OB polipeptidu

Kaip minėta aukščiau, šis išradimas susijęs su nukleino rūgštimis, koduojančioms ob polipeptidus, bei su genominiomis nekoduojančiomis sekomis 5', 3' ir introninėmis sekomis į OB geną. Taigi, pagal šį išradimą, gali būti naudojamos įprastos molekulinės biologijos, mikrobiologijos ir rekombinantinės DNR metodikos, žinomos šiose srityse. Tokios metodikos pilnai aprašytos literatūroje. Žr., pvz., 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, U.K. (1985); Gait ed., *Oligonucleotide Synthesis*, Oxford University Press (1984); Hames *et al.*, eds., *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag (1985); Hames *et al.*, eds., *Transcription And Translation*, Oxford University Press (1984); Freshney ed., *Animal Cell Culture*, Oxford University Press (1986); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press (1986); Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning*, Wiley, New York (1984). Šiam išradimui ypatingai svarbios yra išskyrimo, klonavimo, sekų nustatymo, analizavimo ir geno arba nukleino rūgšties charakterizavimo, panaudojant gerai žinomą polimerazės grandinės reakciją (PCR) metodiką, strategijos.

“Replikonas” yra bet koks genetinis elementas (pvz., plazmidė, chromosoma, virusas), kuris funkcionuoja kaip autonominis DNR replikacijos vienetas *in vivo*, t.y. gali replikuotis, kontroliuodamas pats save.

“Vektorius” yra replikonas, toks kaip plazmidė, fagas arba kosmidė, prie kurių gali būti prijungtas kitos DNR segmentas taip, kad vyktų prijungto segmento replikacija.

“Kasetė” reiškia DNR segmentą, kuris gali būti įterptas į vektorių specifinėse restrikcijos vietose. DNR segmentas koduoja norimą polipeptidą, o kasetė ir restrikcijos vietos projektuojamos taip, kad kasetė būtų įterpta į reikiamą transkripcijos ir translacijos nuskaitymo rėmelį

“Heterologinė” DNR reiškia DNR, kurios paprastai nėra ląstelėje arba ląstelės chromosominėje vietoje. Geriau, kai heterologinė DNR apima ląstelės svetimą geną.

Ląstelė yra “transfekuota” egzogenine arba heterologine DNR, kai tokia DNR įvesta į ląstelę. Ląstelė yra “transformuota” egzogenine arba heterologine DNR, kai transfekuota DNR veikia fenotipo pakeitimą. Geriausiu atveju, transformuojanti DNR turi būti integruota (kovalentiškai prijungta) į chromosominę DNR, papildant ląstelės genomą.

“Klonas” yra ląstelių, išvestų iš vienos ląstelės arba bendros kilmės ląstelių, panaudojant mitozę, populiacija.

“Nukleino rūgšties molekulė” reiškia ribonukleozidų (adenozino, guanozino, uridino arba citidino; “RNR molekulės”) arba dezoksiribonukleozidų (dezoksiadenozino, dezoksiguanozino, dezoksitimidino arba dezoksicitidino; “DNR molekulės”) fosfato esterio polimerinę tiek viengrandinę, tiek ir dvigrandinę spiralę. Galimos DNR-DNR, DNR-RNR ir RNR-RNR dvigrandinės spirалės. Terminas “nukleino rūgšties molekulė”, ypatingai DNR arba RNR molekulė, reiškia tik molekulės pirminę arba antrinę struktūrą ir neapsiriboja kokiomis nors ypatingomis tretinėmis arba ketvirtinėmis formomis. Taigi, šis terminas apima dvigrandinę DNR, rastą, tarp kitko, linijinėse arba cirkuliarinėse DNR molekulėse (pvz., restrikcijos fragmentas), plazmidėse ir chromosomose. Aptariant tam tikrų dvigrandininių DNR molekulių struktūrą, sekos gali būti aprašomos pagal įprastą susitarimą, duodant tik seką nuo 5' į 3' kryptimi išilgai netranskribuotos DNR grandies (t.y. grandis turi seką homologinę mRNR). “Rekombinantinė DNR molekulė” yra DNR molekulė, su kuria buvo atliktos molekulinės biologijos manipuliacijos.

Nukleino rūgšties molekulė yra “galinti hibridizuotis” su kita nukleino rūgšties molekule, tokia kaip kDNR, genomine DNR arba RNR, jeigu viengrandinė nukleino rūgšties molekulės forma gali susirišti su kita nukleino rūgšties molekule tam tikroje temperatūroje ir esant tam tikrai joninei jėgai (žr. Sambrook *et al.*, 1989, *supra*). Temperatūra ir joninė jėga apsprendžia hibridizacijos “griežtumą”. Preliminariniam homologinių nukleino rūgščių skryningui gali būti naudojamos nedidelio griežtumo hibridizacijos sąlygos, atitinkančios $T_m=55^{\circ}\text{C}$, pvz., $5 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, 0.25% pieno ir nenaudojant formamido; arba 30% formamido, $5 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS. Vidutinio griežtumo hibridizacijos sąlygos stitinka aukštesnę T_m , pvz., 40% formamido su $5 \times$ arba $6 \times \text{SCC}$.

Hibridizacijai reikalinga, kad dvi nukleino rūgštys turėtų komplementarias sekas, nors priklausomai nuo hibridizacijos griežtumo, yra galimas atitikimas tarp bazių. Atitinkamas griežtumas besihibridizuojančioms nukleino rūgštims priklauso nuo nukleino rūgšties ilgio ir komplementacijos laipsnio - gerai šioje srityje žinomų kintamųjų. Kuo didesnis dviejų nukleotidų panašumo arba homologijos laipsnis, tuo didesnė nukleino rūgščių, turinčių tokias sekas, hibridų T_m reikšmė. Santykinis nukleino rūgščių hibridizacijų stabilumas (atitinkantis aukštesnę T_m) mažėja tokia tvarka: RNR-RNR, DNR-RNR, DNR-DNR. Buvo išvestos T_m išskaičiavimo lygtys hibridams, kuriuos sudaro daugiau nei 100 nukleotidų (žr. Saambrook *et al.*, 1989, *supra*, 9.50-0.51). Kai hibridizuojasi trumpesnės nukleino rūgštys, t.y. oligonukleotidai, pasidaro svarbios atitikimo padėtytys, ir nukleotido ilgis apsprendžia jų specifiškumą (žr. Sambrook *et al.*, 1989, *supra*, 11.7-11.8). Minimalus besihibridizuojančių nukleino rūgščių ilgis yra maždaug apie 10 nukleotidų, geriau - apie 15 nukleotidų ir geriausia - bent apie 20 nukleotidų.

“Homologinė rekombinacija” reiškia vektoriaus svetimos DNR sekos įterpimą į chromosomą. Geriausia, kai vektorius taiko į specifinę chromosomos vietą homologinei rekombinacijai. Specifinės homologinės rekombinacijos atveju vektorius turi turėti pakankamai ilgas homologines sritis chromosomos sekoms, kad būtų pasiekiamas vektoriaus komplementarus susijungimas ir įsiterpimas į chromosomą. Ilgesnės homologijos sritys ir didesnės sekos panašumo laipsniai gali padidinti homologinės rekombinacijos efektyvumą.

DNR “koduojanti seka” yra dvigrandininė DNR seka, kuri yra transkribuojama ir transliuojama į polipeptidą ląstelėje *in vitro* arba *in vivo*, kai ji yra patalpinta joje, esant atitinkamų reguliatorinių sekų kontrolei. Koduojančios sekos ribas nustato start-kodonas 5' (amino) gale ir transliacijos stop-kodonas 3' (karboksi) gale. Koduojanti seka gali apimti (bet neapsiriboja) prokariotines sekas kDNR iš eukariotinės mRNR, genomines DNR sekas iš eukariotinės (pvz., žinduolių) DNR ir netgi sintetines DNR sekas. Jeigu koduojanti seka yra skirta ekspresijai eukariotinėje ląstelėje, poliadenilinimo signalas ir transkripcijos nutraukimo seka bus 3' padėtyje koduojančios sekos atžvilgiu.

OB koduojančių ir flankuojančių sekų išskyrimas

Kaip buvo pažymėta, išradime nagrinėjamos nukleino rūgštys apima ir kitas nukleino rūgštis, kurios koduoja peptidų ekspresiją, tokias kaip parodyta fig. 1A-D (SEQ ID NO:2), fig. 3 (SEQ ID NO:4), fig. 5 (SEQ ID NO:5) ir fig. 6 (SEQ ID NO:6). Tokiu būdu, kadangi buvo išskirta specifinė DNR ir nustatyta seka, susijusi su *ob* genu, geno, koduojančio šio išradimo peptidus, molekuliniam klonavimui nukleino rūgšties šaltiniu potencialiai gali būti bet kokio gyvūno ląstelė. Tokia DNR gali būti gaunama pagal žinomas standartines metodikas iš klonuotos DNR (pvz., DNR "bibliotekos"), cheminės sintezės būdu, klonuojant kDNR arba klonuojant genomine DNR arba jos fragmentus ir išskirta iš norimos ląstelės (žr., pavyzdžiui, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*; Glover, 1985, *supra*). Klonai, išvesti iš genomines DNR, be koduojančių sričių gali turėti reguliatorines ir intronines DNR sritis; klonai, išvesti iš kDNR, neturi introninių sekų. Koks bebūtų šaltinis, genas turi būti klonuotas molekulinio būdu į tinkamą geno dauginimui vektorių.

Geno iš genomines DNR molekuliniam klonavimui genomine DNR gali būti pagausinta, naudojant pradmenis, pasirinktus iš kDNR sekų. Kitu atveju, generuojami DNR fragmentai; kai kurie iš jų koduos norimą geną. DNR gali būti suskaldyta specifinėse vietose, naudojant įvairius restrikcijos fermentus. DNR fragmentavimui galima naudoti DNR-azę esant manganui, arba DNR gali būti fiziškai sukarpyta, pavyzdžiui, panaudojant ultragarsą. Tada linijinės DNR fragmentai gali būti atskirti vienas nuo kito pagal jų dydį, panaudojant standartines metodikas, įskaitant, bet neapsiribojant, agarozės ir poliakrilamido gelio elektroforezę ir kolonėlių chromatografiją.

Jeigu DNR fragmentai jau yra generuoti, specifinio DNR fragmento, turinčio norimą *ob* arba panašų į *ob* geną, identifikavimą galima atlikti daugeliu būdų. Pavyzdžiui, jeigu gaunamas nemažas kiekis *ob* arba panašaus į *ob* geno arba jo specifinės RNR arba jų fragmentų ir galima jį išvalyti bei pažymėti, generuotus DNR fragmentus galima atrinkti, panaudojant nukleino rūgšties hibridizaciją su žymėtu zonu [Benton *et al.*, *Science*, 196:180 (1977); Grunstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3961 (1975)]. Šiame išradime pateikiami tokie nukleino rūgščių zondai, kuriuos galima nesunkiai pagaminti iš čia aprašytų specifinių sekų, pvz., galintį hibridizuotis zondą, turintį nukleotidų seką, atitinkančią sekos, pavaizduotos fig. 1A-E (SEQ ID NIO:1) arba fig. 2A ir B (SEQ ID NO:3), mažiausiai 10, geriau 15 nukleotidų fragmentų. Pageidautina, kad pasirinktas fragmentas būtų labai charakteringas išradimo modulatoriniams peptidams.

Hibridizuosis tokie DNR fragmentai, kurie yra labai homologiški zondui. Kaip aukščiau minėta, kuo didesnis homologijos laipsnis, tuo griežtesnės hibridizacijos sąlygas reikia naudoti. Viena realizavimo variante homologinio modulatorinio peptido identifikavimui buvo panaudotas nedidelio griežtumo hibridizacijos sąlygos. Tačiau pageidautina, kaip čia buvo eksperimentiškai parodyta, hibridizuoti nukleino rūgštį, koduojančią išradimo modulatorinį peptidą, su nukleino rūgštimi, turinčią nukleotidų seką, parodytą fig. 1A-E (SEQ ID NO:1) arba fig. 2A ir B (SEQ ID NO:3) arba jos galinčiais hibridizuotis fragmentais, vidutinio griežtumo sąlygose, o dar geriau - labai griežtose sąlygose.

Kitaip, geno buvimą galima nustatyti bandymais, paremtais jo ekspresijos produkto fizikinėmis, cheminėmis arba imunologinėmis savybėmis. Pavyzdžiui, gali būti atrinkti kDNR klonai, arba DNR klonai, kurie selektyviai hibridizuojasi su nuosavomis mRNR, pagal produkuotą baltymą. pvz., turi panašią arba vienodą migraciją elektroforezėje, vienodą elgseną izoelektriniame fokusavime, proteolitinio skaldymo vaizdą, tirozin-fosfatazės aktyvumą arba antigenines savybes, kaip ir šie modulatoriniai peptidai. Pavyzdžiui, modulatorinių peptidų skryningui iš kitų šaltinių gali būti sėkmingai panaudoti šio išradimo antikūnai.

Genas, koduojantis šio išradimo modulatorinį peptidą, taip pat gali būti identifiкуotas pagal mRNR selekciją, t.y. pagal nukleino rūgšties hibridizaciją, einančią po transliacijos *in vitro*. Šioje metodikoje komplementarių mRNR išskyrimui, panaudojant hibridizaciją, vartojami fragmentai. Tokiais DNR fragmentais gali būti prieinama išvalyta modulatorinė DNR. Išskirtų mRNR produktų transliacijos *in vitro* produktų imunonusodinimo analizė arba funkciniai bandymai, pvz., tirozin-fosfatazės aktyvumas, identifiкуoja mRNR, o tuo pačiu ir komplementarius DNR fragmentus, kurie turi norimas sekas. Be to, specifinės RNR gali būti atrinktos pagal polisomų, išskirtų iš ląstelių, adsorbciją ant imobilizuotų antikūnų prieš modulatorinį peptidą.

Radiožymėta modulatorinio peptido kDNR gali būti sintezuota, naudojant pasirinktą mRNR (iš adsorbuotų polisomų) kaip matricą. Tada radiožymėta mRNR arba kDNR gali būti panaudota kaip zondas homologinių modulatorinio peptido DNR fragmentų atskyrimui nuo kitokių genominių DNR fragmentų.

Kaip aukščiau minėta, DNR seka, koduojanti svorio moduliacijos peptidus, kaip čia aprašoma, gali būti pagaminta geriau sintetiniu, negu klonavimo būdu. DNR seka gali būti sukonstruota su atitinkamais kodonais svorio moduliacijos peptido aminorūgščių sekoms. Bendrai imant, galima pasirinkti pageidaujamus kodonus norimam šeimininkui, jeigu ši seka bus naudojama ekspresijai. Pilna seka surenkama iš persidengiančių nukleotidų, gautų standartiniais metodais, ir sujungiama į pilną koduojančią seką. Žr., pvz., Edge, *Nature*, 292:756 (1981); Nambair *et al.*, *Science*, 223:1299 (1984); Jay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 259:6311 (1984).

Sintetinės DNR sekos įgalina patogiai konstruoti genus, kurie ekspresuos svorio moduliacijos analogus, kaip aprašyta aukščiau. Kitaip, DNR, koduojanti analogus, gali būti pagaminta, panaudojant natyvių OB genų kryptingą mutagenę arba kDNR, ir analogai gali būti gaunami tiesiogiai, panaudojant įprastą polipeptidų sintezę.

Bendras specifinės vietai negamtinių aminorūgščių įterpimo į baltymus metodas yra aprašytas Noren *et al.*, *Science*, 244:182-188 (1989). Šis metodas gali būti panaudotas ob polipeptido su negamtinėmis aminorūgštimis analogų sukūrimui.

Nekoduojančios nukleino rūgštys

Šis išradimas apima ir pagaminimą antiprasminių nukleotidų ir ribozimų, kurie gali būti panaudoti svorio moduliacijos baltymų ekspresijos trukdymui transliaciniame lygyje. Šiame priėjime naudojama antiprasminė nukleino rūgštis ir ribozimai specifinės mRNR transliacijos blokavimui, arba blokuojant mRNR antiprasmine nukleino rūgštimi arba suskaldant ją ribozimu.

Antiprasminės nukleino rūgštys yra DNR arba RNR molekulės, kurios yra komplementarios bent daliai specifinės mRNR molekulės [žr. Weintraub, *Sci. Am.*, 262:40-46 (1990); Marcus-Sekura, *Anal. Biochem.*, 172:289-295 (1988)]. Ląstelėje jos hibridizuojasi su šia mRNR, susidarant dvigrandininei mRNR. Ląstelė transliuoja sujungtos į tokią dvigrandininę formą mRNR. Todėl antiprasminės nukleino rūgštys trukdo baltymo mRNR ekspresijai. Ypatingai efektyvūs bus oligomerai, sudaryti iš maždaug penkiolikos nukleotidų, ir molekulės, kurios hibridizuojasi su AUG iniciacijos kodonu, kadangi jie yra lengvai sintezuojami, ir atrodo jie kelia mažiau problemų, negu

didesnės molekulės, kai jie įvedami į svorio moduliacijos peptidą produkuojančias ląsteles. Antiprasminiai metodai buvo panaudoti daugelio genų ekspresijos inhibavimui *in vitro* [Marcus-Sekura, 1988 *supra*; Hambor *et al.*, *J. Exp. Med.*, 168:1237-1245 (1988)].

Ribozimai yra RNR molekulės, galinčios specifiškai skaldyti kitas viengrandines RNR molekules šiek tiek panašiu į DNR restrikcijos endonukleazės būdu. Ribozimai buvo atrasti pastebėjus, kad tam tikros mRNR gali pašalinti savus intronus. Modifikuodami tokių RNR nukleotidų seką, tyrinėtojai galėjo sukurti molekules, kurios atpažįsta specifines nukleotidų sekas RNR molekulėje ir jas suskaldo [Cech, *J. Am. Med. Assoc.*, 260:3030-3034 (1988)]. Kadangi jie yra specifiški sekoms, inaktyvuojamos tiksliai tos mRNR, kurios turi specifinių sekų.

Tyrinėtojai identifikavo du ribozimų tipus - *tetrahymena*-tipą ir "kūjagalvio"-tipą. *Tetrahymena*-tipo ribozimai atpažįsta keturių bazių sekas, "kūjagalvio"-tipo atpažįsta 11-18 bazių sekas. Kuo ilgesnė atpažįstama seka, atrodo, kad atpažinimas įvyks išimtinai norimose mRNR. Todėl specifinių mRNR inaktyvavimui "kūjagalvio"-tipo ribozimai yra tinkamesni, negu *Tetrahymena*-tipo ribozimai, o 18 bazių atpažinimo sekos yra labiau pageidautinos nei trumpesnės atpažinimo sekos.

Taigi, čia aprašytos DNR sekos gali būti panaudotos antiprasminėms molekulėms, o ribozimai, kurie skaldo mRNR, svorio moduliacijos peptidams ir jų ligandams gauti, tokiu būdu inhibuojant *ob* geno ekspresiją ir padidinant svorio priaugimą ir nutukimą.

Kitame realizavimo variante pagal šį išradimą pateikiami trumpi oligonukleotidai, kurie yra komplementarūs koduojančioms ir komplementarioms OB nukleino rūgščių grandinėms, arba yra OB geno 5', 3' nekoduojančios sritys, arba vidinės (introninės) koduojančios sritys. Tokios nukleino rūgštys yra naudingos kaip zondai, arba kaip tiesiogiai pažymėti oligonukleotidiniai zondai, arba kaip pradmenys polimerazinės grandinės reakcijoms, kai norima nustatyti *ob* geno mutacijų buvimą arba OB mRNR ekspresijos lygį. Geriausia, kai išradimo nekoduojančios nukleino rūgštys yra iš žmogaus OB geno.

Specifiniame realizavimo variante nekoduojančios nukleino rūgštys duoda homologinę rekombinaciją dauginamo geno ir/arba kitos reguliatorinės sekos prie OB geno integracijai, pvz., duoda didesnius OB polipeptido lygius, arba įveikia mutacijas *ob* geno reguliatorinėse sekose, kas sumažina OB polipeptido ekspresijos įprastus lygius (žr.

tarptautinę paraišką WO 91/09955 (Chappel, 1991 m. liepos 11 d.); taip pat žr. tarptautinę paraišką WO 90/14092 (Kucherlapati ir Cambel, 1990 m. lapkričio 29 d.)).

OB polipeptido pagaminimas: ekspresija ir sintezė

Transkripcinės ir transliacinės kontrolinės sekos yra DNR reguliatorinės sekos, tokios kaip promotoriai, genai-stiprintojai, terminatoriai ir panašūs, kurie sukelia koduojančios sekos ekspresiją šeimininko ląstelėje. Eukariotinėse ląstelėse poliadenilavimo signalai yra kontrolinės sekos.

Koduojanti seka yra "kontroliuojama" transkripcinių arba transliacinių sekų ląstelėje, kai RNR polimerazė transkribuoja koduojančią seką į mRNR, kuri tada yra sujungiama trans-RNR ir transliuojama į baltymą, koduojamą koduojančios sekos.

"Signalinė seka" yra baltymo, kuris bus ekspresuojamas ant ląstelės paviršiaus, koduojančios sekos pradžioje. Ši seka koduoja signalinį peptidą N-gale prie subrendusio polipeptido, kuris nukreipia šeimininko ląstelę translokuoti polipeptidą. Terminas "translokacinė signalinė seka" taip pat naudojamas šiame aprašyme šios rūšies signalinei sekai apibūdinti. Gali būti rastos translokacinės signalinės sekos, susijusios su įvairiais baltymais, charakteringos eukariotams ir prokariotams ir dažnai funkcionuoja abiejų tipų organizmuose.

DNR seka yra "operatyviai prijungta" prie ekspresijos kontrolinės sekos, kai ekspresijos kontrolinė seka kontroliuoja ir reguliuoja DNR sekos transkripciją ir transliaciją. Terminas "operatyviai prijungta" reiškia tai, kad yra atitinkamas startinis signalas (pvz. ATG) prieš ekspresuojamą DNR seką ir išlaikymą teisingo skaitymo rėmelio, kuris leistų DNR sekos ekspresiją, kontroliuojamą ekspresijos kontrolinės sekos, ir gaminimąsi norimo produkto, koduojamo DNR sekos. Jeigu genas, kurį norime įterpti į rekombinantinę DNR molekulę, neturi atitinkamo startinio signalo, toks startinis signalas gali būti įterptas aukštyne einančia 5' kryptimi ir į skaitymo rėmelį su genu.

"Promotoriaus seka" yra DNR reguliatorinė sritis, galinti susijungti su RNR polimeraze ląstelėje ir inicijuoti transkripciją koduojančios sekos žemyn einančia kryptimi (3' kryptimi). Su šiuo išradimu susijusiems tikslams promotoriaus seka yra prijungta prie jo 3' galo transkripcijos iniciacijos vietos ir tęsiasi aukštyne einančia kryptimi (5' kryptimi),

apimant minimalų bazių arba elementų, reikalingų inicijuoti transkripcijai, esant didesniems nei fonas kiekiam, skaičių. Promotoriaus sekoje bus randama transkripcijos iniciacijos vieta (ją patogiu nustatyti, pavyzdžiui, su nukleaze S1), o taip pat ir baltymą rišančios dalys (konsensuso sekos), atsakingos už RNR polimerazės prijungimą.

Kita šio išradimo ypatybė yra čia aprašyta DNR sekų ekspresija. Gerai žinoma, kad DNR sekos gali būti ekspresuojamos, veiksmingai prijungiant jas prie ekspresijos kontrolinės sekos tinkamame vektoriuje ir naudojant tokį ekspresijos vektorių tinkamo vienaląsčio šeimininko transformavimui.

Toks šio išradimo DNR sekos operatyvusis prijungimas prie ekspresijos kontrolinės sekos žinoma apima, jeigu jis dar nėra DNR sekos dalis, iniciacijos kodono (ATG) sukūrimą teisingame nuskaitymo rėmelyje aukštyne einančia DNR sekos kryptimi.

Šio išradimo DNR sekų ekspresijai gali būti panaudotos įvairiausios šeimininko/ekspresijos vektoriaus kombinacijos. Tinkami ekspresijos vektoriai, pavyzdžiui, gali būti chromosominių, nechromosominių ir sintetinių DNR sekų segmentai. Tinkamiausi vektoriai apima SV40 darinius ir žinomas bakterines plazmides, pvz., *E.coli* plazmides col E1, pCR1, pBR322, pMB9, pUC arba pUC plazmidės darinius, pvz., pGEX vektorius, pET vektorius, pmal-c, pFLAG ir t.t. ir jų darinius, plazmides, tokias kaip RP4; DNR fagus, pvz., daugybę λ fago darinių, pvz., NM989, arba kitokius DNR fagus, pvz., M13 ir grandininį viengrandininį DNR fagą; mielių plazmides, tokias kaip 2μ plazmidė arba jos dariniai; vektorius, naudojamus eukariotinėse ląstelėse, tokius kaip vektoriai, naudojami vabzdžių arba žinduolių ląstelėse; vektorius, gautus iš plazmidžių ir DNR fagų kombinacijos, tokius kaip plazmidės, kurios buvo modifikuotos DNR arba kitokių ekspresijos kontrolinių sekų fago panaudojimui; ir panašias. Tinkamiausiame realizavimo variante *ob* ekspresija gaunama metilotrofinėse mielėse, pvz., *Pichia pastoris* mielėse (žr., pvz., tarptautinė paraiška WO 90/03431 (Brierley *et al.*, 1990 m. balandžio 5 d.); tarptautinė paraiška WO 90/10697 (Siegel *et al.* 1990 m. rugsėjo 20 d.). Specifiniame realizavimo variante, *infra*, sukurtas ekspresijos vektorius *ob* ekspresijai, kontroliuojamas α -sukryžminto faktoriaus signalinės sekos.

Šiuose vektoriuose išradimo DNR sekų ekspresijai gali būti panaudota bet kuri iš daugybės ekspresijos kontrolinių sekų - sekų, kurios kontroliuoja DNR sekos, veiksmingai prijungtos prie jos, ekspresiją. Tokios tinkamos ekspresijos kontrolinės sekos apima,

pavyzdžiui, pirmuosius arba vėlyvesnius SV40, CMV, vakcinų, poliomų arba adenovirusų *lac* sistemas, *trp* sistemas, TAC sistemas, TRC sistemas, LTR sistemas promotorius, daugumą λ fago operatorinių ir promotorinių sričių, fd apvalkalo baltymo kontrolines sritis, 3-fosfogliceratkinazės arba kitų glikolitinių fermentų promotorių, rūgštinės fosfatazės promotorius (pvz., Pho5) ir metilotrofinių mielių AOX 1 promotorių mielių α -sukryžminimo faktorių promotorius ir kitokias sekas, kurios, kaip yra žinoma, kontroliuoja prokariotinių arba eukariotinių ląstelių arba jų virusų genų ekspresiją, ir įvairias jų kombinacijas.

Šio išradimo DNR sekų ekspresijai gali būti panaudota daugybė vienaląsčių šeimininkų ląstelių. Tokie šeimininkai gali būti gerai žinomi eukariotiniai arba prokariotiniai šeimininkai, tokie kaip *E.coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* kamieniai; grybai, tokie kaip mielės (*Saccharomyces* ir metilotrofinės mielės, tokios kaip *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* ir *Torulopsis*); ir gyvūnų ląstelės, tokios kaip CHO, R1.1, B-W ir LM ląstelės, Afrikos žaliosios beždžionės inkstų ląstelės (pvz., COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 ir BMT 10), vabzdžių ląstelės (pvz., Sf9) ir žmogaus bei augalų ląstelės audinio kultūroje.

Aišku, kad ne visi vektoriai, ekspresijos kontrolinės sekos ir šeimininkai funkcionuos vienodai gerai, ekspresuodami šio išradimo DNR sekas. Taip pat ne visi šeimininkai su ta pačia ekspresijos sistema vienodai gerai funkcionuos. Tačiau šios srities specialistas galės pasirinkti tinkamus vektorius, ekspresijos kontrolines sekas ir šeimininkus, neatlikdamas bereikalingų eksperimentų, kad gautų norimą ekspresiją, nenukrypstant nuo išradimo objekto. Pavyzdžiui, pasirenkant vektorių, svarbu paimti tinkamą šeimininką, kadangi vektorius turi funkcionuoti jame. Taip pat reikia atsižvelgti į vektoriaus kopijų skaičių, galimybę kontroliuoti šį kopijų skaičių ir bet kurio kito, vektoriaus koduojamo baltymo, tokio kaip antibiotinis markeris, ekspresiją.

Pasirenkant ekspresijos kontrolinę seką, paprastai reikia atsižvelgti į įvairiausias faktorius. Tokie faktoriai yra, pavyzdžiui, santykinis sistemos stiprumas, jos kontroliuojamumas ir jos suderinamumas su tam tikra DNR seka arba genu, kuriuos reikia ekspresuoti, ypatingai atsižvelgiant į potencialias antrines struktūras. Tinkamus vienaląsčius šeimininkus reikia pasirinkti, atsižvelgiant į, pvz., jų suderinamumą su pasirinktu vektoriumi, jų sekrecijos charakteristikas, jų sugebėjimą teisingai sulankstyti

baltymus ir jų fermentacijos reikalavimus, o taip pat į ekspresuojamo produkto, kurį koduoja DNR seka, toksiškumą šeimininkui ir į tai, ar nesunku išskirti ekspresijos produktus.

Analizuodamas šiuos ir kitus faktorius, patyręs specialistas galės sukonstruoti daugybę vektorių/ekspresijos kontrolinės sekos/šeimininko kombinacijų, kurios ekspresuos šio išradimo DNR sekas, atliekant didelės apimties gyvūnų kultūros fermentaciją.

Specialiame realizavimo variante gali būti ekspresuojamas OB sulietas baltymas. OB sulietas baltymas apima bent dalį funkciškai aktyvaus ne-OB baltymo, sujungto peptidine jungtimi su bent funkciškai aktyvia OB polipeptido dalimi. Ne-ob sekos gali būti OB sekų amino- arba karboksi-gale. Geriau, kai proteolitiškai reaktyvaus OB sulieto baltymo stabiliai ekspresijai ne-OB sulieto baltymo dalis yra prijungta peptidine jungtimi prie OB baltymo amino-galo. Rekombinantinė DNR molekulė, koduojanti tokį sulietą baltymą, apima seką, koduojančią bent funkciškai aktyvią dalį ne-OB baltymo, įjungtą į OB koduojančios sekos rėmelį, ir geriausia, kai ji koduoja specifinės proteazės, pvz., trombino arba faktoriaus Xa skaldymo vietą, geriausia ties OB-ne-OB ryšiu. Specifiniame realizavimo variante sulietas baltymas ekspresuojamas *Escherichia coli* ir *P.pastoris*.

Specifiniame realizavimo variante, *infra*, pelės ir žmogaus *ob* genų ekspresijai buvo pagaminti vektoriai su ir be gln-49 kodonų bakterinėse ekspresijos sistemose ir mielių (*Pichia*) ekspresijos sistemose sulietims baltymams gauti. Pagamintas *ob* genas su endonukleazės skaldymo vieta, pvz., naudojant PCR ir naujus pradmenis. Pageidautina patvirtinti PCR generuotas sekas, nes, naudojant šią metodiką, yra didesnė taškinės mutacijos tikimybė. Panaudota plazmidė, turinti histidino tag (His-tag) ir proteolitinio skaldymo vietą. Histidino buvimas suteikia galimybę selektyviai išskirstyti rekombinantinius baltymus, leidžiant per Ni-chelatų sudarymo kolonėlę arba panaudojant afininį gryninimą. Proteolitinio skaldymo vieta, specialiame realizavimo variante, *infra*, trombino skaldymo vieta, yra sukonstruota taip, kad apdorojus proteaze, pvz., trombinu, išsiskirs pilno ilgio subredės (t.y. neturintis signalinės sekos) OB polipeptidas.

Kitu požiūriu, gali būti panaudotas pGEX vektorius [Smith *et al.*, *Gene* 67:31-40 (1988)]. Šis vektorius prijungia *schistosoma japonicum* gliutationin-S-transferazės kDNR prie norimos sekos. Auginami bakteriniai baltymai ir rekombinantiniai baltymai gali būti

greitai išskiriami, leidžiant per redukuoto gliutinationo afininę kolonėlę. Po to GST nešiklis gali būti atskeliamas nuo sulieto baltymo, skaldant specifine vietai proteaze. Po suskaldymo nešiklis ir nesuskaldytas sulietas baltymas gali būti pašalinti, panaudojant adsorbciją ant gliutationagarožės. Kai kada šioje sistemoje atsiranda sunkumų, jei užkoduotas baltymas yra netirpus vandeniniuose tirpaluose.

Rekombinantinių baltymų ekspresija bakterinėse sistemose gali duoti neteisingą baltymo sulankstymą, reikalaujantį perlankstymo. Rekombinantinis baltymas gali būti perlankstytas prieš arba po skaldymo, kad susidarytų funkciškai aktyvus OB polipeptidas. OB polipeptidas gali būti perlankstytas, panaudojant (i) baltymo inkubavimo denatūruojančiame buferyje, kuriame yra redukuojančio agento, ir po to (ii) baltymo inkubavimo buferyje, kuriame yra oksiduojančio agento ir, pageidautina, kad jame taip pat būtų stabilizuojančio agento arba chaotropinio agento, arba abiejų, stadijas. Tinkamos redoks (redukuojantis/oksiduojantis) agentų poros apima, bet neapsiriboja, redukuotą gliutationą/gliutationdisulfidą, cistiną/cisteiną, cistaminą/cisteaminą ir 2-merkaptoetanolį/2-hidroksietildisulfidą. Tam tikrais atvejais, prieš sudedant į redukuojantį buferį, sulietas baltymas gali būti soliubilizuotas denatūrantu, tokiaime kaip šlapalas. Tinkamiausiame realizavimo variante, prieš sudedant jį į redukuojantį buferį, baltymas išvalomas, pvz., panaudojant jonų mainų arba Ni-chelatų sudarymo chromatografiją. Denatūracijos agentai yra (bet neapsiribojama jais) šlapalas ir guanidino HCl. Tada rekombinantinis baltymas praskiedžiamas maždaug 10 kartų, geriau - 100 kartų oksidaciniu buferiu, kuriame yra oksidacijos agentas, tokiu kaip (bet neapsiribojant juo) 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 0,3 M oksiduoto gliutinationo. Tada sulietas baltymas inkubuojamas oksidaciniame buferyje 1-24 h, geriau 2-16 h kambario temperatūroje. Oksidaciniame buferyje gali būti baltymą stabilizuojančio agento, pvz., cukraus, alkoholio arba amonio sulfato. Oksidaciniame buferyje taip pat gali būti nedideli kiekiai chaotropinio agento, kuris destabilizuoja neteisingas tarpmolekulinės sąveikos ir skatina teisingą sulankstymą. Tinkamiausi chaotropiniai agentai apima, bet neapsiriboja, detergentą poliolių, L-argininą, guanidino HCl ir polietilenglikolį (PEG). Svarbu, kad chaotropinio agento koncentracijos būtų pakankamai mažos, norint išvengti baltymo denatūracijos. Perlankstytas baltymas gali būti koncentruojamas mažiausiai apie 10 kartų, geriau iki tokio kiekio, koks buvo prieš praskiedžiant oksidaciniu buferiu.

Bakterinės fermentacijos procesai taip pat gali duoti rekombinantinio baltymo preparatus, kurie turi nepriimtinus endotoksinų kiekius. Todėl išradime aptariamas tokių endotoksinų pašalinimas, pvz., naudojant specifinius endotoksinams antikūnus arba kitokias endotoksinius surišančias molekules. Endotoksinų buvimą galima nustatyti pagal standartines metodikas, tokias kaip naudojant E-TOXATE Reagents (Sigma, St. Louis, Missouri) arba biologiniais bandymais.

Apart šio specifinio pavyzdžio, šiame išradime nagrinėjama lazdelinių virusų, žinduolių ir mielių ekspresijos sistemų panaudojimas ob baltymo ekspresijai. Pavyzdžiui, lazdelinių virusų ekspresijos sistemose abu nesuliejimo pernešimo vektoriai, tokie kaip (bet jais neapsiribojama) pVL941 (*Bam*H1 klonavimo vietos; Summers), pVL1393 (*Bam*H1, *Sma*I, *Xba*I, *Eco*R1, *Not*I, *Xma*III, *Bgl*II ir *Pst*I klonavimo vietos; Invitrogen), pVL1392 (*Bgl*II, *Pst*I, *Not*I, *Xma*III, *Eco*R1, *Xba*I, *Sma*I ir *Bam*H1 klonavimo vietos; Summers ir Invitrogen) ir pBlueBacIII (*Bam*H1, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I ir *Hind*III klonavimo vietos su galimu mėlyna/balta rekombinacijos skryningu; Invitrogen) ir suliejimo pernešimo vektoriai, tokie kaip (bet jais neapsiribojama) pAc700 (*Bam*H1 ir *Kpn*I klonavimo vietos, kuriame *Bam*H1 atpažinimo vieta prasideda iniciacijos kodonu; Summers), pAc701 ir pAc702 (toks pat kaip ir pAc700, su skirtingais nuskaitymo rėmeliais), pAc360 (*Bam*H1 klonavimo vieta, esanti 36 bazių poromis žemyn einančia kryptimi nuo poliedrino iniciacijos kodono; Invitrogen(195)) ir pBlueBacHisA, B, C (trys skirtingi nuskaitymo rėmeliai su *Bam*H1, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I ir *Hind*III klonavimo vietomis, N-galinis peptidas ProBond valymui ir dėmių mėlyna/balta rekombinacijos skryningas; Invitrogen(220)).

Šiame išradime siūlomi naudoti žinduolių ekspresijos vektoriai apima vektorius su indukuojamais promotoriais, tokiais kaip dihidrofolatreduktazės (DHFR) promotorius, pvz., bet koks ekspresijos vektorius su DHFR ekspresijos vektoriumi arba DHFR/metotreksatokoamplifikacijos vektorius, toks kaip pED (*Pst*I, *Sal*I, *Sba*I, *Sma*I ir *Eco*R1 klonavimo vietos su vektoriumi, ekspresuojančiu ir klonuotą geną, ir DHFR; žr. Kaufmann, *Current Protocols in Molecular Biology*, 16.12 (1991). Kitas atvejis yra glutaminsintetazės/metionino sulfoksimino koamplifikacijos vektorius, toks kaip pEE14 (*Hind*III, *Xba*I, *Sma*I, *Sba*I, *Eco*R1 ir *Bcl*I klonavimo vietos, kuriose vektorius ekspresuoja glutaminsintetazę ir klonuotą geną; Celltech). Kitame realizavimo variante gali būti

panaudotas vektorius, kuris nukreipia episomalinę ekspresiją, kontroliuojamą Epstein Barr Virus, toks kaip pREP4 (*Bam*H1, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II ir *Kpn*I klonavimo vietos konstitutyviniis RSV-LTR promotorius, higromicinui selektyvus markeris; Invitrogen), pCEP4 (*Bam*H1, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II ir *Kpn*I klonavimo vietos konstitutyviniis hCMV labai ankstyvas genas, higromicinui selektyvus markeris; Invitrogen), pMEP4 (*Kpn*I, *Pvu*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, *Bam*H1 klonavimo vietos, indukuojamas methalotioneino IIa geno promotorius, higromicinui selektyvus markeris; Invitrogen), pREP8 (*Bam*H1, *Xho*I, *Not*I, *Hind*III, *Nhe*I ir *Kpn*I klonavimo vietos, RSV-LTR promotorius, histidinoliui selektyvus markeris; Invitrogen), pREP9 (*Kpn*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I ir *Bam*H1 klonavimo vietos, RSV-LTR promotorius, G418 selektyvus markeris; Invitrogen), pEBVHis (RSV-LTR promotorius, higromicinui selektyvus markeris, N-galinis peptidas gryninamas, leidžiant per ProBond dervą ir skaldomas enterokinaze; Invitrogen). Pasirinkti žinduolių ekspresijos vektoriai, skirti naudoti šiame išradime, yra pRc/CMV (*Hind*III, *Bst*HI, *Not*I, *Sba*I ir *Apa*I klonavimo vietos, G418 selekcija; Invitrogen), pRc/RSV (*Hind*III, *Spe*I, *Bst*XI, *Not*I, *Xba*I klonavimo vietos, G418 selekcija; Invitrogen) ir kt. Vaccinia viruso žinduolių ekspresijos vektoriai (žr. Kaufmann, 1991, *supra*), skirti naudoti pagal šį išradimą, apima, bet neapsiriboja, pSC11 (*Sma*I klonavimo vieta, TK- ir β -gal selekcija), pMJ601 (*Sal*I, *Sma*I, *Afl*I, *Nar*I, *Bsp*MII, *Bam*HI, *Apa*I, *Nhe*I, *Sac*II, *Kpn*I ir *Hind*III klonavimo vietos, TL ir β -gal selekcija) ir pTKgptF1S (*Eco*R1, *Pst*I, *Sal*I, *Acc*I, *Hind*II, *Sba*I, *Bam*HI ir *Hpa* klonavimo vietos, TK arba XPRT selekcija).

Pagal šį išradimą, OB polipeptido ekspresijai gali būti naudojamos taip pat mielių ekspresijos sistemos. Pavyzdžiui, pagal šį išradimą, paminint tik du, gali būti panaudotas nesuliejantis pYES2 vektorius (*Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Not*I, *Gst*XI, *Eco*R1, *Bst*XI, *Bam*H1, *Sac*I, *Kpn*I ir *Hind*III klonavimo vietos; Invitrogen) arba suliejimo vektorius pYESHisA (*Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Not*I, *Gst*XI, *Eco*R1, *Bst*XI, *Bam*H1, *Sac*I, *Kpn*I ir *Hind*III klonavimo vietos; N-galinis peptidas valomas, leidžiant per ProBond dervą ir skaldomas enterokinaze; Invitrogen).

Taip pat manoma, kad kūno svorio moduliavimo peptidų analogai gali būti pagaminti iš nukleotidų sekų, nurodytų šiame išradime.

Apart rekombinantinės OB polipeptido ekspresijos, šiame išradime svarstoma ir laikoma pilnai įmanoma pagaminti OB polipeptidą arba jo fragmentus, naudojant gerai žinomus ir gerai ištobulintus kietafazės peptidų sintezės metodus. OB polipeptidui arba jo fragmentams gauti išradime aptariamose abi plačiai žinomos Boc ir Fmoc bei kitų apsauginių grupių strategijos. Įvairios perlankstymo ir cisteino šoninių grandinių oksidavimo metodikos, norint sudaryti disulfidinį ryšį, taip pat yra gerai žinomos.

Antikūnai OB polipeptidui

Pagal šį išradimą, OB polipeptidas, pagamintas rekombinantiniu būdu arba cheminės sintezės būdu, jo fragmentai arba kiti dariniai arba jo analogai, įskaitant sulietus baltymus, gali būti naudojami kaip imunogenai antikūnams, kurie atpažįsta OB polipeptidą, gaminti. Tokie antikūnai apima, bet neapsiriboja, polikloninius, monokloninius, chimerinius, viengrandinius, Fab fragmentus ir Fab ekspresijos biblioteką.

Molekulė yra “antigeninė”, kai ji gali specifiškai sąveikauti su imuninės sistemos antigeną atpažįstančia molekule, tokia kaip imunoglobulinas (antikūnas) arba T ląstelės antigeninis receptorius. Antigeninis polipeptidas turi mažiausiai 5, geriau bent 10 aminorūgščių. Molekulės antigeninė dalis gali būti tokia dalis, kuri yra imunodominuojanti antikūno arba T ląstelės receptoriaus atpažinimo procese, arba ji gali būti dalis, panaudota generuoti antikūnui prieš molekulę, prijungiant antigeninę dalį prie nešiklio molekulės. Molekulė, kuri yra antigeninė, nebūtinai turi būti imunogeninė, t.y. galinti iššaukti imuninį atsaką be nešiklio.

“Antikūnas” yra bet koks imunoglobulinas, įskaitant antikūnus ir jų fragmentus, kurie suriša specifinį epitopą. Šis terminas apima polikloninius, monokloninius ir chimerinius antikūnus (pastarieji plačiau aprašyti US patentuose Nr. 4816397 ir 4816567), bei antigeną rišančias antikūnų dalis, įskaitant Fab, F(ab')₂ ir F(v) (įskaitant viengrandinius antikūnus). Taigi, čia vartojamas posakis “antikūno molekulė” įvairiose jo gramatinėse formose reiškia ir visą imunoglobulino molekulę, ir imunoglobulino molekulės imunologškai aktyvią dalį, turinčią antikūno rišančią vietą. “Rišanti antikūno

vieta" yra antikūno molekulės struktūrinė dalis, turinti savyje sunkiosios ir lengvosios grandinės kintamas ir hiperkintamas sritis, kurios specifiškai suriša antigeną.

Antikūnų molekulių pavyzdžiai yra nepalietos imunoglobulino molekulės, beveik nepalietos imunoglobulino molekulės ir tokios imunoglobulino molekulės dalys, kurios turi paratopą, įskaitant tokias žinomas dalis, kaip Fab, Fab', F(ab')₂ ir F(v); tokios dalys yra tinkamiausios naudoti čia aprašytuose terapiniuose methoduose.

Antikūno molekulės Fab ir F(ab')₂ dalys gali būti pagamintos, proteolitiškai skaldant atitinkamai papainu ir pepsinu iš esmės nepaveiktas antikūno molekules pagal gerai žinomas metodikas. Žr., pavyzdžiui, Theofilopolous *et al.*, US patentas Nr. 4342566. Taip pat gerai žinomos Fab' antikūno molekulės dalys; jos gaunamos iš F(ab')₂ dalių, atlikus disulfidinio ryšio, kuris jungia dvi sunkiosios grandinės dalis, redukciją, pavyzdžiui, merkaptetoetanoliu, o po to alkilinant gautą merkaptto-baltymą tokiu reagentu, kaip jodacetamidas. Pageidautini antikūnai, turintys nepalietas antikūno molekules.

Posakis "monokloninis antikūnas" visose jo gramatinėse formose reiškia antikūną, turintį tik vienos formos antikūno jungimosi vietą, galinčią imunoreaguoti su tinkamu antigenu. Taigi, monokloninis antikūnas paprastai turi vienintelę rišimosi galimybę su antigenu, su kuriuo jis imunoreaguoja. Todėl monokloninis antikūnas gali turėti antikūno molekulę, turinčią daug antikūno rišimosi vietų, ir kiekviena iš jų bus specifinė įvairiems antigenams; pvz., bispecifinis (chimerinis) monokloninis antikūnas.

Terminas "stimulatorius" reiškia junginį arba mišinį, kuris stiprina imuninį atsaką į antigeną. Stimulatoriumi gali būti audinys, kuris lėtai išskiria antigeną, o taip pat limfoidinės sistemos aktyvatorius, kuris nespecifiškai stiprina imuninį atsaką [Hood *et al.*, in *Immunology*, p. 384, Second Ed., Benjamin/Cummings, Menlo Park, California (1984)]. Dažnai pirmasis atsako iššaukimas vien tik antigenu, nesant stimulatoriaus, nesukelia humoralinio arba ląstelinio imuninio atsako. Stimulatoriais yra, bet neapsiribojama, pilnas Froindo stimulatorius, nepilnas Froindo stimulatorius, saponinas, mineraliniai geliai, tokie kaip aliuminio hidroksidas, paviršiaus aktyvios medžiagos, tokios kaip lizolecitinas, pluroniniai polipolioliai, polianijonai, peptidai, alyvos arba angliavandenilių emulsijos, hemocianinai, dinitrofenolis ir potencialiai naudingi žmogaus stimulatoriai, tokie kaip BCG (*bacille Calmette-Guerin*) ir *Corynebacterium parvum*. Geriau, kai stimulatorius yra farmaciškai tinkamas.

OB polipeptido polikloniniams antikūnams, jų fragmentams, dariniams arba analogams gauti gali būti panaudotos įvairios metodikos. Antikūnams gauti gali būti imunizuojami įvairūs gyvūnai-šeimininkai, įleidžiant OB polipeptido, arba jo darinio (pvz., fragmento arba sulieto baltymo), įskaitant (bet neapsiribojant) triušius, peles, žiurkes, avis, ožkas ir t.t. Viena realizavimo variante OB polipeptidas arba jo fragmentas gali būti sujungtas su imunogeniniu nešikliu, pvz., jaučio serumo albuminu (BSA) arba hemocianinu (KLH). Imunologinio atsako padidimui gali būti panaudoti įvairūs stimulatoriai, priklausomai nuo šeimininko, įskaitant (bet neapsiribojant) Froindo (pilną ir nepilną) stimulatorius, mineralinius gelius, tokius kaip aliuminio hidroksidas, paviršiaus aktyvias medžiagas, tokias kaip lizolecitiną, polipoliolį, polianijonus, peptidus, alyvos emulsijas,... hemocianinus, dinitrofenolį ir potencialiai naudingus žmogaus stimulatorius, tokius kaip BCG (*bacille Calmette-Guerin*) ir *Corynebacterium parvum*.

Monokloniniams antikūnams prieš OB polipeptidą, jo fragmentą, analogą arba darinį gauti gali būti panaudota bet kokia metodika, kuri leidžia pagaminti antikūno molekules nepertraukiamos ląstelių linijos kultūroje būdu. Tokios metodikos yra (bet neapsiribojant) hibridomos metodika, kurią iš pradžių išvystė Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495-497 (1975), bei triomos metodika, žmogaus β -ląstelės hibridomos metodika (Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 4:72 (1983)] ir EBV-hibridomos metodika, skirta žmogaus monokloniniams antikūnams gauti [Cole *et al.*, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., (1985)]. Gyvybingos, antikūnus produkuojančios ląstelių linijos gali būti sukurtos, panaudojant metodikas, kitokias nei suliejimo, tokias kaip tiesioginį B limfocitų transformavimą onkogenine DNR, arba transfekavimą Epstein-Barr virusu. Žr., pvz., M.Schreier *et al.*, "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling *et al.*, "Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas" (1980); Kennett *et al.*, "Monoclonal Antibodies" (1980); žr. taip pat US patentus Nr. 4341761; 4399121; 4427783; 4444887; 4451570; 4466917; 4472500; 4491632 ir 4493890.

Kitame išradimo realizavimo variante monokloniniai antikūnai gali būti pagaminti steriliuose gyvūnuose, naudojant naują technologiją (PCT/US90/02545). Pagal šį išradimą gali būti panaudoti žmogaus antikūnai ir gali būti gauti, naudojant žmogaus hibridomas [Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026-2030 (1983)] arba transformuojant žmogaus ląsteles EBV virusu *in vitro* (Cole *et al.*, 1985, *supra*). Faktiškai, pagal išradimą

gali būti panaudotos metodikos, ištobulintos "chimerinių antikūnų" gavimui [Morrison *et al.*, *J. Bacteriol.*, 159-870 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature*, 312:604-608 (1984); Takeda *et al.*, *Nature*, 314:452-454 (1985)], sujungiant specifinės ob polipeptidui pelės antikūno molekulės genus su žmogaus antikūno atitinkamo biologinio aktyvumo molekulės genais. Tokie žmogaus arba humanizuoti chimeriniai antikūnai yra tinkamesni naudoti žmogaus ligų arba sutrikimų terapijoje (aprašyta *infra*), kadangi yra mažiau tikėtina, kad patys žmogaus arba humanizuoti antikūnai, kaip ksenogeniniai antikūnai, indukuos imuninį atsaką, ypatingai alerginį atsaką.

Pagal išradimą, metodikos, aprašytos viengrandiniams antikūnams gauti (US patentas Nr.4946778) gali būti pritaikytos OB polipeptidui specifiniams viengrandiniams antikūnams gauti. Papildomame išradimo realizavimo variante naudojamos metodikos, aprašytos Fab ekspresijos bibliotekų sudarymui [Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989)], leidžiančios greitai ir lengvai identifikuoti monokloninius Fab fragmentus su norimu specifiškumu ob polipeptidui, jo dariniams arba analogams.

Antikūno fragmentai, kurie turi antikūno molekulės idiotipą, gali būti pagaminami pagal įvairias žinomas metodikas. Pavyzdžiui, tokie fragmentai apima (bet neapsiriboja): $F(ab')_2$ fragmentą, kuris gali būti pagamintas, panaudojant antikūno molekulės skaldymą pepsinu; Fab' fragmentus, kurie gali būti gaunami, redukuojant $F(ab')_2$ fragmento disulfidinius tiltelius; ir Fab fragmentus, kurie gali būti pagaminami, veikiant antikūno molekulę papainu ir redukcijos agentu.

Antikūnų gamyboje gali būti atliktas pageidaujamo antikūno skryningas pagal šioje srityje žinomas metodikas, pvz., radioimuninė analizė, ELISA, "sumuštinio" imunoanalizė, imunoradiometrinė analizė, gel-difuzijos nusodinimo reakcijos, imunodifuzinė analizė, *in situ* imunoanalizė (pvz., naudojant koloidinį auksą, fermentą ir radioizotopines žymes), vesterno blotingas, nusodinimo reakcijos, agliutinacijos bandymai (pvz., gel-agliutinacijos bandymai, hemagliutinacijos bandymai), komplementiniai fiksacijos bandymai, imunofluorescentinė analizė, A baltymo bandymai ir imunoelektroforezės bandymai ir t.t. Viena realizavimo variante antikūno susijungimas nustatomas, nustatant žymę ant pirminio antikūno. Kitame realizavimo variante pirminis antikūnas nustatomas, nustatant antrinio antikūno arba reagento susijungimą su pirminiu antikūnu. Dar kitame realizavimo variante buvo pažymėtas antrinis antikūnas.

Imunobandymuose ryšio susidarymo nustatymui yra žinoma daug priemonių, ir jas apima šis išradimas. Pavyzdžiui, norint atrinkti antikūnus, kurie atpažįsta OB polipeptido specifinį epitopą, galima analizuoti produkto generuotas hibridomas, kurios jungiasi su tokį epitopą turinčiu OB polipeptido fragmentu. Antikūną, specifinį OB polipeptidui iš tam tikros gyvūnų rūšies, galima atrinkti, remiantis teigiamu susirišimu su OB polipeptidu, ekspresuotu arba išskirtu iš tos rūšies gyvūno ląstelių.

Aukščiau minėti antikūnai gali būti panaudoti žinomuose methoduose, susijusiuose su OB polipeptido lokalizacija ir aktyvumu, pvz., vesterno blotinge, OB polipeptido atvaizdavime *in situ*, jo kiekio tam tikruose fiziologiniuose mėginiuose matavimuose ir pan.

Specifiniame realizavimo variante gali būti generuojami antikūnai, kurie agonizuoja arba antagonizuoja OB polipeptido aktyvumą. Tokie antikūnai gali būti analizuojami, naudojant bandymus, aprašytus *infra*, ligandų identifikavimui.

Specifiniame realizavimo variante antikūnai pagaminami imunizuojant triušius sintetiniais peptidais, turinčiais numatyto baltymo seką, arba rekombinantiniais baltymais, pagamintais, naudojant bakterinius ekspresijos vektorius. Sintetiniai peptidai parinkti, rūpestingai išanalizavus numatyto baltymo struktūrą, kaip aprašyta aukščiau. Ypatingai pasirenkama peptido seka tarp galimų skaldymo vietų. Sintetiniai peptidai prijungiami prie nešiklio, tokio kaip KLH hemocianinas arba BSA, naudojant karbodiimidą, ir naudojami triušių imunizavimui Froindo stimuliatoriuje. Norint gauti rekombinantinį baltymą, polipeptido ekspresijai gali būti panaudotas pGEX vektorius (Smith *et al.*, 1988, *supra*). Kitu atveju sulieto baltymo generavimui galima naudoti tik hidrofilines dalis. Pagaminamas reikiamas ekspresuojamo baltymo kiekis ir naudojamas triušiams imunizuoti Froindo stimuliatoriuje.

Kitame specifiniame realizavimo variante rekombinantinis OB polipeptidas naudojamas viščiukams imunizuoti, o viščiukų anti-OB antikūnai išskiriami iš kiaušinio trynio, pvz., panaudojant afininį valymą per OB kolonėlę. Geriausia, kai imunizacijai vartojami viščiukai laikomi specifinėse nepatogeninėse (SPF) sąlygose.

Kitame realizavimo variante buvo generuoti antikūnai prieš leptiną *ob/ob* pelėse, kuriose nėra cirkuliuojančio OB baltymo, ir todėl galima laukti, kad jos galės generuoti anti-OB polipeptidinį atsaką, kadangi jos netoleruos polipeptido, ir laukinio tipo pelėse.

Gali būti sulietos abiejų grupių pelių blužnies ląstelės su mielomos ląstelėmis, pagaminant hibridomą monokloniniams antikūnams.

Dar viename realizavimo variante triušių imunizavimui panaudotas rekombinantinis OB polipeptidas, o prieš naudojimą polikloniniai antikūnai buvo išgryninti imuniniu būdu. Išgryninti antikūnai yra ypatingai tinkami pusiau kiekybiniams bandymams, ypatingai, nustatant serume arba plazmoje cirkuliuojančio OB polipeptido buvimą.

Monokloninių antikūnų prieš modulatorinius peptidus rinkiniai gali būti išskirstomi pagal įvairias savybes, t.y. izotipą, epitopą, afiniškumą ir t.t. Ypatingai įdomūs yra monokloniniai antikūnai, kurie neutralizuoja modulatorinių peptidų aktyvumą. Tokie monoklonai gali būti lengvai identifikuojami svorio moduliatorių aktyvumo bandymuose. Didelio afiniškumo antikūnai taip pat yra vertingi, kai galima atlikti natyvaus arba rekombinantinio modulatoriaus imunoafininį valymą.

Geriau, kai anti-modulatorinis antikūnas, naudojamas šio išradimo diagnostiniuose arba terapiniuose būduose, yra afininio valymo būdu išvalytas polikloninis antikūnas. Dar geriau, kai antikūnas yra monokloninis antikūnas (mAb). Be to, pageidautina, kad čia naudojamos antimodulatorinio antikūno molekulės būtų Fab, Fab', F(ab')₂ arba F(v) formos arba pilnos antikūno molekulės.

Diagnostinė reikšmė

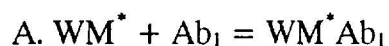
Šis išradimas taip pat susijęs su įvairiais diagnostiniais pritaikymais, įskaitant sąlygų ir/arba stimulų, kurie veikia į kūno svorio nenormalumus arba nutukimą, buvimo nustatymo metodus, pasinaudojant galimybe išgauti aktyvumus, kuriuose tarpininkauja svorio modulatoriai. Kaip aukščiau minėta, svorio moduliacijos peptidai gali būti panaudoti antikūnams prieš šiuos peptidus gauti, panaudojant daugybę žinomų metodikų; tada tokie antikūnai gali būti išskiriami ir naudojami tam tikro transkripcinio aktyvumo įtariamose tikslinėse ląstelėse buvimo nustatymui. Kitu atveju, diagnostikoje gali būti taikomos šio išradimo nukleino rūgštys.

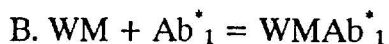
Antikūnais paremta diagnostika

Kaip buvo pasiūlyta anksčiau, šiame išradime naudojami diagnostiniai metodai apima ląstelinio mėginio arba terpės tyrimą, atliekant bandymus, apimančius efektyvų kiekį antagonisto modulatoriniam baltymui, tokio kaip anti-modulatoriaus antikūno, geriausia polikloninio antikūno, išvalyto afininiu būdu, o dar geriau mAb. Be to, pageidautina, kad čia naudojamo anti-modulatoriaus antikūno molekulės būtų Fab, Fab', F(ab')₂ arba F(v) dalių formos arba pilnos antikūno molekulės. Kaip buvo aptarta aukščiau, pacientai, kuriems gali būti naudingas šis metodas, yra pacientai, sergantys vėžiu, AIDS, nutukimu arba kitomis ligomis, kurių charakteristika arba faktorius yra nenormalus kūno svoris. Modulatoriaus išskyrimo ir anti-modulatoriaus antikūnų indukavimo būdai ir anti-modulatoriaus antikūnų panaudojimo tikslinių ląstelių tyrimuose būdai yra gerai žinomi šios srities specialistams.

Be to, tam tikrą diagnostinį pritaikymą gali turėti antikūnai, įskaitant tiek polikloninius, tiek ir monokloninius antikūnus, ir vaistai, kurie moduliuoja svorio kontrolės moduliatorių gaminimąsi arba aktyvumą, bei kitokie atpažinimo faktoriai ir/arba jų subvienetai, ir, pavyzdžiui, gali būti panaudoti būsenų, kuriose yra kūno svorio nenormalumai arba jie gali atsirasti, nustatymo ir/arba išmatavimo tikslams. Pavyzdžiui, modulatoriniai peptidai arba jų aktyvūs fragmentai gali būti panaudoti tiek polikloniniams, tiek monokloniniams antikūnams prieš šiuos peptidus gauti įvairiose ląstelinėse terpėse pagal žinomas metodikas, tokias kaip hibridomos metodika, naudojant, pavyzdžiui, sulietus pelės blužnies limfocitus ir mielomos ląsteles. Ši metodika smulkiau aprašyta žemiau. Panašiai gali būti atrastos arba susintetintos mažos molekulės, kurios imituoja arba antagonizuoja šio išradimo receptoriaus atpažinimo faktorių aktyvumą(us), ir gali būti panaudotos diagnostiniuose ir/arba terapiniuose protokoluose.

Svorio moduliatorių buvimą ląstelėse galima nustatyti, panaudojant įprastas, tokiame nustatyme taikomas imunologines metodikas. Yra žinoma daug tinkamų metodikų. Trys tokios metodikos yra ypatingai tinkamos, naudojant arba receptoriaus atpažinimo faktorių, pažymėtą nustatoma žyme, arba antikūną Ab₂, pažymėtą nustatoma žyme. Metodikos gali būti apibendrintos toliau duodamomis lygtimis, kuriose žvaigždutė rodo, kad dalelė yra pažymėta. o "WM" reiškia svorio moduliatorių:





Metodikos ir jų taikymas yra įprastos šios srities specialistams ir gali būti naudojamos ir šiame išradime. „Konkurencinė“ metodika (A metodika) aprašyta US patentuose Nr. 3654090 ir Nr. 3850752. B metodika atstovauja gerai žinomą konkurencinio bandymo metodiką. C metodika („sumuštinio“ metodika) aprašyta US patentuose Nr. RE 31006 ir Nr. 4016043. Žinomos ir kitos metodikos, tokios kaip „dvigubo antikūno“ arba „DASP“ metodikos.

Kiekvienu atveju svorio modulatoriai sudaro kompleksus su vienu arba daugiau antikūnų arba rišančių partnerių, ir vienas komplekso narys yra pažymėtas nustatoma žyme. Komplekso susidarymo faktą, ir, jeigu pageidaujama, jo kiekį galima nustatyti pagal žinomus žymių nustatymo metodus.

Iš to, kas pasakyta aukščiau, galima matyti, kad charakteringa Ab_2 savybė yra ta, kad jis reaguoja su Ab_1 . Taip yra todėl, kad Ab_1 , sukeltas žinduolių rūšyse, buvo panaudotas kitose rūšyse kaip antigenas antikūnui Ab_2 sukelti. Pavyzdžiui, Ab_2 gali būti sukeltas ožkose kaip antigenas, naudojant triušio antikūnus. Todėl, Ab_2 bus anti-triušio antikūnas, sukeltas ožkose. Šiame aprašyme ir apibrėžtyje Ab_1 reiškia pirminį arba anti-svorio modulatoriaus antikūną, o Ab_2 - antrinį arba anti- Ab_1 antikūną.

Šiuose tyrimuose plačiausiai naudojamos žymės yra radioaktyvūs elementai, fermentai, cheminės medžiagos, kurios fluorescuoja, apšvietus ultravioletine šviesa, ir kt. Yra žinoma daug fluorescuojančių medžiagų, kurios gali būti panaudotos kaip žymės. Tokios medžiagos, yra, pavyzdžiui, fluoresceinas, rodaminas ir auraminas. Ypatinga detektuojama medžiaga yra anti-triušio antikūnas, pagamintas ožkose, ir sujungtas su fluoresceinu, panaudojant izotiocianatą.

Svorio modulatoriai arba jų rišantys partneriai taip pat gali būti pažymėti radioaktyviu elementu arba fermentu. Radioaktyvi žymė gali būti nustatyta pagal bet kokią prieinamą skaičiavimo metodiką. Tinkami izotopai gali būti pasirinkti iš 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I ir ^{186}Re .

Taip pat tinkamos yra ir fermentinės žymės; jos gali būti nustatomos, naudojant šiuolaikines kolorimetrines, spektrofotometrines, fluorospektrofotometrines, amperometrines arba gazometrines metodikas. Fermentas gali būti sujungtas su pasirinkta

dalele, panaudojant tiltelius sudarančių molekulių, tokių kaip karbodiimidai, diizocianatai, gliutaro aldehidas ir pan., reakciją. Yra žinoma ir gali būti panaudota daug fermentų, naudojamų tokiose metodikose. Tinkamiausi yra peroksidazė, β -gliukuronidazė, β -D-gliukozidazė, β -D-galaktozidazė, ureazė, gliukozidazė plius peroksidazė ir šarminė fosfatazė. Kitos žymėjimo medžiagos ir metodai pateikti US patentuose Nr. 3654090; 3850752 ir 4016043.

Dar viename šio išradimo realizavimo variante gali būti pagaminti rinkiniai, kuriuos gali naudoti medicinos specialistai, norėdami nustatyti nulemtą transkripcinio aktyvumo arba nulemtą transkripcinio aktyvumo galimybes įtariamose tikslinėse ląstelėse buvimą arba nebuvimą. Pagal aukščiau aprašytas tyrimų metodikas, viena tokių rinkinių klasė susidės mažiausiai iš žymėto svorio modulatoriaus arba jo rišančio partnerio, pavyzdžiui, jam specifinio antikūno, ir instrukcijų, aišku priklausančių nuo pasirinkto metodo, pvz., „konkurencinis“, „sumuštinio“, „DASP“ ir pan. Rinkiniuose taip pat gali būti pagalbiniai reagentai, tokie kaip buferiai, stabilizatoriai ir t.t.

Tokiu būdu, gali būti pagamintas test-rinkinys, skirtas ląstelių nulemtą transkripcinio aktyvumo galimybes parodymui, susidedantis iš:

(a) bent vieno žymėto imunochemiškai reaktingo komponento iš anksto nustatyto kiekio, gauto tiesiogiai arba netiesiogiai prijungiant šį svorio moduliatorių arba jo specifinį rišantį partnerį prie detektuojamos žymės;

(b) kitų reagentų; ir

(c) minėto rinkinio vartojimo instrukcijos.

Tiksliau, į diagnostinį rinkinį gali įeiti:

(a) žinomas kiekis aprašyto svorio modulatoriaus (arba rišančio partnerio), prijungto prie kietos fazės, susidarant imunosorbentui, arba kitu atveju, prijungto prie tinkamos žymės, arba vieno iš daugelio tokių galimų produktų ir t.t., (arba jų rišančių partnerių);

(b) jeigu reikia, kiti reagentai; ir

(c) minėto rinkinio naudojimo instrukcijos.

Kituose variantuose gali būti pagaminti test-rinkiniai aukščiau minėtiems tikslams, kurie dirba pagal iš anksto numatytą protokolą (pvz., „konkurencinį“, „sumuštinio“, „dvigubo antikūno“ ir t.t.), kurie susideda iš:

(a) žymėto komponento, kuris buvo gautas sujungiant svorio moduliatorių su detektuojama žyme;

(b) vieno arba daugiau papildomų imunocheminių reagentų; bent vienas iš šių reagentų turi būti ligandas arba imobilizuotas ligandas, kuris yra pasirinktas iš grupės, kurią sudaro:

(i) ligandas, galintis susijungti su žymėtu (a) komponentu

(ii) ligandas, galintis susijungti su žymėto (a) komponento rišančiu partneriu;

(iii) ligandas, galintis susijungti su bent vienu komponentu, kurį reikia nustatyti; ir

(iv) ligandas, galintis susijungti su bent vieno komponento, kurį reikia nustatyti, bent vienu rišančiu partneriu; ir

(c) instrukcijų, kaip vykdyti imunocheminės reakcijos tarp svorio modulatoriaus ir specifinio rišančio partnerio vieno arba daugiau komponentų detekcijos ir/arba nustatymo protokolą.

Nukleino rūgštimis paremta diagnostika

Kaip parodyta pavyzdžiuose, *infra*, šio išradimo nukleino rūgštys gali būti panaudotos defektams, susijusiems su defektais OB polipeptide, kurie atsiranda nutukusiuose fenotipuose, nustatyti. Pavyzdžiui, norint nustatyti, ar nutukęs fenotipas yra susijęs su OB mRNR ekspresijos trūkumu, ar su nefunkcionalios OB mRNR ekspresija, pvz., kaip *db/db* pelėse (kur nepakankamumas atsiranda dėl OB receptoriaus trūkumo), ar kai mutacijos duoda netranskribuotą mRNR, gali būti panaudoti nukleino rūgščių zondai (pvz., Northern analizė arba RT-PCR analizė). Be to, nukleino rūgštimis paremtos diagnostikos metodikos pagal šį išradimą gali būti panaudotos kartu su antikūnais paremtomis metodikomis tolesniam nutukusių arba anoreksiškų fenotipų tyrinėjimui molekuliniame lygyje.

Buvo nustatytos neseniai išskirtų žmogaus kDNR klonų sekos. Tai palengvina pilnos žmogaus geno sekos nustatymą (žr. fig. 2A-C; SEQ ID NO:22). Buvo gautos žmogaus OB geno intronų DNR sekos (fig. 20), ir jos buvo panaudotos PCR pradmenims

pagaminti geno iš žmogaus genomines DNR koduojančios sekos PCR amplifikacijai, norint nustatyti OB geno mutacijas arba alelinius variantus pagal čia anksčiau smulkiai aprašytas metodikas. Specifiniai PCR pradmenys žmogaus genomio OB amplifikacijai aprašyti specifiniame pavyzdyje, *infra*.

Pagal dabartinę hipotezę laikoma, kad heterozigotinės mutacijos *ob* gene yra susijusios su mažu/vidutiniu nutukimu, o homozigotinės mutacijos turėtų būti susijusios su keletu DNR sekomis paremtų nutukimo testų. Jei taip yra iš tikrųjų, būtų galima nustatyti nutukimo atsiradimo riziką žmonėms, ir įgalintų pritaikyti gydymą vaistais ir/arba gyvenimo įpročių pakeitimus prieš pilnai išsivystant kūno svorio padidėjimui.

Kitu atveju, diagnostikoje gali būti panaudotas mikrosatelitų, kurie atskyla nuo žmogaus OB mutantinių formų, buvimas. Šiuo atveju gali būti panaudoti įvairūs PCR pradmenys, įskaitant pradmenis, paremtus nukleotidų sekomis, duotomis fig. 20 A-C.

OB genas taip pat gali būti naudojamas diagnostikoje jo koduojamos RNR ir baltymo matavimams, esant mitybos sutrikimams. Svarbu žinoti, ypatingai mitybos sutrikimų atveju, ar OB RNR ir/arba jos koduojamo baltymo kiekiai yra padidinti ar sumažinti. Taigi, jei nutukęs asmuo turi padidintus OB kiekius, atrodytų, kad OB skatina nutukimą, tuo tarpu jei OB kiekis yra sumažintas, atrodytų, kad per daug maži OB kiekiai gali būti nutukimo priežastis (jeigu OB gene yra defektas arba jo nėra). Atvirkščiai, jei vėžiu arba AIDS sergantis pacientas, kuris prarado svorį, turi padidintą OB kiekį, galima daryti išvadą, kad per daug didelė OB ekspresija yra atsakinga už svorio praradimą.

Žmogaus OB RNR kiekiams išmatuoti panaudojama klonuota žmogaus kDNR. Be to, pagaminamas rekombinantinis žmogaus baltymas ir panaudojamas imunobandymuose, įgalinančiuose išmatuoti OB baltymo kiekius riebaluose ir, gal būt, plazmoje.

Terapinė reikšmė

Šio išradimo polipeptidai, nukleino rūgštys ir antikūnai turi nemažą terapinį potencialą. Geriau, kai vartojamas tokio agento terapiškai efektyvus kiekis, esantis farmaciškai tinkamame nešiklyje, skiediklyje arba priede.

Terminas "farmaciškai tinkamas" reiškia molekules ir kompozicijas, kurios yra fiziologiškai toleruojamos ir, jei jas vartoja žmonės, paprastai neduoda alerginių arba

panašių neigiamų reakcijų, tokių kaip skrandžio sutrikimai, galvos svaigimas ir pan. Pageidautina, kaip čia ir vartojama, terminas “farmaciškai tinkamas” reiškia, kad jis yra federalinės arba valstijos valdžios aprobuotas arba įrašytas į U.S. *Pharmacopeia* ir gali būti vartotinas gyvuliams, ypač žmonėms. Terminas “nešiklis” reiškia skiediklį, stimulatorių, priedą arba tirpiklį, su kuriais vartojamas junginys. Tokie farmaciniai nešikliai gali būti sterilūs skysčiai, tokie kaip vanduo ir alyvos, įskaitant naftos, gyvulinės, augalinės arba sintetinės kilmės, tokios kaip riešutų aliejus, sojos aliejus, mineralinė alyva, sezamo aliejus ir pan. Pageidautina nešikliais naudoti vandenį, valgomosios druskos tirpalus ir vandeninius dekstrozės ir glicerolio tirpalus, ypač injekcijoms skirtiems tirpalams. Tinkami farmaciniai nešikliai aprašyti Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

Čia naudojamas terminas “terapiškai efektyvus kiekis” reiškia kiekį, kurio reikia, kad būtų galima sumažinti kliniškai reikšmingą aktyvumą, funkcijos arba atsako trūkumą šeimininke apie 15%, geriau bent 50%, geriausia bent 90%. Kitu atveju, terapiškai efektyvus kiekis yra toks kiekis, kurio pakanka, kad būtų gaunamas kliniškai reikšmingas šeimininko būsenos pagerėjimas.

Rekombinantinio OB polipeptido vartojimas sukelia svorio sumažėjimą, ypač riebalinio audinio sumažėjimą. OB polipeptidas gali būti pagamintas, naudojant standartinius bakterinius ir/arba žinduolių ekspresijos vektorius, sintetiniu būdu arba išskirtas iš plazmos arba serumo, kaip smulkiau aprašyta aukščiau. Kitu atveju, padidintą natyvaus OB polipeptido ekspresiją galima sukelti homologinės rekombinacijos pagalba, kaip aprašyta *supra*.

OB polipeptido aktyvumo sumažinimas (antagonistais, inhibitoriais, panaudojant neutralizuojančius antikūnus arba antiprasmines molekules) turėtų skatinti svorio priaugimą, kas gali būti pageidautina gydant svorio praradimą, susijusį su vėžiu, AIDS arba nervine anoreksija. OB aktyvumo moduliavimas gali būti reikalingas kūno svorio mažinimui (didinant jo aktyvumą) arba kūno svorio didinimui (mažinant jo aktyvumą).

Terapinis gydymas, paremtas polipeptidu

Pagal paprasčiausią analizę, OB genas apsprendžia žinduolių, atskiru atveju pelių ir žmogaus, kūno svorį. Pasirodo, kad OB geno produktas, ir atitinkamai giminingos molekulės, yra signalinio kelio dalis, pagal kurį adipozinis audinys susisiečia su smegenimis ir kitais organais. Manoma, kad pats OB polipeptidas yra signalinė molekulė, t.y. hormonas.

OB polipeptidas, jo funkciškai aktyvus fragmentas arba jo antagonistas gali būti vartojamas peroraliniu arba parenteriniu būdais, geriausia parenteriniu. Kadangi metabolinė homeostazė yra nepertraukiamas procesas, tinkamiausias yra kontroliuojamo ob polipeptido išskyrimo vartojimo būdas. Pavyzdžiui, polipeptidas gali būti vartojamas, naudojant intraveninę infuziją, implantuojamą osmotinį siurbį, transderminį pleišta, liposomas arba kitus vaistų vartojimo būdus. Viena realizavimo variante gali būti panaudotas siurblys [Langer *et al.*, eds., *Medical Applications of Controlled Release*, CRC Press., Boca Raton, Florida (1974); Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery*, 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 321:574 (1989)]. Kitame realizavimo variante gali būti panaudotos polimerinės medžiagos [Langer, 1974, *supra*; Sefton, 1987, *supra*; Smolen *et al.*, eds., *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Wiley, New York (1984); Ranger *et al.*, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 23:61 (1983); taip pat žr. Levy *et al.*, *Science*, 228:190 (1985); During *et al.*, *Ann. Neurol.*, 25:351 (1989); Howard *et al.*, *J. Neurosurg.*, 71:105 (1989)]. Dar kitame realizavimo variante kontroliuojamo išskyrimo sistema gali būti patalpinta prie pat terapinio taikinio, t.y. smegenų, tokiu atveju reikia tik dalies sisteminės dozės [žr., pvz., Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)]. Kitos kontroliuojamo išskyrimo sistemos aptartos Langer, *Science*, 249:1527-1533 (1990) apžvalgoje. Dar kitame realizavimo variante terapinis junginys gali būti paduodamas pūslelėse, ypatingai liposomose [žr. Langer, 1990, *supra*; Treat *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327].

Dar vienu požiūriu, rekombinantinės ląstelės, kurios buvo transformuotos OB genu ir kurios ekspresuoja didelius OB polipeptido kiekius, gali būti transplantuotos subjektui, kuriam reikalingas ob polipeptidas. Geriausia, norint išvengti atmetimo, transplantuoti autologines ląsteles, transformuotas OB; kitu atveju, yra žinoma technologija, įgalinanti

įterpti neautologines ląsteles, kurios produkuoja tirpius faktorius, į polimerinę matricą, ir taip išvengti imuninio atpažinimo ir atmetimo.

OB polipeptidas gali būti įvedamas intraveniniu, intraarteriniu, intraperitoniniu, intraraumeniniu arba subkutaniniu būdais. Kitu atveju, polipeptidas tinkamoje kompozicijoje gali būti vartojamas nazaliniu arba peroraliniu būdu. Pastovus OB tiekimas gali būti užtikrintas, duodant terapiškai efektyvią dozę (t.y. dozę, kuri gali indukuoti subjekto metabolinius pokyčius) reikiamaiais intervalais, pvz., kasdien, kas 12 valandų ir t.t. Šie parametrai priklausys nuo ligos, kurią reikia gydyti, sunkumo, kitokių veiksmų, tokių kaip dietos pakeitimų, kuriuos, priklausomai nuo subjekto svorio, amžiaus, lyties ir kitokių kriterijų patyręs specialistas nesunkiai nustatys.

Farmacinės kompozicijos

Pagal dar vieną šio išradimo aspektą yra siūlomos aukščiau minėtos farmacinės kompozicijos. Tokios farmacinės kompozicijos gali būti skirtos injekcijoms, peroraliniam, pulmonariniam, nazaliniam ir kitokiam vartojimui. Bendrai imant, farmacinės kompozicijos, kurias apima šis išradimas, susideda iš išradimo baltymo arba jo darinių produktų efektyvių kiekių ir farmaciškai tinkamų skiediklių, konservantų, tirpimą skatinančių medžiagų, emulgiklių, stimuliatorių ir/arba nešiklių. Į tokias kompozicijas įeina įvairios sudėties (pvz., Tris-HCl, acetatas, fosfatas), pH ir joninės jėgos buferiniai skiedikliai; priedai, tokie kaip detergentai arba tirpimą skatinančios medžiagos (pvz., Tween 80, Polysorbate 80), antioksidantai (pvz., askorbo rūgštis, natrio metabisulfitas), apsauginės medžiagos (pvz., timerzolis, benzilo alkoholis) ir turį suteikiančios medžiagos (pvz., laktozė, manitolis); medžiaga gali būti įterpiama į tam tikrą polimerinę medžiagą, tokią kaip polilaktato rūgštis, poliglikolio rūgštis, ir t.t., arba į liposomas. Taip pat gali būti panaudota hilauro rūgštis. Tokios kompozicijos gali veikti šio išradimo baltymų ir jų darinių fizinę būseną, stabilumą, išsiskyrimo ir pašalinimo greitį *in vivo*. Žr., pvz., *Martin, Remington's Pharmaceuticals Sciences*, 18th Ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) p. 1435-1712, kuris pridedamas kaip literatūros šaltinis. Pagamintos kompozicijos gali būti skystos arba jas galima išdžiovinti iki miltelių, pvz., liofilizuotos formos.

Peroralinis vartojimas

Šiame išradime aptariamos peroraliniam vartojimui skirtos kietos dozuotos formos, kurios yra aprašytos *Martin, Remington's Pharmaceuticals Sciences*, 18th Ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA 18042, chapter 89), kuris čia duodamas kaip literatūros šaltinis. Kietos dozuotos formos apima įvairias tabletes, kapsules, piliules, oblatas arba žirnelius. Šios kompozicijos gali būti įvestos į liposomas, arba panaudojamas įkapsuliavimas į baltymus (tokius kaip, pvz., į baltymines mikrosferas, aprašytas US patente Nr. 4925673). Gali būti panaudotas liposominis kapsuliavimas ir gali būti pagaminti liposomų dariniai su įvairiais polimerais (pvz. US patentas Nr. 5013556). Galimos kitos dozuotos formos, skirtos terapiniam naudojimui, aprašytos Marshall, in *Modern Pharmaceutics*, Chapter 10, Banker and Rhodes ed., (1979), kuris čia duodamas kaip literatūros šaltinis. Bendru atveju, į kompozicijas įeina baltymas (arba chemiškai modifikuotas baltymas) ir inertiniai ingredientai, kurie apsaugo baltymą nuo skrandžio aplinkos ir išskiria biologiškai aktyvią medžiagą žarnyne.

Specialiai aptariamas peroraliniam vartojimui skirtos aukščiau minėtų baltymų dozuotos formos. Baltymas gali būti chemiškai modifikuotas taip, kad būtų efektyvus darinio peroralinis vartojimas. Bendrai imant, aptariama cheminė modifikacija reiškia bent vienos liekanos prijungimą prie paties baltymo (arba peptido) molekulės, kur minėta liekana užtikrina (a) proteolizės inhibavimą ir (b) įvedimą į kraują iš skrandžio arba žarnyno. Taip pat pageidautina padidinti bendrą baltymo stabilumą ir jo cirkuliacijos laiką kraujyje. Tokių liekanų pavydžiais yra: polietilenglikolis, etilenglikolio ir propilenglikolio kopolimerai, karboksimetilceliuliozė, dekstranas, polivinilo alkoholis, polivinilpirolidonas ir poliprolinas [Abuchowski *et al.*, 1981, *supra*; Newmark *et al.*, *J. Appl. Biochem.*, 4:185-189 (1982)]. Kiti polimerai, kurie gali būti panaudoti, yra poli-1,3-dioksolanas ir poli-1,2,6-trioksokanas. Kaip aukščiau minėta, tinkamiausios farmaciniais tikslams yra polietilenglikolio liekanos.

Baltymo (arba darinio) išsiskyrimo vieta gali būti skrandis, mažasis žarnynas (dvylikapirštė žarna, storoji žarna arba klubinė žarna) arba didysis žarnynas. Patyręs specialistas galės sudaryti kompozicijas, kurios netirps skrandyje, o išskirs medžiagą dvylikapirštėje žarnoje arba kitoje žarnyno vietoje. Pageidautina apsaugoti medžiagą nuo

skrandžio aplinkos žalingo poveikio, arba apsaugant baltymą (arba darinį), arba išlaisvinant biologiškai aktyvią medžiagą ne skrandyje, o žarnyne.

Norint užtikrinti visišką atsparumą skrandžio aplinkos poveikiui, reikia panaudoti dangas, per kurias neprasisverbia medžiaga bent iki $\text{pH}=5.0$. Įprastų inertinių ingredientų, kurie naudojami enteriniam padengimui, pavyzdžiais yra celiuliozės acetato trimetilatas (CAT), hidroksipropilmetilceliuliozės ftalatas (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, polivinilacetato ftalatas (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, celiuliozės acetato ftalatas (CAP), Eudragit L, Eudragit S ir Shellac. Tokie padengimai gali būti naudojami kaip mišrios plėvelės.

Padengiančios medžiagos arba jų mišiniai gali būti naudojami ir tablečių padengimui, kurios nėra skirtos apsaugojimui nuo skrandžio aplinkos poveikio. Tai gali būti cukraus dangos arba dangos, kurios palengvina tabletės nurijimą. Kapsulės gali būti padarytos iš kieto apvalkalo (tokio kaip želatina) kietų vaistų, t.y. miltelių, įvedimui. Skystoms formoms gali būti panaudotas minkštas želatinos apvalkalas. Oblatų apvalkalo medžiaga gali būti tirštas krakmolos arba valgomas popierius. Piliulėms, kietoms tabletėms arba sutrintoms tabletėms gali būti panaudotos kieto sulipdymo metodikos.

Vaistinė medžiaga gali būti įterpiama į kompozicijas smulkių multidalelių, tokių kaip granulės arba rutuliukai, kurių dalelių dydis yra apie 1 mm, pavidalu. Kapsulių kompozicijų medžiaga taip pat galės būti milteliai, šiek tiek suspausti gabaliukai arba netgi tabletės. Vaistinė medžiaga paruošiama presavimo būdu.

Taip pat gali būti pridėta spalvą ir skonį suteikiančių agentų. Pavyzdžiui, gali būti suformuotas baltymas (arba darinys) (pvz., inkapsuliuotas į liposomas arba mikrosferas), ir po to dedamas į valgomą produktą, tokį kaip atšaldytas gėrimas, turintis spalvą ir skonį suteikiančių medžiagų.

Galima praskiesti arba padidinti terapinės medžiagos tūrį inertine medžiaga. Tokie skiedikliai gali būti angliavandeniai, ypač manitolis, α -laktozė, bevandenė laktozė, celiuliozė, sacharozė, modifikuoti dekstranai ir krakmolos. Kaip užpildai taip pat gali būti tam tikros neorganinės druskos, įskaitant kalcio trifosfatą, magnio karbonatą ir natrio chloridą. Kai kurie prekyboje esantys skiedikliai yra Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress ir Avicell.

Į terapines kietų dozuotų formų kompozicijas gali įeiti kietą formą ardančios medžiagos. Tokios medžiagos yra (bet jomis neapsiribojama) krakmolos, įskaitant prekybines ardančias medžiagas krakmolo pagrindu, tokias kaip Explotab. Taip pat gali būti naudojama krakmolo natrio glikolatas, amberlitas, natrio karboksimetilceliuliozė, ultramilopektinas, natrio alginatas, želatina, apelsinų žievelės, rūgštinė karboksimetilceliuliozė, natūrali kempinė ir bentonitas. Kitokios formos ardančios medžiagos yra netirpios katijonitinės dervos. Kaip ardančios medžiagos ir kaip rišikliai gali būti naudojamos miltelių pavidalo dervos, tokios kaip agaras, karaja arba tragakantas. Algino rūgštis ir jos natrio druska taip pat gali būti vartojamos kaip ardančios medžiagos.

Norint surišti terapinį agentą, suformuojant kietą tabletę, gali būti naudojami rišikliai; jie yra medžiagos iš gamtinių produktų, tokių kaip akacija, tragakantas, krakmolos ir želatina. Kitos medžiagos yra metilceliuliozė (MC), etilceliuliozė (EC) ir karboksimetilceliuliozė (CMC). Terapinės medžiagos granuliavimui gali būti naudojami polivinilpirolidono (PVP) ir hidroksipropilmetilceliuliozės (HPMC) tirpalai alkoholyje.

Į terapinių medžiagų kompozicijas gali įeiti medžiagos mažinančios stabilumą, kad būtų išvengiama sulipimo gaminant kompozicijas. Gali būti naudojami tepalai sluoksnio tarp terapinės medžiagos ir matricos sienelės sudarymui; jie yra (bet neapsiribojama): stearino rūgštis, įskaitant jos magnio ir kalcio druskas, politetrafluoretilenas (PTEE), skystas parafinas, augaliniai aliejai ir vašakai. Taip pat gali būti naudojami tirpūs tepalai, tokie kaip natrio laurilsulfatas, magnio laurilsulfatas, įvairių molekulinio svorio polietilenglikolis ir Carbowax 4000 ir 6000.

Galima pridėti medžiagų, lengvinančių slydimą, kad būtų pagerintos vaistų takumo savybės ir jo pasiskirstymas presavimo metu. Tokios slydimą lengvinančios medžiagos yra krakmolos, talkas, pirogeninis silicio dioksidas ir hidratuotas silikoaluminatas.

Norint palengvinti terapinės medžiagos ištirpimą vandeninėje terpėje, galima įdėti paviršiaus aktyviosios medžiagos, kaip drėkinimo agento. Paviršiaus aktyviosios medžiagos apima anijoninius detergentus, tokius kaip natrio laurilsulfatas, dioktilnatrio sulfosukcinatas ir dioktilnatrio sulfonatas. Gali būti naudojami katijoniniai detergentai, tokie kaip benzalkonio chloridas arba benzetonio chloridas. Į potencialių nejoninių detergentų, kurie gali būti kompozicijose kaip paviršiaus aktyviosios medžiagos, sąrašą įeina lauromakrogolis 400, polioksolio 40 stearatas, polioksietileno hidrintas ricinos aliejus

10, 50 ir 60, glicerolio monostearatas, polisorbatas 40, 60, 65 ir 80, sacharozės riebalinės rūgšties esteris, metilceliuliozė ir karboksimetilceliuliozė. Tokios paviršiaus aktyviosios medžiagos gali būti baltymo arba darinio kompozicijose arba vienos arba jų įvairių santykių mišiniai.

Priedai, kurie gali padidinti baltymo (arba darinio) įsisavinimą, yra, pavyzdžiui, riebalinės rūgštys- oleino, linoleino ir linoleno rūgštys.

Gali būti pageidaujamos kontroliuojamo išsiskyrimo kompozicijos. Vaistas gali būti inkorporuotas į inertinę matricą, kuri leidžia išsiskirti jam arba pagal difuzijos arba pagal išplovimo mechanizmą, t.y. į dervas. Į kompozicijas taip pat gali būti inkorporuotos lėtai degeneruojančios matricos. Kita šio vaisto kontroliuojamo išsiskyrimo forma yra forma, paremta Oros terapine sistema (Alza Corp.), t.y. vaistas yra patalpintas pusiau laidžioje membranoje, į kurią gali įeiti vanduo ir išstumti vaistą per vienintelę mažą skylutę dėl osmoso efektų. Uždelsto veikimo efektus taip pat turi ir kai kurios enterinės dangos.

Kompozicijoms gali būti naudojamos ir kitokios dangos. Tokios dangos gali būti įvairūs cukrūs, kurie gali būti panaudoti padengimo formoje. Terapiniai agentai gali būti ir plėvele padengtoje tabletėje; šiuo atveju naudojamos medžiagos skirstomos į 2 grupes. Pirmoji grupė yra neenterinės medžiagos; jos yra metilceliuliozė, etilceliuliozė, hidroksetilceliuliozė, metilhidroksetilceliuliozė, hidroksipropilceliuliozė, hidroksipropilmetilceliuliozė, natrio karboksimetilceliuliozė, providonas ir polietileno glikoliai. Antroji grupė yra enterinės medžiagos, kurios paprastai yra ftalio rūgšties esteriai.

Optimaliam padengimui plėvelėmis galima naudoti medžiagų mišinius. Padengimą plėvelėmis galima gauti, padengiant formose arba skysčio vonelėse arba padengiant presavimo būdu.

Pulmonarinis vartojimas

Šiame išradime taip pat aptariamas baltymo (arba jo darinų) pulmonarinis vartojimo būdas. Baltymas (arba darinys) paduodamas į žinduolio plaučius įkvepiant, ir pereina per plaučių epitelinį apvaskalą į kraują. Tokio tipo vartojimas aprašytas Adjei *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 7(6):565-569 (1990); Adjei *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (1990) (leuprolido acetatas); Braquet *et al.*, *Journal of*

Cardiovascular Pharmacology, 13(suppl. 5):143-146 (1989) (endotelinas-1); Hubbard *et al.*, *Annals of Internal Medicine*, 3(3):206-212 (1989) (α 1-antitripsinas); Smith *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 84:1145-1146 (1989) (α 1-proteinazė); Oswein *et al.*, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, (March 1990) (rekombinantinis žmogaus augimo hormonas); Debs *et al.*, *J. Immunol.*, 140:3482-3488 (1988) ir Platz *et al.*, US patentas Nr. 5284656 (granulocitų kolonijų stimuliuojantis faktorius). Šio išradimo praktikoje aptariama daugybė mechaninių įtaisų, skirtų terapinių produktų pulmonariniam vartojimui, įskaitant (bet neapsiribojant) pulverizatorius, dozuojamus inhaliatorius ir miltelių inhaliatorius, kurie yra žinomi šios srities specialistams.

Specifiniais tokių prekyboje esančių šio išradimo praktikoje tinkamų įtaisų pavyzdžiais yra Ultravent pulverizatorius, gaminamas Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; Acorn II pulverizatorius, gaminamas Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; Ventolin dozuojamas inhaliatorius, gaminamas Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina ir Spinhaler miltelių inhaliatorius, gaminamas Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Visiems šiems įtaisams reikia naudoti kompozicijas, tinkančias baltymo (arba darinio) išskyrimui. Paprastai kiekviena kompozicija yra charakteringa naudojamam įtaiso tipui, ir į ją gali įeiti atitinkama varanti medžiaga, apart įprastų terapijoje naudojamų skiediklių, stimuliatorių ir/arba nešiklių. Taip pat aptariamas liposomų, mikrokapsulių, mikrosferų, inkluzinių kompleksų arba kitokių nešiklių panaudojimas. Taip pat gali būti pagamintos įvairios chemiškai modifikuoto baltymo kompozicijos, priklausančios nuo cheminės modifikacijos tipo arba nuo naudojamam įtaiso tipo.

Kompozicijos, tinkamos vartoti pulverizatoriais, tiek sroviniais, tiek ultragarsiniais, paprastai turi baltymą (arba darinį), ištirpintą vandenyje, kuriame 1 ml tirpalo yra apie 0.1-25 mg biologiškai aktyvaus baltymo. Kompozicijose taip pat gali būti buferio ir paprasto cukraus (pvz., baltymo stabilizavimui ir osmoso slėgio reguliavimui). Pulverizatoriaus kompozicijose taip pat gali būti paviršiaus aktyvioji medžiaga, kad būtų sumažinama arba išvengiama paviršiaus sukeltos baltymo agregacijos, atsirandančios dėl tirpalo pulverizacijos susidarant aerozoliui.

Kompozicijos, skirtos dozuojamam inhaliacijos įtaisui, turi labai susmulkintus miltelius, kuriuose yra baltymas (arba darinys), suspenduotas varančioje medžiagoje, panaudojant paviršiaus aktyvią medžiagą. Varančia medžiaga gali būti bet kokia šiam tikslui tinkama medžiaga, tokia kaip chlorfluoranglis, hidrochlorfluoranglis, hidrofluoranglis arba angliavandenilis, įskaitant trichlorfluormetaną, dichlordifluormetaną, dichlortetrafluoretanolį ir 1,1,1,2-tetrafluoretaną arba jų kombinacijas. Tinkamos paviršiaus aktyvios medžiagos yra sorbitano trioleatas ir sojos lecitinas. Kaip paviršiaus aktyvioji medžiaga gali būti ir oleino rūgštis.

Kompozicijos, skirtos miltelių inhaliacijos įtaisams, turi labai susmulkintus miltelius, kuriuose yra baltymo (arba darinio) ir jose taip pat gali būti užpildai, tokie kaip laktozė, sorbitolis, sacharozė arba manitolis tokiais kiekiais, kurie palengvina miltelių dispergavimą iš įtaiso, pvz., jų gali būti 50-90%, skaičiuojant nuo viso kompozicijos svorio. Geriausia pagaminti susmulkintos formos baltymą, kurio vidutinis dalelių dydis būtų mažesnis nei 10 μm (arba mikronų), dar geriau 0,5-5 μm , kad jis efektyviau patektų į distalinius plaučius.

Nazalinis vartojimas

Šiame išradime taip pat aptariamas baltymo (arba darinio) nazalinis vartojimas. Nazalinis įvedimas leidžia patekti baltymui į kraują tiesiog paduodant terapinį produktą į nosį, ir jam nebūtina nusėsti plaučiuose. Nazalinio vartojimo kompozicijose yra dekstrano arba ciklodekstrano.

Gydymo būdai, medikamento pagaminimo būdai

Dar vienas šio išradimo aspektas yra gydymo ir medikamento pagaminimo būdai. Būsenos, kurias palengvina arba moduliuoja šio išradimo darinių vartojimas, yra paminėtos aukščiau.

Dozės

Bus pateikta informacija apie visas aukščiau minėtas molekules, kurios buvo papildomai ištirtos, leidžianti nustatyti atitinkamus dozių kiekius, reikalingus įvairių būsenų gydymui, ir eilinis patyręs darbuotojas, atsižvelgdamas į terapinį kontekstą, recepto amžių ir bendrą sveikatos būseną, galės parinkti reikiamą dozę. Bendrai imant, injekcijos arba infuzijos atveju dozės bus tarp 0,01 μg biologiškai aktyvaus baltymo kūno svorio kilogramui (skaičiuojant vien tik baltymo masę, be cheminės modifikacijos) ir 10 mg/kg. Dozavimo režimas gali keistis priklausomai nuo vartojamo baltymo arba darinio cirkuliacijos puslaikio ir nuo to, ar vartojamas polipeptidas įvedamas kaip atskira dozė, ar naudojama nepertraukiama infuzija, o taip pat ir nuo vartojamos kompozicijos.

Vartojimas su kitais junginiais

Su nutukimu susijusioje terapijoje šį baltymą (arba darinius) galima vartoti kartu su viena arba keliomis farmacinėmis kompozicijomis, naudojamomis kitų klinikinių nutukimo komplikacijų, tokių kaip diabeto (pvz., insulinas), aukšto kraujo spaudimo, didelio cholesterolio kiekio ir kitų nepalankių, su nutukimu susijusių būsenų gydymui. Kartu gali būti skiriami ir kiti apetitą mažinantys vaistai, pvz., amfetaminai. Vaistai gali būti vartojami vienu metu (pvz., skiriamas šio išradimo baltymo ir insulino mišinys) arba gali būti *in seriatim*.

Terapinis gydymas, paremtas nukleino rūgštimis

OB genas gali būti įvestas į žmogaus riebalines ląsteles nutukimo geninei terapijai realizuoti. Galima laukti, kad tokia terapija mažins kūno svorį. Atvirkščiai, įvedus antiprasminius darinius į žmogaus riebalines ląsteles, gali būti sumažinami aktyvaus OB polipeptido kiekiai ir galima laukti kūno svorio padidėjimo.

Viename realizavimo variante OB polipeptidą koduojantis genas įvedamas *in vivo* į virusinį vektorių. Tokie vektoriai apima sumažintus arba defektinės DNR virusus, tokius kaip paprastosios pūslelinės virusą (HSV), papilomos virusą, Epstein-Barr virusą (EBV), adenovirusą, susijusį su adena virusą (AAV) ir pan., bet jais neapsiribojama. Pageidautini defektiniai virusai, kuriuose visai nėra arba beveik nėra virusinių genų. Defektiniai virusai,

įvedus juos į ląstelę, yra neefektyvūs. Defektinių virusinių vektorių panaudojimas leidžia įvesti juos į ląsteles specifinėje lokalizuotoje vietoje, nesirūpinant, kad vektorius gali infekuoti kitas ląsteles. Tokiu būdu, specifiniu taikiniu yra riebalinis audinys. Tokių ypatingų vektorių pavyzdžiais gali būti (bet neapsiribojama) defektinio pūslelinės viruso 1 (HSV1) vektorius [Kaplitt *et al.*, *Molec. Cell. Neurosci.*, 2:320-330 (1991)], susilpninto adenoviruso vektorius, toks kaip vektorius, kurį aprašė Stratford-Perricaudet *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 90:626-630 (1992) ir defektyvaus susijusio su adena viruso vektorius [Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 61:3096-3101 (1987); Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 63:3822-3828 (1989)].

Dar kitame realizavimo variante genas gali būti įvestas į retrovirusinį vektorių, pvz., tokį, kuris aprašytas Anderson *et al.*, US patentas Nr. 5399346; Mann *et al.*, *Cell*, 33:153 (1983); Temin *et al.*, US patentas Nr. 4650764; Temin *et al.*, US patentas Nr. 4980289; Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120 (1988); Temin *et al.*, US patentas Nr. 5124263; tarptautinė paraiška WO 95/07358 (Dougherty *et al.*, 1995 m. kovo 16 d.) ir Kuo *et al.*, *Blood*, 82:845 (1993).

Kitu atveju vektorius gali būti įvestas *in vivo*, panaudojant lipofekciją. Per praėjusį dešimtmetį nukleido rūgščių transfekcijai ir inkapsuliacijai *in vitro* buvo vis plačiau naudojamos liposomos. Sukurti sintetiniai katijoniniai lipidai, skirti sunkumų ir pavojų, susijusių su liposomų skatinama transfekcija, mažinimui, gali būti panaudoti pagaminti liposomoms, skirtoms geno, koduojančio markerį, transfekcijai *in vivo* [Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7417 (1987), žr. Mackey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8027-8031 (1988)]. Katijoninių lipidų panaudojimas gali skatinti neigiamai įkrautų nukleino rūgščių inkapsuliavimą ir taip padėti neigiamai įkrautų ląstelių membranų suliejimui [Felgner *et al.*, *Science*, 337:387-388 (1989)]. Lipofekcijos panaudojimas egzogeninių genų įvedimui į specifinius organus *in vivo* turi tam tikrų praktinių privalumų. Liposomų molekulinis įvedimas į specifines ląsteles atstovauja vieną naudingumo sritį. Suprantama, kad transfekcijos nukreipimas į tam tikrų tipų ląsteles, bus ypatingai naudingas audiniuose, kur yra ląstelių heterogeniškumas, tokiuose kaip kasa, kepenys, inkstai ir smegenys. Lipidai gali būti chemiškai sujungti su kitomis molekulėmis įvedimo tikslams (žr. Mackey *et al.*, 1988, *supra*). Tiksliniai peptidai, pvz., hormonai arba neuromediatoriai, ir baltymai, tokie kaip antikūnai arba nepeptidų molekulės, gali būti chemiškai sujungti su liposomomis.

Taip pat galima *in vivo* įvesti vektorių, kaip gryną DNR plazmidę. Grynos DNR vektoriai genų terapijos tikslams gali būti įvesti į norimas šeimininko ląsteles, panaudojant žinomus metodus, pvz., transfekciją, elektroporaciją, mikroinjekciją, transdukciją, ląstelių suliejimą, DEAE dekstraną, nusodinimą kalcio fosfatu, panaudojant geninį šautuvą arba DNR vektoriaus transporterį [žr., pvz., Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:963-967 (1992); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624 (1988); Hartmut *et al.*, Kanados patentas Nr. 2012311, užpildytas 1990 m. kovo 15 d.].

Pritaikymas žemės ūkyje

OB genas taip pat gali būti išskirtas iš naminių gyvulių, ir taip gaunamas atitinkamas OB polipeptidas. Specifiniame pavyzdyje, *infra*, zondas, išvestas iš pelės OB geno, hibridizuojasi su atitinkama homologine koduojančia seka iš daugelio gyvulių rūšių. Kaip buvo aptarta žmonių terapijos atveju, gali būti pagaminti rekombinantiniai baltymai ir panaudoti naminiams gyvuliams. Polipeptidas gali būti duodamas, norint gauti mažiau riebius maistinius gyvulius, tokius kaip galvijai, kiaulės, paukščiai, avys ir t.t. Geriausia panaudoti autologinį OB polipeptidą, nors išradime aptariamas taip pat ir anti-autologinio peptido panaudojimas. Kadangi OB polipeptidas susideda iš maždaug 160 aminorūgščių liekanų, jis negali būti labai imunogeniškas. Taigi, neautologinio peptido panaudojimas gali neduoti imuninio atsako.

Kitu atveju, klonuotų genų įvedimas į transgeninius naminius gyvulius suteiktų galimybę potencialiai sumažinti kūno svorį ir nutukimą dėl OB transgeno padidintos ekspresijos. Paprasčiausi būdai šiam tikslui pasiekti būtų nukreipti OB transgeną į riebalus, naudojant jo nuosavą arba kitokį riebalams specifinį promotorių.

Atvirkščiai, kitais atvejais gali būti reikalinga padidinti kūno riebalų kiekį, pavyzdžiui, gaunant Kobe jautieną arba riebias kepenis, norint pagaminti foie gras. Tą galima realizuoti, nukreipiant antiprasminį OB transgeną į riebalus, arba panaudojant geninio nokauto technologiją. Kitu būdu, jeigu norima padidinti kūno svorį riebalų padidėjimo sąskaita, gali būti naudojamas OB polipeptido antagonistas. Tokie antagonistai yra (bet jais neapsiribojama) reaguojantys su OB polipeptidu antikūnai ir

polipeptido fragmentai, kurie rišasi, bet neaktyvuoja OB receptoriaus, t.y. OB polipeptido antagonistai.

Kosmetinė reikšmė

OB polipeptidas, apart jo medicininės reikšmės, yra labai svarbus ir kosmetikoje. Atskiru atveju, kadangi šio išradimo polipeptidai, įskaitant jų darinius ir antagonistinius analogus, yra tinkami riebalinių ląstelių susikaupimo gyvūnų organizmuose greičio moduliavimui, jie tinka negražiai atrodančių riebalinių audinių, pvz., riebalų sankaupų ant pilvo, šlaunų, kaklo ir smakro kiekio sumažinimui, kurie nebūtinai susiję su nutukimu, bet kurie vis tik gadina individo išvaizdą. Manoma, kad galima sumažinti riebalų kiekį, bent dalinai sumažinant apetitą, t.y. sumažinant maisto sunaudojimą, ir didinant pagrindinį metabolizmą, arba panaudojant abi priemones. Taigi, šį OB polipeptidą, jo darinius arba agonisto analogus galima skirti subjektui, norint gauti kosmetinius pokyčius riebalų sankaupose, moduluojant riebalų susikaupimą, mažinant apetitą arba naudojant abi priemones.

Be to, tokios kompozicijos ir metodai gali būti naudojami kartu su įvairiais kitais būdais, tokiais kaip kosmetinė chirurgija, skirta pakeisti bendrą kūno išvaizdą (pvz., liposiurbimą arba lazerinę chirurgiją, skirtą kūno masės sumažinimui, aspiruojant arba pašalinant riebalinį audinį), pratimus (ypatingai bėgimą ir svorių kilnojimą), mažai riebalų turinčią dietą, hipnozę, maisto šalinimą, kuriuos galima bandyti naudoti riebalinio audinio kiekio sumažinimui ir kūno išvaizdos pagerinimui.

Tokiu būdu, šis išradimas susijęs su individų kosmetinio riebalinio audinio moduliavimo būdu, kuris apima OB polipeptido, jo darinio arba jo agonistinio analogo, moduluojančio riebalų kiekį, kiekio skyrimą individui, kuris pageidauja tokios kosmetinės moduliacijos, kad būtų pagerinta bendra kūno išvaizda. Atskiru atveju, riebalinio audinio moduliavimas yra apetito sumažinimo išdava. Geriau, kai riebalinio audinio moduliavimas yra riebalinio audinio sumažinimas.

Dar vienas šio išradimo variantas susijęs su metodu, skirtu kosmetiniam riebalinio audinio pašalinimui, kuris apima kūno išvaizdos pakeitimo procedūros kombinavimą su OB polipeptido, jo darinio arba jo agonisto analogo riebalus moduluojančio kiekio

skyrimui individui, kuris pageidauja tokios kosmetinės riebalinio audinio moduliacijos, kad būtų pagerinta bendra kūno išvaizda.

OB receptorius

OB faktoriaus mažų molekulių-agonistų ir antagonistų sukūrimas bus labai palengvintas, išskyrus jo receptorių. Tai gali būti atliekama, pagaminant aktyvų OB polipeptidą ir naudojant jį ekspresijos bibliotekos skryningui pagal standartinę metodologiją. Receptoriaus susirišimas ekspresijos bibliotekoje gali būti nustatytas, įvedant rekombinantinį polipeptidą, pagamintą naudojant arba bakterinius, arba žinduolių ekspresijos vektorius ir stebint rekombinantinio polipeptido trumpalaikio arba nepertraukiamo įvedimo efektus į ekspresijos bibliotekos ląsteles, arba tiesiogiai nustatant OB polipeptido susirišimą su ląstelėmis.

Kadangi dabar manoma, kad OB receptorius tikriausiai yra pagumburyje ir, gal būt, kepenyse, geriausia konstruoti kDNR bibliotekas iš šių audinių standartinės ekspresijos klonavimo vektoriuose. Po to tokie kDNR klonai galėtų būti įvedami į COS ląsteles, kaip grupės, ir gauti transformantai būtų atrenkami su aktyviu ligandu, norint nustatyti COS ląsteles, ekspresuojančias OB receptorius. Tada gali būti išskiriami teigiami klonai klonuotam receptoriui išgauti. Klonuotą receptorių galima būtų panaudoti kartu su OB ligandu (laikant, kad jis yra hormonas), norint išaiškinti mažų molekulių OB moduliatorių skryningui reikalingus komponentus.

Tam tikra bandyminė sistema, kurią reikia naudoti pagal šį išradimą, yra žinoma kaip receptoriaus tyrimo sistema. Receptoriaus tyrimuose, bandomoji medžiaga yra atitinkamai pažymėta, ir tada tam tikros bandomųjų ląstelių kolonijos inokuliuojamos tam tikru kiekiu žymėtos ir nežymėtos medžiagos, o po to atliekami susirišimo tyrimai, norint nustatyti žymėtos medžiagos susirišimo su ląstelių receptoriais laipsnį. Šiuo būdu galima nustatyti medžiagų afiniškumo skirtumus.

Tokiu būdu, galima radiopažymėti tam tikrą išvalyto svorio modulatoriaus kiekį ir sumaišyti jį, pavyzdžiui, su antikūnais arba kitais jo inhibitoriais, o po to reikia atlikti susirišimo bandymus. Tada reikia pagaminti tirpalus, kuriuose yra įvairūs nesumaišyto žymėto ir nežymėto svorio modulatoriaus kiekiai, inokuliuoti ląstelių mėginius, ir

inkubuoti. Po to, gauti ląstelių monosluoksniai plaunami, solubilizuojami ir skaičiuojama gama-skaitliukais tokį laiką, kad standartinė paklaida būtų $<5\%$. Duomenys analizuojami Scatchard metodu ir daromos išvados apie medžiagos aktyvumą. Tai, kas aukščiau aprašyta, yra pavyzdys, iliustruojantis būdą, kaip galima ištirti receptorių ir panaudoti tuo atveju, kai tiriamosios medžiagos ląstelių susirišimo geba gali tarnauti kaip charakteristika. Receptoriaus tyrimas savo ruožtu yra ypatingai naudingas, identifikuojant specifinius receptorius šio išradimo modulatoriams, tokius kaip *db* receptorius.

Kitas tyrimas, tinkamas naudoti ir svarstomas šiame išradime, yra žinomas kaip "cis/trans" tyrimas. Trumpai tariant, šiame tyrime naudojami du genetiniai dariniai; vienas iš jų paprastai yra plazmidė, kuri nepertraukiamai ekspresuoja tam tikrą dominantinį receptorių, kai yra transfekuota į atitinkamą ląstelių liniją, o antrasis yra plazmidė, kuri ekspresuoja reporterį, tokį kaip liuciferazė, kontroliuojamą receptoriaus/ligando komplekso. Taigi, pavyzdžiui, jei norima įvertinti junginį, kaip tam tikro receptoriaus ligandą, viena iš plazmidžių turi būti darinys, kuris duoda pasirinktos ląstelių linijos receptoriaus ekspresiją, o antroji plazmidė turi turėti promotorių, prijungtą prie liuciferazės geno, į kurį įterptas atsako elementas tam tikram receptoriui, o gautas kompleksas prjungs atsako elementą ir inicijuos liuciferazės geno ekspresiją. Tada, atsirandanti chemoluminescencija matuojama fotometriniu būdu, gaunamos dozė-atsakas kreivės ir lyginama su žinomais ligandais. Tokia metodika smulkiai aprašyta US patente Nr. 4981784 ir tarptautinėje paraiškoje WO 88/03168.

Jeigu jau nustatytas rekombinantas, kuris ekspresuoja OB receptoriaus geno seką, galima analizuoti OB receptorių. Tai galima atlikti bandymais, paremtais OB receptoriaus fizikinėmis arba funkcinėmis savybėmis, įskaitant receptoriaus žymėjimą radioaktyviaisiais izotopais, o po to atliekant gel-elektroforezę, imunotyrimus, ligando susirišimą ir t.t. Be to, galima generuoti antikūnus prieš ob receptorių, kaip aprašyta aukščiau.

OB receptoriaus struktūrą galima tirti įvairiais žinomais metodais. Pageidautina ištirti įvairių dalių struktūrą, ypač OB rišančios dalies. Struktūrinę analizę galima atlikti, nustatant sekos panašumą su kitais žinomais baltymais, ypač hormonų ir baltymų receptoriais. Panašumo (arba homologijos) laipsnis gali duoti pagrindą OB receptoriaus arba jo dalies struktūros ir funkcijos numatymui. Specialiame realizavimo variante galima

atlikti sekų palyginimą su sekomis, randamomis GenBank, naudojant, pavyzdžiui, FASTA ir FASTP programas [Pearson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-48 (1988)].

Baltymo seka gali būti papildomai apibūdinta, atliekant hidrofiliškumo analizę (pvz., Hopp *et al.*, 1981, *supra*). Hidrofiliškumo vaizdas gali būti panaudotas OB receptoriaus baltymo hidrofobinėms ir hidrofilinėms sritims nustatyti, kurios savo ruožtu gali parodyti ekstracitoplazmines, susirišimo su membranomis ir intracitoplazmines sritis.

Taip pat galima atlikti antrinės struktūros analizę (pvz., Chou *et al.*, 1974, *supra*), norint nustatyti OB receptoriaus sritis, kurios sudaro specifines antrines struktūras.

Panaudojant žinomas kompiuterines programas, galima atlikti manipuliaciją, transliaciją ir antrinės struktūros numatymą, o taip pat atviro skaitymo rėmelio numatymą ir atvaizdavimą.

Pasigaminus didesnę rekombinantinio OB polipeptido kiekį ir turint galymybę išskirti OB receptorių (t.y. *db* geno produktą), šis išradimas įgalina atlikti OB polipeptido ir OB receptoriaus arba jo dalies aktyvios konformacijos kiekybinę struktūrinę analizę. Atskiru atveju, turint pakankamai medžiagos, galima atlikti branduolių magnetinio rezonanso (BMR), Ramano ir ultravioletinių spindulių (UV), ypatingai cirkuliarinio dichroizmo (CD), spektrų analizę. Ypatingai BMR yra labai galingas molekulių, esančių tirpale, kur labiausiai priartėjama prie natyvaus apsupimo, struktūrinės analizės metodas [Marion *et al.*, 1983, *supra*; Bar *et al.*, 1985, *supra*; Kimura *et al.*, 1980, *supra*]. Taip pat gali būti naudojami ir kiti struktūrinės analizės metodai. Į tokius metodus įeina (bet neapsiribojama) Rentgeno spindulių kristalografija (Engstrom, 1974, *supra*).

Dar labiau pageidautina ištirti OB polipeptido ir OB receptoriaus kokristalus. Kokristalų analizė duoda detalią informaciją apie susirišimą, kuri savo ruožtu leidžia racionaliai projektuoti ligandų agonistus ir antagonistus. Taip pat galima panaudoti kompiuterinį modeliavimą, ypač kartu su BMR ir Rentgeno spindulių metodais [Fletterick *et al.*, eds., *Computer Graphics and Molecular Modeling, in Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1986)].

Geno, koduojančio šio išradimo OB receptorių, nustatymas ir išskyrimas duoda galymybę ekspresuoti didesnius nei galima išskirti iš natūralių šaltinių receptoriaus kiekius, arba indikatorinėse ląstelėse, kurios yra specialiai sukurtos receptoriaus, ekspresuoto po

ląstelių transfekcijos arba transformacijos, aktyvumo identifikavimui. Tokiu būdu, apart racionalaus agonistų ir antagonistų projektavimo, paremto OB polipeptido struktūra, šiame išradime aptariamas ir alternatyvus metodas specifinių OB receptoriams ligandų identifikavimui, naudojant įvairius žinomus skryningo bandymus.

Išradimas bus geriau suprantamas iš toliau duodamų pavyzdžių, kurie duodami pademonstravimui ir neriboja jo apimties.

PAVYZDŽIAI

Toliau aprašomas metodas, naudojamas genetinės medžiagos identifikavimui, kuris duodamas kaip šį išradimą paaiškinantis pavyzdys. Šis pavyzdys apima keturias viena po kitos einančias stadijas: A) genetinio žemėlapių sudarymą, B) fizikinio žemėlapių sudarymą, C) kandidatinio geno išskyrimą ir D) mutacijos nustatymą. Patvirtinus tikslinio pelės geno išskyrimą (D stadija), buvo ieškoma homologinio žmogaus geno ir charakterizuoti tiek pelės, tiek žmogaus genai bei laukiami baltymai. Šios stadijos smulkiai aprašytos žemiau.

A. Genetinio žemėlapių sudarymas

db mutacija buvo suskaldyta genetiniuose hibriduose, ir mutacijos padėties RFLP (restrikcijos fragmento ilgio polimorfizmo) atžvilgiu nustatymui panaudota standartinė sukibimo analizė. Šie duomenys patalpino geną ~5 cM atstumu nuo artimiausios pelės 6 chromosomos (5 cM yra genetinio atstumo matas, atitinkantis 5 aiškius genetinius organizmus, atsirandančius atliekant genetinį sukryžminimą 100 gyvuliukų). Buvo generuota iš viso 771 informatyvi mejozė ir panaudota genetinio žemėlapių sudarymui [Friedman *et al.*, 1991, *supra*]. Visi genetiniai lokusai, kurių vieta žemėlapyje nustatyta, buvo publikuoti anksčiau. Du artimiausi aprašyti RFLP buvo nustatyti, panaudojant zondus, išvestus iš karboksipeptidazės ir *met* onkogeno genų.

Aukščiau aprašytas genetinių eksperimentų atlikimas buvo neadekvatus *ob* klonui iš principo todėl, kad nė vienas iš genetinių markerių nedavė tampraus surišimo. Norint identifikuoti būtinus tampriai surištus RFLP, buvi išskirti papildomi zondai ir išplėstas genetinis krosas. Atsitiktinių DNR gabaliukų iš artimiausios pelės 6 chromosomos

išskirimui panaudotas žinomas chromosomos mikrodisekcijos metodas [Bahary *et al.*, *Mammalian Genome*, 4:511-515 (1993)]. Ištirta, ar susidaro tamprus ryšys tarp atskirų klonuotų zondų ir *ob*. Remiantis šiais tyrimais, atrinktas vienas zondas D6Rck13, dar vadinamas psd3, tolimesnei analizei dėka jo genetinio artumo OB. Šis zondas buvo panaudotas nustatyti 835 *ob* palikuonių iš interspecifinių ir intersubspecifinių krosų genotipui, ir pasirodė, kad D6Rck13 yra nerekombinantinis visuose 835 gyvuliukuose, kaip aprašė Bahary ir kt. Sudarant fizikinį žemėlapi, buvo identifikuotas naujas polimorfinis markeris iš kosmidinio subklono, išvesto iš YAC 53A6. Šis naujasis markeris buvo pastatytas tarp D6Rck13 ir OB geno ir panaudotas papildomų 771 informatyvių mejozių iš interspecifinių interkrosų ir atvirkštinių krosų genotipų nustatymui. Nustatyta, kad vienas gyvuliukas #167 turi rekombinantinį krosingoverį tarp *ob* ir D6Rck39. Šie tyrimai parodė, kad D6Rck13/D6Rck39 yra $\sim 0,06$ cM nuo *ob*. Buvo identifikuotas papildomas zondas, *Pax4*, kuris buvo 0,12 cM prie *ob*. *Pax4* buvo rekombinantas dviejuose gyvuliukuose: #111 ir #420. *Pax4* yra pseudogenas, kurį anksčiau Gruss ir bendradarbiai rado prie pat pelės 6 chromosomos [Gruss *et al.*, *Genomics*, 11:424-434 (1991)]. Remiantis šiais duomenimis, nustatyta, kad OB genas yra $\sim 0,2$ cM intervale tarp *Pax4* ir D6Rck13. Todėl buvo bandoma klonuoti įvedamą DNR, stengiantis išskirti OB.

B. Fizikinio žemėlapio sudarymas

DNR klonavimui šiame intervale reikėjo panaudoti mielių dirbtines chromosomas (YAC) - santykinai naują klonavimo vektorių, kuris leidžia klonuoti ilgus besiribojančius DNR tarpus, kurių ilgiai dažnai yra daugiau nei milijonas bazių porų.

Mielių dirbtinės chromosomos buvo išskirtos, panaudojant D6Rck13 ir *Pax4*. Tai buvo padaryta, pagaminant išvalytas DNR ir panaudojant jas atitinkamų YAC išskirimui. Buvo išskirti ir apibūdinti tokie YAC (#8, #16, #107 ir #24), ir remiantis gautais analizės duomenimis, buvo padaryta išvada, kad YAC16 yra YAC, kuri yra toliau nutolusi, t.y. arčiau *ob*. Tada buvo regeneruotas YAC#16 raktinis galas, ir buvo nustatyta, kad šis galas yra arčiau *ob* nei *Pax4*. Šis galas buvo pavadintas 16M(+). Tokia išvada buvo padaryta todėl, kadangi buvo parodyta, kad šis mėginys nėra rekombinantinis gyvuliukuose #420 (kaip kad buvo *Pax4* atveju). Šis galas buvo sekvenuotas ir panaudotas, atliekant PCR bandymą. PCR bandymas panaudotas YAC bibliotekos skryningui. Išskirti keturi teigiami

klonai. Tolimesnis šitų YAC apibūdinimas, panaudojant galo išlaisvinimą, restrikcijos žemėlapiu nustatymą, pulsuojančio lauko gel-elektroforezę ir southern blotingą su genetinėmis krosais, parodė, kad dvi iš šių YAC, *adu* ir *aad*, yra labai esminės tolimesniems tyrimams. YAC *aad* yra 550 kB nechimerinė YAC, kuri toliau tęsiasi distališkai. Todėl, šios YAC distalinis galas, *aad*(pICL), buvo panaudotas fizikinio žemėlapiu užbaigimui. YAC *adu* yra 370 kB nechimerinė YAC, ir buvo nustatyta, kad jos distalinis galas, *adu*(+), yra nerekombinantinis visuose *ob* genetinių krosų palikuonyse, įskaitant gyvuliukus #111 ir #167, kas leidžia manyti, kad OB genas gali būti šioje YAC.

Buvo atliktas šių dviejų galų, *aad*(pICL) ir *adu*(+), PCR bandymas ir panaudota daugiau YAC ir P1 klonų išskyrimui, kad būtų galima toliau tirti fizikinio žemėlapiu sudarymą. Svarbūs P1 klonai, išskirti šiuo būdu, buvo 498, 499 ir 500 (išskirti, panaudojant zondą, išvestą iš *aad*(pICL)) ir 322, 323 ir 324 (panaudojant zondą iš *adu*(+)).

Dabartiniu metu buvo apibūdintos YAC, išskirtos panaudojant D6Rck13 (53A8, 25A8, 25A9, 25A10). Iš šių tyrimų nustatyta, kad 53A6 tęsiasi toliau link *aad* YAC. Nustatyta, kad tarpo tarp 53A6 ir *aad* dydis yra ~70 kB. Tada trijų prieinamų YAC bibliotekų ir P1 bibliotekos skyrinui panaudotas 53A6, 53(pICL) raktinis galas. Išskirtas esminis P1 klonas 325. Šis P1 klonas persidengė su P1 klonais, išskirtais, panaudojant *aad*(pICL), kaip aprašyta aukščiau, ir todėl jis pasitarnavo tarpo tarp 53(pICL) ir *aad*(pICL) užpildymui. Pasinaudojant šiais duomenimis, buvo klonuota ištisinė sandauga, turinti YAC ir P1 klonus, ~2,5 milijono bazių porų ilgio ir aprėpanti *Pax4*, 16M(+), *adu*(+), *aad*(pICL), 53(pICL), D6Rck39 ir D6Rck13. Rūpestingai sudedant į žemėlapi rekombinacijos vietas, pastebimas gyvuliukuose #111 ir #167, buvo padaryta išvada, kad OB yra 400 kB intervale. Norint gauti dirbančios DNR šaltinį OB geno išskyrimui, buvo išskirta apie 500 kB, dengiančių šią nerekombinaninę sritį iš viso 24-se P1 klonuose. Šie P1 klonai, įskaitant 322 ir 323, kurie, kaip vėliau nustatyta, yra naudingi klonai, buvo panaudoti egzonų imobilizavimui.

Chromosomos, kurioje yra OB, fizikinio žemėlapiu dalis parodyta fig. 7A. Fig. 7B vaizduoja YAC sandaugą. Fig. 7C vaizduoja P1 sandaugą.

C. Kandidatinių genų išskyrimas

Metodas, panaudotas šio intervalo genams išskirti, buvo egzonų imobilizavimas. Šiame metode panaudotas komercinis vektorius egzono DNR (t.y. koduojančių sekų) identifikavimui, pasirenkant funkciniam sujungimui genominės DNR akceptorines ir donorines sekas, įvestas į bandomąjį darinį. Buvo auginama DNR iš šių P1 klonų ir subklonuota į egzono imobilizavimo vektorių. Šie klonai buvo trumpi intarpai, klonuoti į Bluescript vektorių. Kiekvienas klonas buvo PCR-amplifikuotas su PCR pradmenimis, atitinkančiais plazmidės sekas, kurios flankuoja intarpą. PCR amplifikacija atlikta tiesiogiai į bakterijas, kurios turi plazmidę. Reakcija atlikta, naudojant Biomek robotą. Atlikta PCR produktų elektroforezė 1% agarozės gelyje TBE buferyje, kuriame buvo etidžio bromido. Buvo modifikuota egzonų imobilizavimo metodika, norint pašalinti *E.coli* DNR priemaišas iš P1 klonų, ir išrinkti gausius artefaktinius egzonus, kurie viršijo 80-90%, skaičiuojant pagal laukiamus egzonus. Egzonų vektorius apima HIV sekas; trumpas šių vektorių sekų segmentas atitinka minėtą artefaktą.

Egzono imobilizavimo eksperimentas buvo atliktas, naudojant įvairius P1 klonus. Tada egzono imobilizavimo produktai buvo amplifikuoti PCR metodu, atrinkti ir sekvenuoti. Numatomų "egzonų" sekos buvo palygintos su sekomis GenBank'e, naudojant Blast kompiuterinę programą. Buvo atrinkta apie penkiolika egzonų tolimesniam tyrimui RT-PCR, northerno analizės ir zooblotingo metodais, norint nustatyti, ar yra atitinkamos RNR arba išlaikytos sekos. Buvo rasta, kad septyni iš penkiolikos laukiamų egzonų - 325-2, 323-9, 322-5, D1-F7, 1H3 ir 2G7 - koduoja RNR transkriptą. 325-2 yra specifinis sėklidės genas; panašu, kad 323-8 ir 323-9 yra du egzonai iš to pačio geno, ekspresuojami pagrindinai smegenyse ir inkstuose. 1H3 ir 322-5 atstovauja dviem žemo lygio smegenų transkriptams. D1-F7 yra egzonas iš anksčiau klonuoto geno, *inosine monophosphate dehydrogenase* (IMPDH), kuris turi visur esančios ekspresijos vaizdą. Pasirodo, kad nei vienas iš šių genų nekoduoja OB. 2G7, kuris yra OB egzonas, aptariamas žemiau.

Po trijų nesėkmingų bandymų sugauti egzoną OB gene, buvo padarytas mėginimas sulieti DNR iš visų P1 iš kritinės OB srities. Tokie P1 buvo: 258, 259, 322, 323, 324, 325, 498, 899, 500, 653, 654 ir kiti. Po to 258, 260, 322, 498 ir 499 P1 buvo subklonuoti į egzono gaudymo vektorių, o po to buvo paruoštos kelios plokštelės su bakteriniais klonais, kurių kiekviename buvo numatomas egzonas. Buvo gauti 192 klonai, atstovaujantys numatomus OB kandidatus. Kaip aukščiau minėta, buvo pastebėtas pastovus artefaktas, rodantis kad

daug izoliatų turi du sugautus egzonus, išvestus iš vektoriaus. Tokiu būdu, buvo nustatyti klonai tiek pagal jų dydį, tiek ir pagal tai, kad DNR zondai, atitinkantys šį artefaktą, hibridizuojasi su atitinkamomis juostelėmis gelio southern blotinge. Nebuvo galima atrinkti artefaktų, remiantis vien tik dydžiu, kadangi reikėtų išmesti ir egzoną atitinkantį OB.

Tokiu būdu, iš 192 egzonų tolimesniems tyrimams buvo atrinkti septyni. Buvo paruoštos matricos septynių egzonų sekų nustatymui ir nustatytos sekos. Išanalizuotos septynios egzonų sekos ir rasta, kad septyni buvo identiški, o vienas buvo aiškus artefaktas. Konkrečiau, klonas 1D12 turėjo "HIV seką", t.y. artefakto juosta. Tolimesnei analizei liko trys egzonai: 1F1, 2G7 ir 1H3. 1F1 buvo eliminuotas, kadangi jis yra už kritinės srities. Abiems 1H3 ir 2G7 egzonams parinkti ir sintezuoti PCR pradmenys.

Nustatyta egzono 2G7 seka; ji parodyta fig. 10 (SEQ ID NO:7). Parinkti ir sintezuoti PCR pradmenys 2G7. Sekų, atitinkančių PCR pradmenis, dalys yra pabrauktos. Panaudoti pradmenys yra:

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

(SEQ ID NO:8)

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

(SEQ ID NO:9)

Šie pradmenys amplifikavo genominę DNR, esant tokioms PCR sąlygoms: 25-30 ciklų renatūracija 55°C temperatūroje 2', 72°C išlyginimas 2', denatūracija 94°C temperatūroje 1' standartiniame PCR buferyje. Šie pradmenys taip pat buvo panaudoti žymėtų zonų generavimui, įvedant ³²P-dCTP į PCR reakciją, redukuojant tam tikrame šalto dCTP kiekyje.

RT-PCR atlikta su įvairių audinių RNR, ir buvo padaryta išvada, kad 2G7 ekspresuojamas išimtinai tik baltuosiuose riebaluose (fig. 11A). Po to ³²P-žymėtas 2G7 buvo hibridizuotas su audinio RNR northern blotu (fig. 11B), ir pasirodė, kad riebaliniame audinyje ekspresuojami dideli kiekiai jo RNR, o kituose audiniuose arba visai neekspresuojama arba ekspresuojami labai maži kiekiai (tie signalai gali būti dėl audinio preparatų užteršimo riebalais). Atlikta 10 μg bendrosios RNR iš kiekvieno išvardinto audinio elektroforezė agarozės gelyje su formaldehidu. Mėginys hibridizuotas su blotu 65°C temperatūroje standartiniame hibridizacijos buferyje, Rapid Hybe

(Amsterdam). RNR dydis buvo apie 4,9 kB. Buvo nuspręsta, kad 2G7 yra gyvybingas OB geno kandidatas, ir jis buvo analizuotas toliau.

D. Mutacijos nustatymas

Norint patvirtinti, kad 2G7 koduoja OB geną, reikia parodyti šio geno DNR sekos RNR ekspresijos lygių skirtumus mutante, lyginant su laukinio tipo gyvuliukais. Yra galimybė atlikti tokius tyrimus su dviem atskiromis *ob* geno mutacijomis - C57BL/6J *ob/ob* (1J) ir Cck/Smj *ob/ob* (2J). Šios mutacijos toliau bus pažymėtos atitinkamai 1J ir 2J. (Tirtų pelių linijoms pažymėti naudojama neformali nomenklatura. Šiame aprašyme ir brėžiniuose priimama, kad C57BL/6J reiškia C57BL/6J +/+; CKC/smj reiškia SM/Ckc-+^{Dac}-+/+; CKC/smj *ob/ob* reiškia SM/Ckc-+^{Dac}-*ob*^{2J}/*ob*^{2J}). RNR pagaminta iš riebalinio audinio, kuris buvo paimtas iš 1J, 2J ir kontrolinių gyvuliukų. Kiekvieno pavyzdžio bendra RNR apdorota DNaze, po to atvirkščiai transkribuota, naudojant oligo-dT kaip pradmenį ir atvirkštinę transkriptazę. Tada gauta viengrandininė kDNR PCR-amplifikuota arba su 2G7 pradmenimis (sąlygos nurodytos aukščiau), gaunant apatinę juostelę, arba su prekyboje esančiais aktino pradmenimis, gaunant viršutinę juostą. Atlikta RT-PCR produktų elektroforezė 1% agarozės TBE gelyje, kuris buvo dažomas etidžio bromidu (fig. 12A). Naudojant RT-PCR buvo rasta, kad 2G7 mRNR ekspresuojama 1J ir visose kitose kontrolinėse pelėse, jos visai nėra 2J pelėse. Po 30 amplifikacijos ciklų jokio signalo nepastebėta. Šis eksperimentas tiesiogiai parodo, kad 2G7 atitinka egzoną iš OB geno.

Kadangi 2J mutacija yra palyginus nauja mutacija ir yra laikoma kaip koizogeninė linija, šis rezultatas yra pirmas turimas rezultatas, kuris rodo, kad 2G7 yra egzonas iš OB geno. Panašu, kad ši mutacija yra promotoriaus srityje, kuri visiškai sustabdo mRNR sintezę. Tai, kad šiame RT-PCR eksperimente 1J pelėse yra stebimas signalas, rodo, kad 1J gali būti taškinė mutacija, kuri neduoda didelio RNR pavyzdžio dydžio pokyčio. Be to, 2G7 mRNR nebuvo ir dar keturiuose 2J gyvuliukuose, tiriant RT-PCR metodu.

Šį rezultatą patvirtina northerno blotingas (fig. 12B). Iš kiekvienos linijos (C57BL/6J, 1J, CKC/smj ir 2J) paruošta riebalinių ląstelių RNR. 10 µg šių RNR blotuota. Blotas tirtas su 2G7 zonu, kuris buvo PCR-pažymėtas, amplifikuojant šią medžiagą, t.y. juosta fig. 11, naudojant ³²P-dCTP PCR reakcijoje. Įdėtas RNR kiekis kontroliuojamas

aktinu. Aktino signalas yra beveik vienodas visuose mėginiuose. OB signalo nėra smegenyse, kadangi ši mRNR yra būdinga riebalinėms ląstelėms.

Northerno analizės rezultatai patvirtino, kad 2J pelėse nėra 2G7 specifinės RNR. *ob* RNR nėra CKC/smj *ob/ob* pelėse, kadangi šioje nutukusio mutanto linijoje genas yra suardytas taip, kad nepasidaro RNR. Be to, 2G7 RNR kiekis 1J bei *db/db* riebaluose yra padidintas ~10-20 kartų. Šie rezultatai patvirtina hipotezę, kad OB arba koduoja cirkuliuojantį hormoną, arba yra atsakingas už signalo riebalinėse ląstelėse, kuris moduliuoja kūno svorį, generavimą. Šie rezultatai patvirtina išvadą, kad 2G7 yra OB genas, ir leidžia manyti, kad 1J pelėse yra taškinė mutacija, tikriausiai neprasminė mutacija, sukelianti priešsubrendusios transliacijos užbaigimą.

Northerno analizė pakartota, naudojant riebalinės ląstelės RNR preparatus iš 4 skirtingų 2J gyvuliukų (fig. 13). Šiame bandyme *ap2* yra specifinis riebalams transkriptas, kuris buvo panaudotas kaip kontrolė, taip pat kaip ir aktinas fig. 12B. *ap2* juostos intensyvumų skirtumų nepastebėta. *ap2* buvo pažymėti, konstruojant PCR pradmenis iš publikuotos *ap2* sekos. Riebalinių ląstelių RNR RT-PCR produktai buvo pakartotinai pažymėti, naudojant tą pačią PCR žymėjimo metodiką. Ši analizė rodo, kad OB RNR yra normaliuose homozigotiniuose ir heterozigotiniuose gyvuliukuose ir jos nėra 2J mutantiniuose gyvuliukuose.

Mutacija nustatyta 1J pelėse. Mutacija yra C bazės pakeitimas T baze, kuri duoda arginino pakeitimą į aiškų priešsubrendusį stop-kodoną prie 108 aminorūgšties ir tikriausiai yra 1J mutacijos priežastis (fig. 14), nežiūrint į didelius *ob* mRNR ekspresijos kiekius (žr. fig. 12 ir 13, C57BL/6J *ob/ob* takeliai).

Vėliau, norint padaryti išvadą, kad 2J mutacija yra aptikto DNR pokyčio OB 5' gale, kuris atrodo pilnai panaikina RNR ekspresiją, rezultatas, buvo panaudotas southern blotingas. Tikslią šio persigrupavimo prigimtį dar reikia nustatyti.

Norint nustatyti, ar mutantinis OB duoda unikalų fragmento vaizdą, buvo atliktas DNR iš CKC/smj (SM/Ckc-+^{Dac}) ir C57BL/6J pelių genominis southern blotingas, panaudojant keturias skirtingas restrikcijos endonukleazes (fig. 15A). Apie 10 µg DNR (išvestos iš genominės DNR, gautos iš kepenų, inkstų arba blužnies) suskaldyta su minėtu restrikcijos fermentu. Tada atlikta DNR elektroforezė 1% agarozės TBE gelyje. DNR perkelta į imobilono membraną ir hibridizuota su PCR-žymėtu 2G7 zondų. Raktinė juosra

yra intensyviausia juosta, gauta panaudojant CKC/smj *ob/ob* (SM/Ckc-+^{Dac} *ob^{2J}/ob^{2J}*) DNR skaldymą *Bgl*III. Ši juosta atitinka didesnio molekulinio svorio, nei kitose linijose, juostą ir rodo, kad šioje linijoje yra mutacija.

Fig. 15B yra genominės DNR iš *ob^{2J}/+ × ob^{2J}/+* kroso palikuonių skaldymo *Bgl*III southerno blotingas. Kai kurios DNR turi tiktai viršutinę juostą, kai kurios tik apatinę juostą, o kai kurios turi abi juostas. Gyvuliukai, kurie turi tik viršutinę juostą, taip pat yra allo-nutukę, t.y. *ob^{2J}/ob^{2J}*. Šie duomenys rodo, kad polimorfizmas (t.y. mutacija), parodytas fig. 15A, išsiskiria genetinė prasme.

1 PAVYZDYS: kDNR klonavimas ir OB sekos nustatymas

Naudojant žymėtą 2G7 PCR zondą, išskirta 15 pelės kDNR klonų iš pelės riebalinės ląstelės λ gt11 kDNR bibliotekos (Clontech 5'-STRETCH kDNR iš Swiss pelės, #ML3005b sėklidės riebalinio audinio) ir 30 krosų, hibridizuojančių žmogaus kDNR klonus iš žmogaus riebalinės ląstelės λ gt10 kDNR bibliotekos (Clontech 5'-STRETCH kDNR iš pilvo #HL1108a). Atliktas bibliotekos skryningas naudojant dėmės lifto metodiką. Filtrai iš dėmės lifto denatūruojami, naudojant autoklavos metodą. Po du filtrus hibridizuojama su PCR-žymėtu 2G7 zonu (Rapid Hybe buferis, 65°C, per naktį). Po 24 h prehibridizacijos, filtrai plaunami 2× SSC, 2% SDS du kartus po 30 min. 65°C temperatūroje ir eksponuojami į Rentgeno spindulių juostą. Išgryninta po du pozityvus. Išgrynintas fagas PCR-amplifikuojamas, naudojant prekyboje esančius vektorių pradmenis, pvz., λ gt10 ir λ gt11. Gauti PCR produktai atitiko kDNR tarpą kiekvienam fagai su nedideliu kiekiu vektoriaus sekos abiejuose galuose. Juostos grynintos, leidžiant per gelį, ir sekvenuotos, naudojant ABI automatinį sekvenatorių, ir vektorių pradmenis DNR polimerazei nustatyti.

Neapdoroti sekvenavimo duomenys tirti rankiniu būdu, norint ištaisyti kompiuterio išduodamus duomenų netikslumus. Gavus teisingą seką, sintezuoti žemyn einantys pradmenys ir panaudoti tolimesniam sekvenavimui. Tokie eksperimentai kartojami tol, kol nustatomos kiekvieno gaunamo kDNR klonų sekos, ir sudedama į sąrašą. Iki šiol surinkta ~3000 bazių porų iš mRNR 5' galo. Vienas kDNR klonų tęsėsi iki mRNR 5'

galo, nes jo seka buvo identiška riebalinio audinio RNR 5' RACE produkto sekai (duomenys neparodyti).

Sekų duomenys parodė, kad yra 167 aminorūgščių atviras skaitymo rėmelis (fig. 1). Kozako translacijos iniciacijos konsensuso seka buvo su adenožino liekanomis trimis bazėmis aukštyje einančia kryptimi nuo ATG. Buvo rastos dvi kDNR klasės, kurios skiriasi vien tik glutamino kodono įterpimu, arba jo pašalinimu. Ši liekana rasta 3' padėtyje prie pat 2G7 egzono sujungimo akceptorius. Gadangi glutamino CAG kodonas apima galimą AG sujungimo akceptorius seką, galima manyti, kad prie sujungimo akceptorius vietos yra pasislinkimas su aiškia 3 bazių porų delecija kDNR pogrupėje, kaip parodyta žemiau.

	Gln	Ser	Val		
ag	CAG	TCG	GTA	(su glutaminu)	(SEQ ID NO:17)
	↑				
(sujungimo akceptorius vieta)					

		Ser	Val		
ag	CAG	TCG	GTA	(be glutamino)	
		↑			
(sujungimo akceptorius vieta)					

“ag” aukščiau duotose sekose reiškia galimą introno seką, einančia aukštyje nuo glutamino kodono, o AG yra galima kita susijungimo vieta. Ši glutamino liekana yra labai konservatyvioje molekulės srityje ir jos reikšmė biologiniam aktyvumui dar nežinoma.

Nustatyta galima N-galinė signalinė seka, kurios signalinė skaldymo vieta, kaip galima manyti, yra karboksi-galinė adenino liekana prie 21 padėties aminorūgštis. Ši galima signalinė seka buvo patvirtinta, panaudojant kompiuterinį algoritmą von Heijne metodu. Panaudojant šią metodiką, buvo identifikuota labiausiai tikėtina signalinė seka polipeptido kodavimo srityje, atitinkančioje 1-23 aminorūgštis, kuri yra:

MCWRPLCRFLWLWSYLSYVQA ↑ VP (SEQ ID NO:10)

kurioje rodyklė rodo galimą signalinės sekos skaldymo vietą. Likusi aminorūgščių seka buvo labai hidrofiliinė ir neturėjo pastebimų struktūrinių motyvų arba membraną apimančių dalių, kitokių nei N-galinė signalinė seka. Konkrečiau, mes neradome konsensuso sekų N-rišančiam glikozilinimui arba dibazinių aminorūgščių sekų, būdingų

baltymo skaldymui numatytame gaunamame baltyme [Sabatini *et al.*, *The metabolic basis of inherited disease*, pp. 177-223, C.V. Scriver *et al.* eds., McGraw-Hill, New York]. Paieška duomenų bazėse, panaudojant Blast ir Block programas, nedavė jokios homologinės sekos.

Atliktas žmogaus riebalinio audinio RNR northerno blotingas, ir nustatytos panašios į pelės *ob* geną RNR formos. kDNR klonų sekvenavimas ir analizė parodė, kad žmogaus OB taip pat koduoja 167 aminorūgščių polipeptidą (fig. 2A ir B, ir fig. 3). Ir žmonių atveju buvo rastos dvi kDNR klasės, turinčios ir neturinčios trijų bazių porų delecijas (fig. 6). Numatytoje klonavimo srityje pelės ir žmogaus OB genai buvo labai homologiški, bet prieinamose 3' ir 5' netransliuojamose srityse buvo tik 30% homologijos. Žmogaus OB polipeptide taip pat buvo N-galinė signalinė seka. Žmogaus ir pelės OB polipeptidų sekų palyginimas parodė, kad abi molekulės aminorūgščių sudėties atžvilgiu yra 83% identiškos (fig. 4). Abiejų rūšių subrendusių baltymų N-galai buvo dar labiau homologiški, ir turėjo tik 6 konservatyvius ir 3 nekonservatyvius aminorūgščių pakitimus tarp 100 N-galinių aminorūgščių liekanų.

Genominė DNR išskirta iš pelės, žiurkės, triušio, katės, karvės, avies, kiaulės, žmogaus, vištos, ungurio ir drozofilos, ir restriktuota *EcoR1*. Atlikta suskaldytų mėginių elektroforezė 1% agarozės TBE gelyje. Tada DNR perkeltos į imobilono membraną ir zonduotos PCR-žymėtu 2G7 zonu. Filtras hibridizuotas 65°C temperatūroje, plautas du kartus 2× SSC, 0.2% SDS 65°C temperatūroje; kiekvienas plovimas truko 20 minučių; du kartus buvo keistas buferis. Šie duomenys parodė, kad OB yra stuburiniuose gyvūnuose (fig. 16). Atkreipkite dėmesį, kad yra 2+ signalas ungurio DNR; unguris yra žuvis.

Reziumuojant gautus duomenis matyti, kad kūno svoris ir nutukimas yra fiziologiškai kontroliuojamas. Prieš 7 metus buvo mėginta identifikuoti du svarbiausios šios sistemos komponentus: *oB* ir *DB* genus. Kaip rodo šis pavyzdys, dabar yra identifikuotas OB genas, kaip riebalams specifinis genas, kuris vaidina pagrindinį vaidmenį kūno svorio reguliavime. Šio geno produktas, kuris tikriausiai yra išskiriamas hormonas, turės svarbią reikšmę diagnozuojant ir gydant žmonių ir kitų gyvūnų mitybinius sutrikimus.

2 PAVYZDYS: OB ekspresija bakterijose

Pelės ir žmogaus kDNR, koduojančios *ob*, buvo klonuotos į PET-15b ekspresijos vektorių (Novagen). Šis vektorius turi T7 promotorių, sujungtą su lac operatoriumi, ir ekspresuoja sulietą baltymą, turintį histidino tag (His-tag) ir trombino skaldomą vietą, esančią aukštyje einančia kryptimi prie pat koduojančios sekos įterpimo vietos (fig. 17) (SEQ ID NOS:11 ir 12).

Pelės ir žmogaus kDNR buvo modifikuotos taip, kad alaninas signalinės sekos gale buvo nukreiptas į *NdeI* vietą, o 3' srityje buvo atskira seka. *NdeI* įterpimas atliktas, naudojant PCR su naujais pradmenimis:

Mnde-5' (pelės penki prim pradmuo):

CTTATGTTCA TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC (SEQ ID NO:13)

Mnde-3' (pelės trys prim pradmuo):

TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC (SEQ ID NO:14)

Mnde-5' (žmogaus penki prim pradmuo):

TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC (SEQ ID NO:15)

Mnde-3' (žmogaus trys prim pradmuo):

TTCCTTCCCA TATGGTACTC CTTGCAGGAA GA (SEQ ID NO:16)

Pradmenys viduryje turi 6 bazių porų neatitikimą, kuris įveda *NdeI* restrikcijos vietas kiekviename PCR fragmento gale. Fagai, turintys arba pelės, arba žmogaus kDNR, buvo PCR-amplifikuoti, naudojant tokius pradmenis. PCR produktai skaldyti *NdeI* ir valyti elektroforezės 1% žemos lydymosi temperatūros agarozės gelyje būdu. Gautos išvalytos juostelės subklonuotos į pET vektorių. Susidariusios plazmidės sekvenuotos, norint įsitikinti, ar klonavimo PCR amplifikacijos stadijoje neatsirado mutacijų. Buvo pagaminti pelės ir žmogaus kDNR dariniai, kurie koduoja, ir kurie neturi glutamino 49. Konkrečiau, panaudojant PCR klonavimo metodą, padaryti pET 15b dariniai, turintys arba žmogaus, arba pelės OB koduojančią seką minus signalinę seką, ir sujungti su His-tag. Šie dariniai buvo sekvenuoti, norint įsitikinti, ar PCR amplifikacijoje nebuvo įvesta klaidų į OB geno koduojančią sritį.

Bakterinio ekspresijos šeimininko transformavimui atrinkti du gauti plazmidžių dariniai - pETM9 ir pETH14. Indukuojant 1 mM IPTG optimaliomis sąlygomis, transformuotos bakterijos galėjo produkuoti 100-300 µg/ml sulieto OB. Didžioji dalis OB

sulieto baltymo buvo rasta inkliūzijos kūnelyje. Atlikus soliubilizaciją 6 M guanidino-HCl arba šlapalu, sulietas baltymas buvo valytas, leidžiant per His-surišimo (Ni-chelatų sudarymo) dervos kolonėlę. OB sulieto baltymo valymo, leidžiant per kolonėlę, sąlygos (įskaitant surišimą, plovimą ir eliaciją) nustatytos eksperimentiškai. OB sulietas baltymas nesiriša su derva, esant 5 mM imidazolo/ 6 M guanidino-HCl, ir išlieka surištas, esant iki 20 mM imidazolo/ 6 M guanidino-HCl. Baltymas gali būti eliuuojamas iš drevos, esant 60 mM imidazolo/ 6 M guanidino (fig. 18A, B). Po to, žmogaus ir pelės sulieti baltymai buvo dializuoti PBS, norint iš preparato pašalinti guanidino-HCl, ir naudoti polikloniniams antikūnams gauti.

Norint nustatyti sulieto baltymo produktų biologinį aktyvumą, buvo išbandytos ir išstobulintos išvalyto baltymo perlankstymo sąlygos. Šios sąlygos apima pradinę sulieto baltymo dializę 1 M guanidino tirpale, po to praskiedžiama 0,4 M arginino tirpalu. Prieš biologinių funkcijų tyrimą iš sulieto baltymo pašalinama His-tag. Tag pašalinimas pasiekiamas, veikiant sulietą baltymą trombinu iš žmogaus placentos.

Be to, žmogaus ir pelės OB geno koduojančios sekos minus signalinė seka buvo įterptos į pET 12c vektorių, naudojant PCR klonavimo metodą. Šie dariniai gali nukreipti sintezuotus OB sulietus baltymus į bakterinio šeimininko ląstelės periplazminę ertmę. Iš periplazminės ertmės išgautą OB sulietą baltymą reikia tik paprasčiausiai nufiltruoti per gelį, kad jis būtų išvalytas nuo kitų šeimininko baltymų, ir šiame procese jis nebus denatūruojamas.

4 PAVYZDYS: Antikūnų prieš OB polipeptidą gavimas

Apart rekombinantinio baltymo panaudojimo polikloniniams antikūnams gauti, buvo identidikuotos keturios peptidų sekos iš išvestos pelės OB sekos, naudojant imunogeniškumo diagramos kompiuterinę programą (GCG Package). Keturi karboksialiniai peptido fragmentai yra:

(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-Leu-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

Šie peptidai buvo konjuguoti su KLH, ir peptido-KLH konjugatai buvo panaudoti triušių imunizavimui, naudojant standartines metodikas. Iš triušių išskirti polikloniniai antiserumai, specifiški kiekvienam peptidui.

4 PAVYZDYS: OB polipeptido translokacija *in vitro*

Funkcinės signalinės sekos buvimo patvirtinimui, žmogaus kDNR, į kurią įeina visas atviras skaitymo rėmelis, buvo subklonuota į pGEM vektorių. Šiame eksperimente naudota tik žmogaus kDNR, kadangi tinkami pelės subklonai nebuvo išskirti. Buvo transkribuota teigiamos grandinės žmogaus *ob* RNR, naudojant Sp6 polimerazę, ir panaudota *in vitro* reakcijoje, esant ir nesant šuns kasos mikrosominių membranų. Migravo pirminis transliacijos produktas, kurio molekulinis svoris buvo ~18 kD, kuris sutampa su molekulinio svoriu, numatytu iš kDNR sekos. Mikrosominių membranų įvedimas į reakciją bendrą transliacijos efektyvumą inhibavo ~5 kartus. Tačiau esant membranos preparatui nuo apie 50-70% OB pirminio transliacijos produkto buvo atskelta apie 2 kD, kas rodo, kad signalinė seka yra funkcionali (fig. 19A). Pirminio transliacijos produkto interleukino-1- α RNR, kuri nekoduoja signalinės sekos, dydis buvo nepakitęs, kai į reakciją buvo įvestos mikrosominės membranos. Norint patvirtinti, kad įvyko OB baltymo translokacija, *in vitro* transliacijos produktai buvo veikiami proteinaze-K. Apdorojus proteaze įvyko pilna 18 kD pirminės transliacijos produkto proteolizė, tuo tarpu 16 kD apdorota forma nepakito veikiant fermentu, ir tai rodo, kad ji translokavosi į mikrosomų vidų (fig. 19B). Šie duomenys patvirtina hipotezę, kad OB yra išskiriama molekulė.

Suskaldžius signalinę seką, numatytame baltyme turėtų likti dvi cisteino liekanos; tokiu būdu yra tikimybė, kad molekulė turi disulfidinę jungtį, charakteringą kitiems išskiriamiesiems polipeptidams [Shen *et al.*, *Science*, 224:168-171 (1984)].

5 PAVYZDYS: OB geno apibūdinimas

Norint nustatyti ryšį tarp nutukimo ir genetinių pokyčių žmonių OB gene, buvo nustatyta žmogaus OB geno seka (fig. 20A-E) (SEQ ID NOS: 22 ir 24). Žmogaus P1 bibliotekos skryningui panaudoti specifiniai pradmenys iš žmogaus koduojančios sekos. Buvo gauti trys skirtingi P1 klonai, išauginti ir PCR-amplifikuoti, naudojant pradmenis, flankuojančius sujungimo vietą tarp pirmojo ir antrojo koduojančių egzonų. Buvo amplifikuota ir dalinai sekvenuota apie 2 kb ištisinė introno sritis (žr. fig. 20A, kaip parodyta SEQ ID NO:22 ir 24).

Pelės ir žmogaus geno struktūra apibūdinta, naudojant PCR bandymus ir kitas standartines metodikas. Buvo rasta, kad pelės OB genas susideda iš trijų egzonų, iš kurių antrasis ir trečiasis susiję su koduojančia seka (fig. 20D). Žmogaus OB genas turi tą pačią struktūrą, tačiau žmogaus gene nėra 5' egzono ir introno (fig. 20E).

Buvo pagamintos dvi serijos pradmenų, gautų iš žmogaus geno introninių sekų (fig. 20A-C). Šių pradmenų sekos yra (F ir R reiškia atitinkamai tiesioginę ir atvirkštinę sekas):

HOB 1gF	5'-CCCAAGAAGCCCATCCTG-3'	(SEQ ID NO:29)
HOB 1gR	5'-GACTATCTGGGTCCAGTGCC-3'	(SEQ ID NO:30)
HOB 2gF	5'-CCACATGCTGAGCACTTGTT-3'	(SEQ ID NO:31)
HOB 2gR	5'-CTTCAATCCTGGAGATACCTGG-3'	(SEQ ID NO:32)

Buvo gauti DNR pavyzdžiai iš įvairių šaltinių, ir šie pradmenų rinkiniai panaudoti žmogaus genomines DNR iš labai nutukusių žmonių amplifikacijai. Atlikta PCR produktų elektroforezė žemos lydymosi temperatūros agarozės gelyje, juostelės išpjautos ir skaldytos agaraze. Sekos nustatytos panaudojant ABI 373A DNR sekvenatorių ir Taq didezoksiterminatoriaus rinkinį (ABI, Perkin-Elmer). Dabar nustatyta vieno taško mutacija *ob* gene iš paciento pavyzdžio. Ši mutacija yra pirmajame egzone ir nekeičia aminorūgščių sekos. Preliminarūs duomenys rodo, kad kito paciento pirmajame egzone gali būti įterpimo seka.

Gali būti panaudotas kitoks automatizuotas sekvenavimo metodas, vietoje Taq DNR polimerazės vartojant sekvenazę, kuri duoda lengviau skaitomas sekas mutacijos nustatymui.

6 PAVYZDYS: OB ekspresija mielėse

Atlikus pozicinį OB klonavimą, svarbu nustatyti fiziologinį mechanizmą, kaip OB baltymas mažina maisto suvartojimą ir kūno svorį. Pirmasis žingsnis šia kryptimi buvo rekombinantinis funkcinio baltymo gavimas, panaudojant ekspresijos sistemą. Šalia sėkmingos bakterinės ekspresijos sistemos, taip pat pasirinkta ir mielių ekspresijos sistema. Ekspresija mielėse turi keletą OB ekspresijai tinkamų privalumų. Svarbiausias iš jų yra tas, kad gali būti gaunami biologiškai aktyvūs eukariotiniai baltymai. OB polipeptidą išskiria žinduolių ląstelės. Baltymo išskyrimas yra labai panašus visiems eukariotams, kas reiškia, kad mielių sekrecinis mechanizmas į panašesnis į žinduolių sekrecinį mechanizmą, negu turėtų būti bakterinis mechanizmas. Konkrečiau, OB baltymo, esančio žinduolių ląstelėse, modifikacijos taip pat turėtų būti matomos mielių ekspresijos sistemos ekspresijoje. Be to, pereinant per sekrecinį mechanizmą, įvyksta baltymo susilankstymas ir todėl gaminantis ob pagal mielių sekrecijos mechanizmą, turėtų gautis reikiamai sulankstytas baltymas, turintis natyvų biologinį aktyvumą. Tai yra svarbu OB atveju, kadangi dvi cisteino liekanos gali sudaryti disulfidinį tiltelį. Priešingai sekreciniams keliams, ląstelės citoplazmos redukuojanti aplinka neleidžia susidaryti disulfidiniams tilteliams; ir todėl svarbu, kad OB pereitų tokį sekrecinį kelią, kad *in vivo* susidarytų disulfidinė jungtis. Kiti privalumai yra darbo su mielėmis lengvumas ir greitumas, vektorių ir kamienų prieinamumas ir didelė patirtis mielių rekombinacinėje technologijoje.

Pichia pastoris ekspresijos sistema buvo pasirinkta dėl keturių priežasčių: (1) didesnis heterologinio baltymo ekspresijos lygis, palyginus su kitomis mielių sistemomis, tokiomis kaip *S.cerevisiae*; (2) baltymo glikozilinimas yra panašesnis į žinduolių sistemą *P.pastoris* sistemoje, negu *S.cerevisiae* (nors, naudojant kompiuterinę paiešką, ir nebuvo rastos ob glikozilinimo vietos, vis tik lieka glikozilinimo galimybė neatpažintose vietose); (3) *P.pastoris* natyviai išskiria labai daug baltymų, ir todėl yra paprasta išskirti ekspresuotą

svetimą baltymą; ir (4) vektoriai ir kamienai yra prekyboje (Invitrogen). Dvi mielių ekspresijos vektorių gavimo strategijos parodytos fig. 21 ir 22.

Buvo pasirinktas vektorius pPIC.9. Šis vektorius turi klonavimo vietą tuojau pat po α -perdengimo faktoriaus prepro koduojančios sekos žemyn einančia kryptimi, kuris nukreipia baltymą, koduojamą geno, klonuoto į klonavimo vietą, kuris turi būti sekretuojamas šiuo skrecijos keliu. Kita svarbi šio vektoriaus ypatybė yra HIS4 genas, kuris leidžia parinkti vektoriaus sugėrimą, naudojant mielių auksotropinį kamieną, auginamą mažą histidino kiekį turinčiose terpėse, o po to transformuoti mieles šiuo vektoriumi. Klonavimo strategija buvo tokia: PCR amplifikacija OB kDNR, naudojant 5' pradmenį, kuris 3' gale turi seką, komplementarią OB sekai tuoj pat po numatytos lyderinio peptido skaldymo vietos, ir jo 5' gale- seką, komplementarią vektoriaus α -perdengimo faktoriaus sekos 3' galui. 5' pradmuo taip pat turi *XhoI* vietą. 3' pradmuo buvo sukonstruotas taip, kad jis 3' gale turi seką, komplementarią kelioms paskutinėms aminorūgštims, ir *EcoR1* vietą jo 5' gale. Po PCR amplifikacijos, PCR produktas skaldytas *XhoI* ir *EcoR1* ir klonuotas į panašiai suskaldytą pPIC.9. Po pelės ir žmogaus OB kDNR klonavimo, išskirtas kiekvienas (turintis ir neturintis glutamino prie 49 kodono) individualus klonas visiems keturiems dariniams ir sekvenuotas, norint patikrinti ar dariniai buvo klonuoti tinkamoje orientacijoje ir rėmelyje ir ar jie neturi mutacijų, atsiransančių PCR amplifikacijos stadijoje. Nustačius klonus, turinčius teisingą seką, jie buvo transformuoti į *P.pastoris* kamieną GS115 - histidino auksotrofą.

Dviems pelės OB dariniams buvo atrinkti transformuoti mielių klonai baltymo ekspresijai. Norint įsitikinti, kad transformuotos mielės turi OB, atliktas DNR taškinio blotingo ir kolonijos hibridizacijos bandymai, kurie parodė, kad OB seka yra transformuotose mielėse, bet jos nėra netransformuotose mielėse. Be to, dabar transformuotos mielės išskyrė 16 kDa baltymą į kultūrinę terpę, o netransformuotos mielės neišskyrė tokio dydžio baltymo (fig. 23A). Tai yra numatytas OB dydis. Abiem pelės dariniams identifikuoti atskiri klonai, kurie labai gerai ekspresuoja OB, ir buvo ištobulinta valymo metodika *ob* išgryninimui iki homogeninio. Viena metodika buvo OB valymas, panaudojant katijonų mainų kolonėlę (fig. 23B); preliminarūs duomenys rodo, kad galima naudoti stiprų katijonitą. Tačiau katijoninėje mainų chromatografijoje buvo prarastas laukiamas *ob* produktas. Tai rodo, kad mėginyje buvo proteazės.

Vienas šios problemos sprendimo būdas yra pagaminti *ob*-His-tag suliejimo darinį ekspresijai mielėse (fig. 22). Tolimesni bandymai parodė, kad OB be His-tag labai smarkiai asocijuojasi su Ni-chelatų sudarymo kolonėle. OB polipeptido valymas, panaudojant Ni-chelatų sudarymą, ir po to atlikta gel-filtracija davė pakankamo grynumo produktą analizei masių spektroskopijos metodu. Masių spektroskopija patvirtino, kad ekspresuoto baltymo molekulinis svoris yra identiškas laukiamam molekuliniam svoriui, kas labai aiškiai parodo, kad OB yra sėkmingai ekspresuojamas *Pichia*.

Tačiau Ni-chelatų sudarymo/gel-filtracijos valymo metodika neduoda pakankamai švaraus OB polipeptido. Jame yra kitų mažų molekulių. Pasirodo, kad proteolitinis aktyvumas išsiplauna iš Ni-chelatų kolonėlės į balastinį tūrį. Išeinant iš to, suplanuotas trijų stadijų valymo budas: Ni-chelatų sudarymas, po to einantys jonų mainai (kurie pašalina mažas užteršiančias molekules), o po to eina gel-filtracija.

Ekspresijos lygio įvertinimas, nudažant SDS-PAGE gelius Coomassie mėliu, rodo, kad yra apie 10 $\mu\text{g/l}$, kai mielės auginamos purtomose kolbose. Galima laukti, kad šie lygiai padidės fermentacijos induose, ir mes pradėjome inicijuoti fermentaciją, tikėdamiesi gauti didesnius baltymo kiekius. Imant žmogaus OB darinius, buvo identifikuoti transformuoti mielių klonai, turintys didelį kopijų skaičių, ir tikimasi, kad jie ekspresuos OB baltymą. Kai bus gauti antikūnai, jie bus panaudoti išskirto 16 kDa baltymo identifikavimui patvirtinti.

7 PAVYZDYS: OB sulieto peptido aukšto lygio ekspresija bakterijose

Užšaldytų įkrovų paruošimas:

Į kiekvieną iš dviejų 4 ml tūrio sterilizuotos M9ZB terpės, neturinčios anglies, mėginį pridedama 40 μl dekstrozės (0,4 g/ml, steriliai nufiltruotas), 10 μl ampicilino (200 mg/ml) ir 5 μl chloramfenikolio (34 mg/ml, etanolyje). Šiems mėginiams inokuliuoti panaudota vienintelė kolonija kiekvieno iš *E.coli* su klonuota pelės ir žmogaus OB1 DNR Novagen pET-14b vektoriuje. Mėgintuvėliai inkubuojami 37°C temperatūroje per naktį.

0,5 ml per naktį išlaikytos kultūros panaudota 50 ml M9ZB terpės su dekstroze, ampicilinu ir chloramfenikoliu inokuliuoti. Mišiniai inkubuoti 30°C temperatūroje ir periodiškai matuojamas optinis tankis, esant 600 nm bangos ilgiui (A_{600}). Kai A_{600} yra apie

1-1,2, 175 μ l kultūros sumaišoma su 25 μ l 60% glicerolio 2 ml talpos ependorfo mėgintuvėliuose, greitai užšaldoma skystame azote ir laikoma -80°C temperatūroje.

Kultūros auginimas:

50 ml M9ZB terpės su 0,5 ml 40% dekstrozės, 125 μ l ampicilino ir 50 μ l chloramfenikolio įkrovų inokuliuota 1 ml užšaldytos įkrovos ir inkubuota 30°C temperatūroje. Kai A_{600} buvo 1-1,2, 10 ml šios kultūros panaudota kiekvienai iš keturių 2 l terpės kolbų su 500 ml M9ZB terpės, kurioje yra dekstrozės, ampicilino ir chloramfenikolio, inokuliuoti. Tirpalai inkubuoti 30°C temperatūroje, kol A_{600} pasidarė lygus apie 1-1,2, esant galutinei 0,5 mM IPTG koncentracijai. Kultūros inkubuotos per naktį. Ląstelės surinktos, centrifuguojant 20 min, esant 4000 aps/min. Šioje ekspresijos sistemoje gautas rekombinantinis OB polipeptidas, esant gana dideliame bendro baltymo procentiniame kiekiui - gramų/litre *E.coli* eilės.

Ląstelių lizavimas ir inklūzinių kūnelių resuspendavimas:

Ląstelių masė resuspenduojama minimaliame 20 mM HEPES, pH 7,2, 10% glicerolio, 0,1 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 1% aprotinino, 1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptino ir 50 $\mu\text{g/ml}$ DN Razės I tūryje. Suspesija užšaldoma-atšildoma penkis kartus, naudojant skystą azotą ir drungną vandenį. Lizuotos ląstelės centrifuguojamos 30 min, esant 18000 aps/min, ir resuspenduojamos 20 mM HEPES, pH 7,5, 0,1 M NaCl. Suspensija paveikiama ultragarsu ir pridedama tritono X100, kad galutinė koncentracija būtų 2%. Ši suspensija centrifuguojama 15 min, esant 18000 aps/min. Po dar dviejų tokių ciklų, atliekami trys plovimo ciklai be tritono. Po to, centrifugavimo nuosėdos tirpinamos 6 M GdHCl (guanidino HCl), 20 mM HEPES, pH 7,5, panaudojant ultragarsą, o po to centrifuguojama. Nuopilas naudojamas tolimesniam valymui.

OB baltymas valomas nesulankstytoje būsenoje, panaudojant imobilizuotų metalų jonų afininę chromatografiją (IMAC). Tirpalas suleistas į 40 ml talpos Pharmacia chelatų sudarymo greito srauto sefarozės, užkrautos 5 kolonėlės tūriais 50 mM NiSO_4 , kolonėlę, kuri ekvilibruota 6 M GdHCl, 30 mM imidazolo, 20 mM HEPES, pH 7,5. Po to, baltymas eliuuotas tuo pačiu buferiu, turinčiu 0,2 M imidazolo. Nesulankstytas baltymas 6 M

GdHCl laikomas 4°C temperatūroje, pridėjus natrio acetato (NaAc) iki 10 mM ir acto rūgštimi nuregulavus pH apie 4,5.

Baltymo perlankstymas ir gryninimas:

6 M GdHCl tirpalas, turintis 100 mg baltymo, veikiamas 67 μ l 1 M ditionitritolio (DTT) ir praskiedžiamas iki maždaug 67 ml 6 M GdHCl, 10 mM NaAc, pH 4,5. Tirpalas maišomas kambario temperatūroje apie valandą. Tada, maišant, jis praskiedžiamas 4 l 20% glicerolio, 2,5 mM CaCl₂, 20 mM Tris, pH 8,4 buferiu. Gerai sumaišius, tirpalas toliau maišomas kambario temperatūroje apie 8 h. Po to pridedama 2000 vienetų išvalyto jaučio trombino (iš Thrombostat, Parke-Davis produktas), ir tirpalas silpnai maišomas toliau. Po 2,5 h į jį pridedama dar 2000 vienetų trombino ir Histidino-tag skaldymas tęsiamas dar 3 h. Skaldymas trombinu sustabdomas dedant PMSF, kol jo galutinė koncentracija yra 0,1 mM. Tirpalas nufiltruojamas ir laikomas 4°C temperatūroje.

Suskaldytas baltymas vėl valomas, panaudojant tą pačią, kaip nurodyta aukščiau, kolonėlę, ekvilibruotą 1 M KCl, 20% glicerolio, 20 mM HEPES, pH 8,4 buferiu. Supylus baltymo tirpalą, kolonėlę plaunama tuo pačiu buferiu, ir suskaldytas baltymas eliuuojamas 1 M KCl, 20% glicerolio, 40 mM imidazolo, 20 mM HEPES, pH 8,4 buferiu. Nesuskaldytas baltymas eliuuojamas, esant 0,2 M imidazolo.

Išvalytas suskaldytas baltymas koncentruojamas, veikiamas 50-100 mM EDTA, 10 mM kalio fericianidu (kad būtų pilnai suoksiduota) ir gel-iltruojamas per superdekso 75 16/60 kolonėlę. Naudojant šią metodiką, gaunamos 50% išeigos, skaičiuojant pagal pradinį peptidą.

Išgrynintas ekspresuotas baltymas buvo apibūdintas keliais metodais. Fizikinis apibūdinimas apima dinaminę šviesos sklaidą, norint nustatyti struktūros homogeniškumą, ir panaudotas kaip teisingo sulankstymo matas. Šviesos sklaidos duomenys rodo, kad žmogaus OB polipeptidas ekspresuojamas daugiausiai arba išimtinai kaip monomeras, tuo tarpu pelės OB polipeptidas gali būti randamas tiek kaip dimeras, tiek ir kaip monomeras.

Bandymai su Ellmano reagentu ir masių spektroskopijos analizė patvirtina, kad cisteino liekanos baltyme sudaro disulfidinį ryšį. Ši oksiduota polipeptido forma buvo duodama pelėms, kaip aprašyta *infra*, ir rodė biologinį aktyvumą.

Norint apytikriai nustatyti baltymo struktūrinę geometriją, buvo panaudotas cirkuliarinis dichroizmas. CD spektrai fiziologiniame buferyje (pH apie 8, maždaug fiziologinė joninė jėga) rodo, kad žmogaus OB polipeptidas turi maždaug apie 60% α -spiralės ir apie 40% mišrios spiralės struktūrą. Pagal CD spektroskopiją rasta, kad pelės OB polipeptidas turi apie 50% α -spiralės ir apie 50% mišrios spiralės struktūrą.

Norint nustatyti OB polipeptido dalis, kurios yra prieinamos proteolizei, buvo panaudota ribota proteolizė, o po jos - masių spektroskopija [Cohen *et al.*, 1995, *supra*]. Ši analizė parodė, kad 54-60 aminorūgščių liekanos sudaro lanksčią kilpą (pavaizduota fig. 4). Panašu, kad ši lanksti kilpa sujungia dvi nustatytos 2° struktūros vietas, pvz., α -spiralės.

Svarbu pažymėti, kaip parodyta tolimesniuose pavyzdžiuose, kad išvalyto baltymo bioaktyvumas buvo tiriamas, duodant šį baltymą tiek liesiems, tiek ir nutukusiems graužikams, panaudojant osmotinį siurblį (pvz., ALZET osmotinį siurblį iš Alza Corporation, Palo Alto, CA) arba kaip kasdieninę atskirą dozę i.p. bent dviejų savaitių laikotarpyje, ir buvo stebėti efektai į maisto suvartojimą ir kūno svorį.

8 PAVYZDYS: OB polipeptido (leptino) svorį mažinantys efektai

Pelės OB lokuso geno produktas vaidina svarbų vaidmenį kūno svorio reguliavime. Šiame pavyzdyje nustatyta, kad OB baltymas cirkuliuoja pelės, žiurkės, ir žmogaus plazmoje. Visuose trijuose organizmuose cirkuliuojanti forma turi tą patį molekulinį svorį (pagal SDS-PAGE), kaip išvesto polipeptido seka be signalinės sekos, kas duoda pagrindą manyti, kad *in vivo* baltymas nesigamina, jei atskeliama signalinė seka. OB baltymo nebuvo C57/B16J *ob/ob* pelių plazmoje, jo kiekis *db/db* pelių plazmoje dešimt kartų didesnis, o *fa/fa* žiurkių plazmoje - dvidešimt kartų didesnis, lyginant su kontrole. Tai leidžia manyti, kad šie nutukę gyvuliukų mutantai yra atsparūs OB poveikiui. Šešių liesų žmonių grupėje OB baltymo kiekiai plazmoje skyrėsi septynis kartus. Rekombinantinio pelės OB baltymo kasdieninės injekcijos dramatiškai mažino *ob/ob* pelių kūno masę, turėjo žymų poveikį laukinio tipo pelių kūno masei ir neveikė *db/db* pelių. Šie duomenys rodo, kad OB lokuso geno produktas tarnauja kaip endokrininė funkcija kūno svorio reguliavime.

Medžiagos ir metodai

Triušiai buvo imunizuoti rekombinantiniu baltymu Froindo stimulatoriuje (URP, Inc.). Imunoišgryninti anti-pelės antikūnai pagaminti, praleidžiant antiserumą per sefarožės 4B, konjuguotos su rekombinantiniu baltymu, kolonėlę, kaip aprašyta [Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)]. Pelės plazmos imunonuosodinimas buvo atliktas taip: 0,5 ml pelės, žiurkės ir žmogaus plazmos, turinčios apie 2,5 mM EDTA, nuskaidrinta nekonjuguota sefaroze 4B, purtant kambario temperatūroje 2 valandas. Sefarozė pašalinta centrifugavimo būdu, ir pridedama 50 ml konjuguotos su antikūnu sefarožės, turinčios afininio būdu išvalyto antikūno, kurio koncentracija yra 1mg/ml sutankintos sefarožės, 50% suspensijos. Pridedama pusė mililitro 2× RIPA buferio, kad galutinės susijungimo sąlygos būtų tokios: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% natrio dezoksicholato ir 0,025% natrio azido. Reakcija vykdoma, purtant per naktį 4°C temperatūroje. Konjuguota su antikūnu sefarozė plaunama 8 kartus, naudojant RIPA buferį, po to tris kartus skalaujama PBS ir daroma 15% SDS-PAGE elektroforezė. Baltymai uždedami ant nitroceliuliozės ir atliekamas vesterno blotingas su biotilintu imunoišgrynintu antikūnu prieš rekombinantinį baltymą. Naudotas antrinis antikūnas buvo HRP-streptavidinas, o detekcijai naudotas ECL.

Norint nustatyti OB kiekį pelės serume, į 100 λ C57BL/6J *ob/ob* plazmos pridedami vis didėjantys kiekiai (0,01, 0,1, 0,5, 2,0, 15 ng) perlankstyto rekombinantinio pelės OB baltymo ir inkubuojama 4°C temperatūroje su baltymo A, konjuguotu su sefaroze, antikūnu 3 valandas. Gerai išplovus A buferiu (10 mM natrio fosfato buferis, pH 7,4; 100 mM NaCl; 1% tritono K-100, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF), mėginiai resuspenduojami mėginio buferyje, perleidžiami per 15% SDS-PAGE ir perkeliama į nitroceliuliozės membraną. Vesterno blotingas atliekamas, naudojant imunoišgrynintą biotilintą anti-amino-galo antikūną, kaip pirminį antikūną, ir HRP-streptavidiną, kaip antrinį antikūną, o po to detektuojama ECL.

Citoplazminiai ekstraktai pagaminti, homogenizuojant adipozinį audinį NDS buferyje (10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM NaCl, 60 mM ICCI, 0,15 mM spermino, 0,5 mM spermidino, 14 mM β -merkaptioetanolio, 0,5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0,5% NP-40)

panaudojant politroninę ir ... homogenizaciją, o branduoliai pašalinami centrifuguojant (700 g).

Imunonusodinimas atliekamas taip kaip aprašyta aukščiau, išskyrus tai, kad naudojami imunoišvalyti anti-žmogaus OB antikūnai. ELISA bandymui, 100 ml 1 mg/ml imunoišgryninto anti-žmogaus OB antikūno ištirpinama borato buferyje PBS tirpale. ir laikoma per naktį ant mikrofilto (Corning cat. #2595) plokštelių 4°C temperatūroje. Tada plokštelės plaunamos 4 kartus borato-natrio chlorido tirpalu, turinčiu 0,05% Tween 20 ir pašalinamas skysčio perteklius. Plokštelės blokuojamos, inkubuojant kambario temperatūroje 2 valandas 240 ml/duobutei borato-natrio chlorido buferiu, turinčiu 0,3% želatinos, po to plaunama ir džiovinama. Atskirose duobutėse inkubuojama per naktį 4°C temperatūroje arba žinomi kiekiai žmogaus OB perlankstyto baltymo arba plazmos mėginių 100 ml tūryje. Perplovus, plokštelės inkubuojamos su 100 ml biotilinto imunoišgryninto anti-žmogaus antikūno (0,1 mg/ml želatinos-borato buferio tirpalas) 4 valandas kambario temperatūroje. Perplovus į plokšteles pridedama krienų peroksidazės (HRP)-streptavidino (0,1 mg/ml boratinio buferio, 0,3% želatinos). Detekcijai naudojamas HRP substrato tirpalas (ABTS, 0,3 mg/ml ir H₂O₂, 0,01% citrinos rūgštyje) ir antikūno susirišimo kiekiui nustatyti matuojamas optinis tankis esant 414 nm.

Pelės ir žmogaus OB geną koduojančios sekos buvo PCR-amplifikuotos iš plazmidžių, turinčių OB kDNR sekas, ir subklonuotos į pPIC.9 plazmidę (Invitrogen).

Naudotas žmogaus 5' pradmuo buvo:

5' GTATCTCTCGAGAAAAGAGTGCCCATCCAAAAAGTCCAAG 3'
(SEQ ID NO:34),

o 3' pradmuo buvo:

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

Pelės atveju, 5' pradmuo buvo:

5' GTATCTCTCGAGAAAAGAGTGCCTATCCAGAAAGTCCAGG 3'
(SEQ ID NO:36),

o 3' pradmuo buvo:

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

Tiek pelės, tiek ir žmogaus 5' pradmuo turi *Xho*I vietą 5' gale ir α -persidengimo faktoriaus signalinės sekos, esančios pPIC.9 vektoriuje, 4 paskutines aminorūgštis

koduojančias sekas. Šis vektorius nukreipia heterologiškai ekspresuotų genų sekreciją iš ląstelės į kultūrinę terpę. 5' PCR pradmenyje taip pat yra OB geno atviro skaitymo rėmelio pirmieji 19 nukleotidų po signalinės sekos skaldymo vietos prieš alaniną, esanti 21-je aminorūgšties padėtyje. 3' pradžioje turi *EcoR*I vietą 5' gale, po kurio tuoj pat eina sekos, komplementarios laukiamam OB stop-kodonui. PCR sąlygos buvo tokios: 1 min trukmės denatūravimas 94°C temperatūroje, 1 min trukmės renatūravimas 55°C temperatūroje ir 2,5 min trukmės išplėtimas 72°C temperatūroje. PCR-generuotų mutacijų skaičiui apriboti naudota nedidelio skaičiaus ciklų (15 ciklų) PCR ir nuskaitymo patikrinimo polimerazė PFU (Stratagene). PCR produktai skaldyti *Xho*I ir *EcoR*I ir klonuoti į panašiai suskaldytą vektorių pPIC.9. Sekvenuotos abi visų darinių grandinės, norint įsitikinti, ar nėra PCR-generuotų mutacijų. Klonai transformuoti į *Pichia pastoris* (His⁻) sferoplastų metodu ir atrinkti mažą histidino kiekį turinčioje terpėje. Panaudojant kolonijos hibridizacijos eksperimentą, atrinkta apie 200 pelės ir žmogaus klonų didelės kopijų skaičiaus integracijai. Ištirta didelės kopijų skaičiaus klonų OB ekspresija, iš pradžių panaudojant nudažymą Coomassie; bandymas parodė, kad transformuotų mielių kultūrinėje terpėje yra naujas 16 kD baltymas. Buvo patvirtinta, kad 16 kD juosta yra OB, naudojant antikūnus prieš bakterijų ekspresuotą OB baltymą. Rekombinantiniai baltymai valyti, panaudojant žemiau aprašytą dviejų stadijų valymo metodą. Išmatuoti masių spektrai ir atliktas bandymas su bromcianu pagal Beavis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6873-6877 (1990) aprašytą metodiką.

Visa pelės ir žmogaus OB genų OB koduojanti seka, C-galinė signalinės sekos atžvilgiu, buvo subklonuota į pET156b ekspresijos vektorių (Novagen) ir perekspresuota *Escherichia coli* [BL21(DE3)p1YsS], naudojant T7 RNR polimerazės sistemą [Studier *et al.*, *Meth. Enzymology*, 185:80-89 (1990)]. Ląstelės, išaugintos 30°C temperatūroje iki optinio tankio 0,7, kai bangos ilgis yra 595 nm, ir indukuotos 0,5 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidu per naktį, surinktos panaudojant nedidelio greičio centrifugavimą. Lizuota, panaudojant tris sušaldymo-atšildymo ciklus, o DNR suskaldyta DNRaze. Membranų ekstrakcija vykdyta, panaudojant ultragarsą ir soliubilizaciją detergentais, ir gauta inkliūzijos kūnelių tabletė ištirpinta 6 M guanidino-HCl, 20 mM HEPES, pH 8,4. Rekombinantinis OB baltymas valytas denatūruojančiomis sąlygomis IMAC metodu, naudojant Ni-jonų afininę kolonėlę ir plaunant vis didėjančių koncentracijų imidazolo

tirpalais. Tada išvalytas denatūruotas OB baltymas laikomas 6 M guanidino-HCl, 10 mM natrio acetato (NaAc), pH 5 tirpale ir redukuojamas 1 mM DTT kambario temperatūroje 1 valandą. Denatūracija atliekama, skiedžiant redukuotą baltymą 20% glicerolio, 5 mM CaCl_2 , 5 mM NaAc, pH 5 tirpalu, maišant ir inkubuojant kambario temperatūroje 8-12 valandų. Po denatūracijos tirpalo pH padidinamas iki 8,4, pridedant Tris iki 10 mM koncentracijos, o hekso-histidino tag pašalinamas, panaudojant skaldymą trombinu. Suskaldytas renatūruotas baltymas vėl valomas IMAC metodu, norint atskirti produktą nuo trombino ir nesuskaldyto sulieto baltymo. Suskaldytas renatūruotas baltymas išsiplauna iš Ni jonų afininės kolonėlės, esant 40 mM imidazolo, o trombinas nėra sulaikomas, ir nesuskaldytas sulietas baltymas išsiplauna, esant 0,2 mM imidazolo. Tada produktas koncentruojamas, veikiamas 100 mM EDTA ir 10 mM fericianido ir vėl valomas gel-filtracijos būdu, naudojant Pharmacia superdekso 75 16/60 kolonėlę.

Atliktas Ellmano bandymas, pagal Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82:70-77 (1959) aprašytą metodiką. Ellmano reagentas pagamintas, ištirpinant 39,6 mg 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoinės rūgštis) (DTNB) 10 ml 0,05 M fosfato, pH 8. Gauta kalibracinė kreivė 10-120 mM laisvo sulfhidrilo koncentracijų intervale (naudojant redukuoto DTT 1 mM pagrindinį tirpalą), esant 412 nm bangos ilgiui. Kiekvienam bandymui imama 0,02 ml Ellmano reagento ir bendras reakcijos mišinio tūris yra 0,5 ml. Išmatuotas laisvos sulfhidrilo grupės ekstinkcijos koeficientas buvo $12974 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (koreliacijos koeficientas 0.99987), kuris 5% ribose atitinka anksčiau pateiktą reikšmę ($13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Ellmano bandymui panaudota 15 ml 2 mg/ml koncentracijos gryno gel-nufiltruoto baltymo, atitinkančio galimą laisvo sulfhidrilo apie 24 mM koncentraciją galutiniame reakcijos mišinyje. Gauta tirpalo A_{412} buvo apie 0,02, kas rodo, kad dvi baltymo cisteino liekanos yra oksiduotoje būsenoje, sudarydamos cistiną, arba kad jo laisvos sulfhidrilo grupės yra pilnai paslėptos neprieinamoje sulankstyto baltymo dalyje. Tokie patys rezultatai gauti, atliekant tą patį bandymą su nesulankstytu baltymu, esant 6 M guanidino-HCl.

Po vieną pelę patalpinama į nepatogeninės aplinkos narvelius ir jos pripratamos prie maisto, susidedančio iš 35% (pagal svorį) Laboratory Rodent Diet 5001 (PMP Feeds, Inc.), 5,9% (pagal svorį) tapioka pudingo mišinio (General Foods) ir 59,1% vandens, kurio energetinė vertė yra 1,30 kkal/g. Maistas sterilizuojamas autoklavoje ir

supakuojamas į 60 mm plastikines lėkšteles, kurios pritvirtinamos ant 100 mm petri lėkštelių viršaus. Tapioka turi pastos pavidalą, todėl gyvuliukui sunku šį maistą išbarstyti po narvą. 100 mm dangteliai sulaiko nedidelį gyvuliuko išbarstyto maisto kiekį. Šviežia maisto lėkštelė įdedama į narvą kiekvieną rytą, o praėjusios dienos lėkštelė išimama ir pasverama. Svorio skirtumas parodo per dieną suvartoto maisto kiekį. Rekombinantinio baltymo poveikis į maisto suvartojimą ir kūno svorį matuotas trims pelių linijoms: C57B1/6J *ob/ob*, C57B1/Ks *db/db* ir CBA/J *+/+*, gautomis iš Jackson Laboratory. Trisdešimt kiekvienos linijos pelių padalinta į grupes po dešimt pelių. Viena kiekvienos linijos grupė gavo perlankstyto bakterinio ob baltymo injekcijas intraperitonines (i.p.), esant 5 mg/g/per dieną 300 μ l PBS buferyje dozei. Antroji grupė gavo to paties tūrio PBS i.p. injekcijas. Šios kontrolinės pelės gavo rekombinantinio baltymo PBS dializato injekcijas. PBS buvo išvalytas nuo endotoksino, naudojant Acticlean ETOX kolonėlę. Trečioji gyvuliukų grupė negavo injekcijų. Maisto suvartojimas buvo matuojamas kasdien, o kūno svorio matavimai atliekami reguliariai iš viso 3,5 savaitės. Porinio maitinimo eksperimentuose atskiros *ob* pelių grupės maisto suvartojimas lyginamas su *ob* pelių, gavusių baltymo, kasdieniniu maisto suvartojimu.

Rezultatai

OB baltymas cirkuliuoja pelės, žiurkės ir žmogaus plazmoje.

Rekombinantinis pelės ir žmogaus OB baltymas buvo pagamintas, naudojant pET15b bakterinį ekspresijos vektorių (Novagen) ir klonuojant į *Pichia pastoris*- mielių ekspresijos sistemą, kuri išskiria rekombinantinius baltymus tiesiai į kultūrinę terpę. Mielėse ekspresuotas ob baltymas turi 146 aminorūgštis C-gale prie signalinės sekos. Triušiai buvo imunizuoti bakteriniais baltymais (HRP, Inc.). Antikūnai buvo imunoišgryninti (Research Genetics) ir naudoti adipozinio audinio baltymo iš plazmos imunonusodinimo bandymuose ir vesterno blotinge.

Pelės plazmos OB baltymas migruoja, esant 16 kD molekuliniam svoriui (pagal SDS-PAGE). Jo elektroforetinis judrumas yra toks pats, kaip ir mielių išskiriamo rekombinantinio OB baltymo, kuriame pašalinta signalinė seka, judrumas (fig. 24A). C57BL/6J *ob/ob* pelių, kurios turi neprasminę mutaciją prie 105 kodono, plazmoje šio

baltymo nerasta. Kai kuriuose kituose antiserumuose nepavyko identifikuoti iš 105 liekanų susidedančio sutrumpinto polipeptido grandinės, kurios galima laukti pagal kDNR seką.

db/db pelėse, lyginant su kontroliniais gyvuliukais, pastebėtas 10 kartų padidintas cirkuliuojančio baltymo kiekis (fig. 24A). Laukinio tipo ir *falfa* žiurkių plazmos imunonusodinimo bandymai parodė, kad mutantinių žiurkių plazmoje, lyginant su laukiniu tipu, yra 20 kartų padidintas OB baltymo kiekis (fig. 24B). *db* mutacija duoda nutukusį fenotipą, identišką fenotipui ob pelėse (Bahary *et al.*, 1990, *supra*). Riebios (*fatty*) žiurkės yra nutukusios dėl recesyvinės mutacijos gene, homologiškame *db* (Truett *et al.*, 1991, *supra*). Norint nustatyti OB kiekius pelės plazmoje, į serumą buvo dedami vis didėjantys rekombinantinio baltymo kiekiai ir imunonusodinama (fig. 24C). Didėjant rekombinantinio baltymo kiekiui, vesterno blotinge matomas tiesiškas signalo intensyvumo didėjimas. Natyvaus baltymo pelės plazmoje signalo intensyvumo palyginimas su standartais parodė, kad cirkuliuojančio OB baltymo kiekis laukinio tipo pelėse yra apie 20 ng/ml. Šie duomenys rodo, kad imunonusodinimai ir vesterno blotingai atlikti, esant antikūno pertekliui. Padidinti OB baltymo kiekiai taip pat randami adipozinio audinio iš *db/db* pelių baltyminiuose ekstraktuose, lyginant su kontrole (fig. 24D). Kaip galima laukti sekvenuoto baltymo atveju, baltymas iš adipozinio audinio frakcionuotas, imant nevalytą membraninę frakciją (duomenys neparodyti).

Buvo imunonusodinti šešių liesų žmonių, kurių kūno masės indeksas (BMI) yra mažesnis už 25 ($BMI = \text{svoris} / \text{ūgis}^2$), plazmos mėginiai, naudojant imunoišgrynintus antikūnus prieš žmogaus baltymą. Imunonusodinta medžiaga migravo, esant elektroforetiniam judrumui, tokiam pačiam kaip ir 146 aminorūgščių žmogaus baltymo, ekspresuoto mielėse, judrumas. Signalų intensyvumai šešiuose pavyzdžiuose buvo labai skirtingi (fig. 25A). Autoradiografinė densitometrija parodė, kad šie kiekiai HP1 ir HP6 individuose skiriasi apie 5 kartus, o kituose subjektuose yra tarpiniai kiekiai. Atliktas fermentinis imunobandymas (ELISA), naudojant imunoišgrynintą antikūną ir perlankstyta bakterinį baltymą kaip standartą (žr. žemiau). Gauta standartinė kreivė parodyta fig. 25B. Pagal šį tyrimą, OB baltymo kiekiai šešių žmonių plazmoje buvo 2-15 ng/ml ribose (fig. 25C). OB baltymo kiekis HP6 plazmoje buvo už imunobandymo tiesinio intervalo ribų, ir yra ≥ 15 ng/ml. Šie kiekybiniai skirtumai koreliuojasi su vesterno blotingo duomenimis.

Preliminarūs duomenys leidžia manyti, kad leptinas gali cirkuliuoti (bent jau dalinai) susikompleksavęs su kitu baltymu arba baltymais. Ši išvada paremta serumo titravimo kreivės formos heterogeniškumu, lyginant su rekombinantiniu standartu. Didelio kiekio leptino, imunoišgryninto per triušio anti-OB kolonėlę HPLC gel-filtracijos būdu denatūruojančiose ir nedenatūruojančiose sąlygose, analizė, stebint ELISA ir SDS-PAGE metodais, leidžia manyti, kad OB polipeptidas elgiasi kaip didelio molekulinio svorio kompleksas. Tačiau šie duomenys yra preliminarūs; OB rišantį baltymą, jei toks iš viso yra, dar reikia apibūdinti.

OB baltymo struktūrinės ypatybės

Kadangi OB baltymas turi dvi cisteino liekanas, jis gali sudaryti arba vidines, arba tarpmolekulinės disulfidines jungtis *in vivo* oksidacijos sąlygose. Buvo pakartotas vesterno blotingas, į mėginio buferį pridėjus arba ne pridėjus redukuojančio agento. Abiem atvejais žmogaus serumo OB baltymas migravo kaip monomeras (duomenys neparodyti). Neredukuojančiomis sąlygomis baltymas, imunonusodintas iš db pelės serumo, buvo rastas padėtyse, atitinkančiose tiek 16 kD monomerą, tiek ir apie 32 kD dimerą (fig. 26A). Didesnio molekulinio svorio baltymas išnyko redukuojančiose sąlygose, kas leidžia manyti, kad pelės OB frakcija cirkuliuoja kaip didesnio molekulinio svorio formos, atsiradusios dėl tarpmolekulinės disulfidinės jungties susidarymo. Apie 80% pelės OB cirkuliuoja kaip 16 kD baltymas ir 20% - kaip 32 kD forma.

Tos pačios molekulės formos randamos ir tada, kai pelės ir žmogaus baltymai ekspresuojami *Pichia pastoris* [Abrams *et al.*, *Immunol. Rev.*, :5-24 (1992)]. Šiuose tyrimuose DNR seka, atitinkanti 146 aminorūgščių subrendusį baltymą, klonuota mielių α -persidengimo faktoriaus signalinės sekos žemyn einančia kryptimi pPIC.9 vektoriuje (Invitrogen). OB baltymas, išskirtas iš mielių štamų, ekspresuojančių pelės ir žmogaus baltymus, terpės, ir atlikta jo elektroforezė redukuojančiomis ir neredukuojančiomis sąlygomis (fig. 26A). Neredukuojančiose sąlygose mielėse ekspresuotas pelės baltymas pagrindinai buvo dimero formoje, o esant redukcijos agentų - tik monomero formoje. Rekombinantinis žmogaus baltymas abejose sąlygose migravo kaip monomeras (duomenys neparodyti).

Ekspresuotas *Pichia* išvalytas žmogaus baltymas, pagal masių spektroskopijos duomenis, turėjo 16024 ± 3 Da molekulinę masę [Beavis, 1990, *supra*]. Ši reikšmė sutampa su masės reikšme, išskaičiuota pagal baltymo, turinčio vieną vidinį disulfidinį tiltelį, aminorūgščių seką (16024 Da). Baltymo skaldymo bromcianu produktų Matrikso lazerinės desorbcinės spektrometrijos analizė rodo, kad cisteinai 117 ir 167 padėtyse yra sujungti vidine disulfidine jungtimi (fig. 26B). Bromcianas skaldo prie karboksi-galo esančias metionino liekanas.

Bioaktyvaus rekombinantinio baltymo gavimas ir apibūdinimas

Pelės OB baltymas buvo ekspresuotas *E.coli* iš pET 15b plazmidės kaip netirpus sulietas baltymas, turintis 20-oje padėtyje N-galinį hekso-histidino tag, kuriame yra trombino skaldymo vieta. Bakteriniai inklūzijos kūneliai soliubilizuoti, naudojant guanidino-HCl ir išskirti denatūruojančiose sąlygose, naudojant imobilizuoto metalo jono afininę chromatografiją (IMAC) (fig. 27). Išvalytas denatūruotas sulietas baltymas redukuojamas, praskiedžiamas ir perlankstomas vandeniniame tirpale kambario temperatūroje. Po skaldymo trombinu, renatūruotas pelės OB baltymas, turintis 4 papildomas N-galines liekanas (Gly-Ser-His-Met; SEQ ID NO:38), vėl valomas IMAC metodu, kad jo homogeniškumas būtų $>98\%$, sprendžiant pagal SDS-PAGE ir masių spektrometrijos duomenis. Pagal Matrikso lazerinę desorbcinę masių spektrometriją jo masė yra 16414 ± 3 Da (numatyta masė yra 16415 Da). SDS-PAGE redukuojančiose ir neredukuojančiose sąlygose parodė, kad yra tik vienos rūšies forma, kurios molekulinė masė yra 16 kD (duomenys neparodyti).

Dinaminė šviesos sklaida, naudojant DP801 molekulės dydžio detektorių (Protein Solutions, Inc.) parodė, kad renatūruotas pelės OB baltymas yra daugiausia monomerinis, turintis šiek tiek aukštesnės eilės agregatų. Baltymas apdorotas EDTA ir chemiškai oksiduotas. Po to, gel-filtracijos būdu pašalintos didesnio molekulinio svorio formos. Tolimesnė dinaminė šviesos sklaida patvirtino, kad išvalytas renatūruotas rekombinantinis pelės OB baltymas yra monodispersinis. Atlikus dializę fosfatiniame buferyje su NaCl (PBS), pašalintas bakterinis endotoksinas, panaudojant Acticlean ETOX kolonėlę (Sterogene Bioseparations, Inc.). Galutinė baltymo išeiga 45 ml/l.

Norint nustatyti oksidacijos būseną, atliktas išvalyto renatūruoto rekombinantinio pelės OB baltymo Ellmano bandymas [Ellman, 1959, *supra*]. Ir renatūruotas baltymas, ir perlankstytas baltymas panaudojant 6 M guanidino-HCl, parodė, kad jame yra $<0.5\%$ laisvų sulfhidrilo grupių, kas rodo, kad monomerinis produktas turi vidinę disulfidinę jungtį. Tą patvirtina ir perlankstyto bakterinio baltymo skaldymo bromcianu produktų masių spektrometrija (duomenys neparodyti).

OB baltymo bioaktyvumas.

Išvalytas renatūruotas rekombinantinis pelės OB baltymas buvo duodamas C57B1/6J *ob/ob* (16 savaičių amžiaus), C57B1/Ks *db/db* (12 savaičių amžiaus) ir CBA/j *+/+* (8 savaičių amžiaus) pelių grupėms (po 10 pelių), kasdien suleidžiant į pilvą 5 mg/kg/per dieną. Toks pat gyvuliukų skaičius gavo kasdienines PBS injekcijas. Kontrolinėms injekcijoms naudotas PBS buvo gautas iš dializato, pasiekus baltymo pusiausvyrą. Po dešimt gyvuliukų iš kiekvienos minėtų trijų pelių linijų negavo injekcijų. Atskirų gyvuliukų maisto suvartojimas buvo kontroliuojamas kasdien, o gyvuliukų kūno svoris nustatytas kas 3-4 dienas. Visų 9 pelių grupių maisto suvartojimo ir kūno svorio bendri rezultatai parodyti fig. 28A-F, o statistikinis duomenų reikšmingumas parodytas 1 lentelėje. C57B1/6J *ob/ob* pelių, kurioms buvo leidžiamas baltymas, maisto suvartojimas žymiai sumažėjo po pirmosios injekcijos ir toliau mažėjo iki 5-os dienos, o tada stabilizavosi, ir tada jų maisto suvartojimo kiekis sudarė apie 40%, lyginant su gyvuliukais, gavusiais PBS injekcijas ($p<0,001$). Pelės, kurioms buvo leista ne OB baltymas, per trijų savaičių tyrimo laikotarpį neprarado kūno svorio. C57B1/ *ob/ob* pelės, gavusios baltymą, po 5 dienų prarado apie 10% kūno svorio ($p<0,001$). Šių gyvuliukų kūno svoris per trijų savaičių poveikio baltymu laikotarpį laipsniškai mažėjo, o po 3 savaičių *ob* gyvuliukų, gavusių baltymo, svoris vidutiniškai sumažėjo iki 60% jų pradinio svorio ($p<0,0001$). Buvo šeriama atskira gaunančių ir negaunančių baltymą *ob* pelių porų grupė. Fig. 29B rodo, kad suporuotai šeriamos pelės prarado daug mažiau svorio, nei gyvuliukai, gavę rekombinantinio baltymo ($p<0,02$). Dviejų pelių, gavusių arba baltymo, arba tirpiklio injekcijas, fotografija rodo didelį jų išvaizdos skirtumą, atsirandantį dėl baltymo poveikio (fig. 28B). Norint dar labiau įsitikinti, kad tai yra baltymo poveikis, padarytos dviejų kiekvienos grupės pelių autopsijos. *ob* pelių, gavusių baltymo, apžiūrėjimas parodė, kad jose labai smarkiai sumažėjo riebalų kiekis, o taip pat ir kepenų dydis. Paveikus baltymu,

db pelių ir laukinio tipo pelių kepenų svoris nepakito. *ob* pelių, gavusių PBS injekcijas, kepenys svėrė 5,04 ir 5,02 g. o gyvuliukų, gavusių baltymo - 2,23 ir 2,03 gramų. *ob* pelių kepenys buvo blyškiai riebalingos, o *ob* pelių, gavusių baltymo, kepenys buvo tamsesnės spalvos, būdingos normalioms kepenims (fig. 29C). Kepenų histologiniai pjūviai parodė, kad neapdoroti gyvuliukai turi riebalingas kepenis, kurios žymiai pagerėja, kai gyvuliukai gauna baltymo (duomenys neparodyti).

Priešingai negu *ob* pelių atveju, C57BL/Ks *db/db* pelių, gavusių baltymą, lyginant su kontroline grupe, gavusią tirpiklį, žymių kūno svorio arba maisto suvartojimo skirtumų nebuvo (fig. 28A-F, 1 lentelė). Visos trys *db/db* pelių grupės apdorojimo laikotarpyje prarado 2-5 gramus kūno svorio. Panaudojant gliukometrą, išmatuotas *db* pelių vidutinis gliukozės kiekis kraujyje; visoms pelėms jis buvo 500 mg/dl, kas rodo, kad šiuose gyvuliukuose išsivystė antrinio tipo diabetas. Injekcijos *db* pelėms nutrauktos po dviejų savaičių.

Laukinio tipo pelių, gavusių rekombinantinio OB baltymo, atveju stebimas nedidelis, bet reikšmingas kūno svorio sumažėjimas (fig. 28 A-F, 1 lentelė). Po penkių dienų, per kurias buvo leidžiamas baltymas, pelės prarado vidutiniškai 0,5 g svorio, tuo tarpu kontrolinės pelės priaugo 0,4 g ($p < 0,02$). Dviejuose vienas po kito einančiuose laiko taškuose baltymą gavę gyvuliukai svėrė daug mažiau, negu pelės, gavusios kasdienes PBS injekcijas. Svorio pokytis buvo mažesnis vėlesniuose laiko taškuose. Gyvuliukų, kurie prarado svorį, maisto suvartojimas nelabai skyrėsi nuo kontrolinių gyvuliukų. PBS injekcijos turėjo nedidelį, bet reikšmingą poveikį į *ob*, *db* ir laukinio tipo pelių maisto suvartojimą ir kūno svorį, lyginant su pelėmis, negavusiomis injekcijų ($p < 0,05$).

1 lentelė

Gyvuliukų grupė	Poveikio grupė	SVORIO POKYTIS				
		Dienos	n	Vidurkis	Stand. paklaida	p
<i>ob/ob</i>	baltymas	1-5	10	-6,38000000	0,47628190	<0,001
			9	-0,14444444	0,24444444	
	tirpiklis	1-12	10	-14,45000000	0,70793126	<0,001
			9	0,98888889	0,38058597	
	baltymas	1-27	6	-24,28333333	0,69924563	<0,0001
			5	4,30000000	0,79874902	
<i>db/db</i>	baltymas	1-5	10	-1,47000000	0,36939891	0,240
	tirpiklis		10	-2,00000000	0,23142073	

CBA/J	baltymas	1-12	10	-3,75000000	0,77348418	0,610
	tirpiklis		10	-4,19000000	0,34655447	
	baltymas	1-5	10	-0,48000000	0,17876117	0,006
	tirpiklis		10	0,38000000	0,21489015	
	baltymas	1-12	10	-0,12000000	0,45748103	0,015
	tirpiklis		10	1,20000000	0,18378732	
	baltymas	1-27	5	1,98000000	0,48723711	<0,651
	tirpiklis		6	2,23333333	0,20763215	

Aptarimas

OB lokuso baltymo produkto endokrininę funkciją pirmasis pasiūlė Coleman, kuris parodė, kad *ob/ob* pelės kūno svoris sumažėja po parabiominio sujungimo su normaliomis arba *db* pelėmis [Coleman *et al.*, 1978, *supra*]. Aukščiau parodyti rezultatai patvirtina šią hipotezę, nes jie rodo, kad OB baltymas cirkuliuoja kraujyje, o rekombinantinio baltymo injekcijos mažina kūno masę. Geno produkto, koduojamo OB geno, molekulinis svoris yra apie 16 kD, kuris atitinka 146 aminorūgščių seką, esančią karboksi-gale signalinės sekos atžvilgiu. Rekombinantinis OB baltymas nėra modifikuojamas, kai jis ekspresuojamas *Pichia pastoris*. Žinduolių genų ekspresijoje *Pichia* suformuojama teisinga baltymo struktūra [Cregg *et al.*, *Bio/Technology*, 11:905-914 (1993)]. Šie duomenys leidžia manyti, kad OB baltymas nėra glikozilintas ir nėra post-transliuojamas *in vivo*. Duomenys nepašalina galimybės, kad OB baltymas yra kovalentiškai susijungęs pats su savimi arba kitais plazmos arba adipozinio audinio baltymais. Nors baltymo proteolitinis skaldymas nėra negalimas, nebuvo rasta mažesnio molekulinio svorio OB baltymo formų, imant bet kokią naudotą antiserumą, įskaitant 4 anti-peptidinius antikūnus.

OB baltymas turi dvi cisteino liekanas, ir žmonėse cirkuliuoja kaip monomeras, o pelės - kaip monomeras ir kaip dimeras. Tipiška sekretuotoms molekulėms vidinė disulfidinė jungtis rasta tuo atveju, kai žmogaus baltymas yra ekspresuojamas *Pichia pastoris*, kas leidžia manyti, kad ji yra *in vivo*. Tai patvirtina rekombinantinio bakterinio baltymo, kuris turi vidinę disulfidinę jungtį, bioaktyvumas. Pelės OB baltymas plazmoje gali būti randamas kaip monomeras ir dimeras. Monomerai ir dimerai randami tuo atveju, kai pelės OB baltymas yra ekspresuojamas mielėse, kas rodo, kad pelės baltymo polinkis sudaryti dimerą yra dėl pirminės sekos skirtumų, lyginant su žmogaus seka. Visiškai aišku, kad monomeras pasižymi biologiniu aktyvumu, bet dimero funkcinis aktyvumas nėra žinomas.

OB baltymo poveikis į maisto suvartojimą ir kūno svorį *ob* pelių atveju yra labai didelis. Po 3-jų savaitių *ob* pelės, gavusios kasdienines rekombinantinio baltymo injekcijas, prarado 40% jų kūno svorio ir suvartojo 40% maisto, lyginant su kontrolinėmis pelėmis. Be to, paveiktų baltymu *ob* pelių svoris per eksperimento laiką dar nepasiekė pusiausvyrinės reikšmės. Porinio maitinimo eksperimento rezultatai rodo, kad svorio praradimas susijęs tiek su maisto suvartojimu, tiek ir su energijos sąnaudomis. Tokiu būdu, atskira *ob* pelių grupė, kurios kalorijų sunaudojimas buvo apribotas, lyginant su gavusiomis baltymo *ob* pelėmis, prarado daug mažiau svorio, nei gyvuliukai, gavę baltymo. *ob/ob* pelių maisto suvartojimo sumažėjimas iki kiekio, mažesnio, nei laukinio tipo pelių, gavusių OB baltymo, rodo, kad jos yra ypatingai jautrios šiems efektams. Iš tikrųjų šiuose gyvuliukuose gali būti padidinta OB receptoriaus reguliacija. *ob* pelių maisto sunaudojimas pasidaro beveik pastovus po 5 baltymo leidimo dienų. Jeigu šis faktas susijęs su tuo, kad susidarė pusiausvyriniai kiekiai baltymo, galima manyti, kad baltymas turi palyginus didelį išsilaikymo puslaikį [*The Pharmacological Basis of Therapeutics*, pp. 19-45, Goodman and Gilman eds., Pergamon Press, New York, (1990)]. Ši išvada sutampa su parabiozės eksperimentų duomenimis [Coleman *et al.*, 1978, *supra*; Weigle, *Int. J. Obesity*, 12:567-578 (1988)].

Rekombinantinio baltymo poveikis į laukinio tipo pelių kūno svorį buvo nedidelis, bet statistiškai reikšmingas per pirmąsias dvi tyrimo savaites. PBS įtaka išsilaikė vėlesniuose laiko taškuose, bet statistinis duomenų reikšmingumas labai sumažėjo po trijų savaitių. Pradinis kūno svorio praradimas negali būti paaiškinamas maisto suvartojimo skirtumais. Matyt maisto suvartojimo matavimai nebuvo pakankamai tikslūs, kad jie galėtų parodyti sumažėjimą, kuris tesudaro 1 gramo kūno svorio skirtumą eksperimento metu. Šie duomenys skiriasi nuo ankstesnių eksperimentų rezultatų, kuriuose laukinio tipo graužikai buvo sujungti parabiotiniu ryšiu su *db* pelėmis, *fa* žiurkėmis, žiurkėmis su pagumburio pakenkimais ir žiurkėmis, nutukintomis panaudojant labai kaloringą maistą [Coleman *et al.*, 1978, *supra*; Harris *et al.*, 1987, *supra*; Harris *et al.*, "Physiological and metabolic changes in parabiobiotic partners of obese rats", in *Hormones, Thermogenesis and Obesity*, Lardy and Straatman, eds., Elsevier Science Publishing Co., New York (1989); Hervey, *J. Physiol.*, 145:336-352 (1959)]. Visais atvejais laukinio tipo gyvuliukai pasidarė anoreksiški ir prarado daug svorio. Kadangi *db* pelių ir *fa* žiurkių OB baltymo kiekiai yra

padidinti, ir pelių su pagumburio pažeidimais OB RNR kiekis yra padidintas, galima manyti, kad laukinio tipo pelės gali reaguoti į OB tik tada, kai jo kiekis plazmoje yra gana didelis. Čia aprašyti duomenys paremia galimybę, kad įvedamo baltymo kiekiai buvo žemesni už endogeninius kiekius, ir todėl pusiausvyrinis kūno svoris yra šiek tiek mažesnis. Cirkuliuojančių apdorotose pelėse OB baltymo kiekių nustatymas turėtų išspręsti šią problemą. Nors dar nėra prieinamas pelės baltymo imunotyrimas, imunonusodinimo tyrimai leidžia manyti, kad cirkuliuojančio OB baltymo kiekiai gavusiose baltymą laukinio tipo pelėse nėra labai padidinti.

Mažesnis baltymo poveikis į laukinio tipo peles ir atsako į jį nebuvimas *db* pelėse leidžia manyti, kad šis poveikis baltymu nėra susijęs su nespecifiniais arba nepalankiais efektais. Visos *db* pelės poveikio baltymu laikotarpyje prarado šiek tiek svorio, nepriklausomai nuo to, ar jos gavo ar negavo baltymo. *db* gyvuliukai buvo pastebimai hiperglikemiški, ir svorio praradimas greičiausiai yra dėl diabeto, o ne dėl eksperimento metodikos. C57BL/Ks *db/db* pelėse dažnai atsiranda diabetas, ir šiame eksperimente naudoto amžiaus pelės pradeda prarasti šiek tiek svorio [Coleman *et al.*, 1978, *supra*]. Panašaus amžiaus C57B1/6J *ob/ob* pelėse neatsiranda pastebimos glikemijos. Manoma, kad tokie fenotipų skirtumai yra genetiniai skirtumai linijų, kurios turi mutacijas (C57B1/6J palyginus su C57B1/Ks) [Coleman *et al.*, 1978, *supra*].

Tai, kad nepavyko nustatyti sutrumpinto 105 aminorūgštis turinčio baltymo, kuris turėtų būti, išeinant iš OB geno kDNR sekos, leidžia manyti, kad mutantinis baltymas yra arba degraduojamas, arba netransliuojamas. Tačiau negalima atmesti galimybės, kad panaudoti antiserumai neparodo tokio sutrumpinto baltymo. Pastebėtas dešimties kartų *ob* baltymo kiekio padidėjimas *db* pelėse, lyginant su laukiniu tipu, leidžia manyti, kad produkuojama daug šio baltymo ir yra pasipriešinimas jo poveikiui. Šie duomenys koreliuojasi su mRNR tyrimais. Kaip jau buvo minėta, ankstesni eksperimentai rodė, kad mutacijos *db* pelės ir *fa* žiurkės genuose, kurios patenka į homologinės chromosomos sritis, duoda plazmos faktoriaus, kuris mažina kūno svorį, perprodukciją [Truett *et al.*, 1991, *supra*; Coleman *et al.*, 1978, *supra*; Hervey, 1959, *supra*]. Abiem atvejais buvo priimama, kad mutantiniai gyvuliukai yra rezistentiški OB baltymo efektams. Šią galimybę patvirtina duomenys, kad OB baltymas neveikia *db* pelių kūno svorio ir maisto sunaudojimo.

Žmonių nutukimas gali būti susijęs su dideliais kiekiais OB baltymo individo, kuris palyginus silpnai reaguoja į šį hormoną, plazmoje. Kita vertus, sumažinta OB ekspresija taip pat gali duoti nutukimą, kurio atveju gali būti rasti "normalūs" (t.y. neatitinkamai maži) šio baltymo kiekiai. Taigi, OB baltymo kiekiai žmogaus plazmoje gali būti skirtingų nutukimo formų rodiklis. Nedidelėje subjektų grupėje, kurių BMI < 25, ELISA metodu nustatyti nedideli nanogramų eilės cirkuliuojančio OB baltymo kiekiai. Svarbu pažymėti, kad buvo pastebėtos įvairios koncentracijos, kas leidžia manyti, kad apsprendžiant kūno svorį gali turėti reikšmę ekspresijos lygis ir/arba jautrumas šiam baltymui.

OB baltymo veikimo vieta yra nežinoma. Baltymas veikia tiek maisto sunaudojimą, tiek ir energijos sąnaudas - rezultatai sutampantys su klinikiniais tyrimais, rodančiais, kad pokyčiai abejose sistemose veikia į kūno svorio reguliavimą [Leibel *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 332:621-628 (1995); Keesey *et al.*, "Metabolic defense of the body weight set-point", *Association for Research in Nervous and Mental Disease*, pp. 87-96, Stunkard and Stellar, eds., Raven Press, New York. (1984)]. Panašu, kad OB kūno svorio reguliavimo kelyje pagumburis yra toliau, nors taip pat yra galimi ir tiesioginiai efektai į įvairius organus.

9 PAVYZDYS: Padidinta OB RNR ekspresija pelių su pagumburio pakenkimais ir mutacijomis *db* lokuse adipocituose

Šio klonuoto pelės nutukimo geno (OB) produktas vaidina svarbų vaidmenį adipozinio audinio masės reguliavime. OB RNR specifiškai ekspresuojamas pelės adipocituose *in vivo* kiekvienoje iš keleto įvairių riebalinių ląstelių sankaupų, įskaitant ruduosius riebalus. Jis taip pat ekspresuojamas kultūrinėse 3T3-442A preadipocitų ląstelėse, kuriose buvo indukuota diferenciacija. Pelės su pagumburio pakenkimais bei pelės, turinčios mutaciją *db* lokuse, ekspresuoja dvidešimt kartų didesnę OB RNR kiekį adipoziniame audinyje. Šie duomenys rodo, kad ir *db* genas, ir pagumburis yra po OB geno adipozinio audinio masės reguliavimo kelyje, ir sutampa su ankstesniais eksperimentais, leidžiančiais manyti, kad *db* lokusas koduoja OB receptorių. *db/db* ir pakenkimus turinčiose pelėse. Kiekybiniai OB RNR ekspresijos lygių skirtumai koreliuojasi su adipocitų lipidų kiekiu. Panašu, kad, apsprendžiant kūno svorį, svarbų vaidmenį vaidina molekulės, kurios reguliuoja OB geno ekspresijos lygį adipocituose, o taip pat ir molekulės, kurios yra OB efektų jo veikimo vietoje tarpininkai.

Medžiagos ir metodai

Hibridizacija in situ.

Baltieji riebaliniai audiniai iš laukinio tipo (wt) ir db pelių tų pačių pilvo vietų tuo pačiu metu apdoroti pagal modifikuotą metodą, kurį aprašė Richardson *et al.*, *Growth, Development & Aging*, 56:149-157 (1992). Trumpai tariant, audiniai buvo fiksuoti Bouin tirpale 2 h 4°C temperatūroje. Po to audiniai dehidratuojami, panaudojant serijinį apdorojimą vis didėjančiomis etanolio koncentracijomis nuo 10% iki 100%, kiekvieną kartą po 5 min. 4°C temperatūroje. Po to audiniai inkubuoti su ksilenu (1 h) ir parafinu (2 h) 65°C temperatūroje. Imobilizuoti wt ir db/db riebaliniai audiniai supjaustomi ir vėliau paruošiami tyrimams tomis pačiomis sąlygomis. Pjūviai kaitinami 65°C temperatūroje ir apdorojami ksilenu ir etanolio nuo 100% iki 50% serijinio skiedimo tirpalais kambario temperatūroje; kiekvienas apdorojimas trunka 3 min. OB geno antiprasminis zondas sintezuotas, panaudojant linearizuotos OB geno koduojančios sekos, kuri yra aukštyne einančia kryptimi nuo Sp6 RNR polimerazės promotoriaus, transkripciją *in vitro*. Hibridizacija *in situ* atlikta tiksliai pagal Schaeren-Wiemers *et al.*, *Histochemistry*, 100:431-440 (1993).

RNR pagaminimas ir ląstelių kultūra

Bendra RNR ir northern blotai pagaminti taip, kaip buvo aprašyta. Strominės vaskuliarinės ląstelės ir adipocitai pagaminti pagal Rodbell, o RNR iš abiejų frakcijų pagaminta pagal Dani *et al.*, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 63:199-208 (1989); Rodbell *J. Biol. Chem.* 239:375-380 (1974). Atlikus subklonavimą, 3T3-F442 ląstelės auginamos Dulbecco modifikuotoje Eagle terpėje, turinčioje 10% fetalinio jaučio serumo (vadinamo standartine terpe) [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)]. Kai įvyksta susiliejimas, ląstelės apdorojamos standartinėje terpėje, turinčioje 2 nM trijodtrionino (T3) ir 17 nM insulino. Po dvylikos dienų gaunama RNR, taip kaip aprašyta aukščiau.

Apdorojimas aukso tiogliukoze (GTG)

Dviejų mėnesių amžiaus CBA/J pelių patelės paveikiamos viena aurotiogliukozės (Sigma catalog No. A0632) 0,2 mg/g normaliame fiziologiniame tirpale doze, suleidžiama į pilvą. Kontroliniams gyvuliukams suleistas normalus fiziologinis tirpalas. Pelės pasveriamos, praėjus 1 mėnesiui po apdorojimo. Išskiriama adipozinio audinio RNR iš tų apdorotų gyvuliukų, kurių svoris padidėjo daugiau kaip 20 g po apdorojimo GTG.

Rezultatai

Neseniai buvo rasta, kad adipoziniame audinyje ekspresuojamas OB genas [Zhang *et al.*, *Nature*, 372:425-432 (1994)]. Kadangi adipozinis audinys yra sudarytas iš daugelio ląstelių tipų, įskaitant adipocitus, preadipocitus, fibroblastus ir vaskuliarines ląsteles, *in situ* hibridizacija atlikta su normalių gyvuliukų antisėklidinių minkštųjų audinių pjūviais su prasminiais ir antiprasminiais OB ribozondais [Richardson *et al.*, 1992, *supra*; Wasserman, "The concept of the fat organ" in Rodahl, Issekutz, *fat as a tissue*", pp. 22-92, McGraw Hill, New York (1964)]. Naudojant antiprasminį zondą, visuose pjūviuose adipocituose matomi teigiami signalai (fig. 30, pažymėta wt). Signalų nepastebėta, kai antiprasminis zondas hibridizuotas su smegenų pjūviais (duomenys neparodyti). Antiprasminio zondo hibridizacija su C57B1/Ks *db/db* pelių adipozinio audinio pjūviais buvo labai padidinta, kas patvirtina būdingą adipocitams OB RNR ekspresiją ir parodo didelį OB RNR kiekio viename adipocite padidėjimą šiuose gyvuliukuose (fig. 30, pažymėta *db/db*). Pelės, turinčios mutaciją *db* lokuse, yra labai nutukę; tai yra dalis sindromo, kuris yra fenotipiškai būdingas ir C57B1/6J *ob/ob* pelėms (Bahary *et al.*, 1990, *supra*).

Adipozinio audinio stromos ląstelės, atskirtos nuo adipocitų, nesintezavo OB RNR. Kaip ir buvo galima laukti, ląstelės adipocitų frakcijoje ekspresavo OB RNR, naudojant northerno blotus (fig. 31). Tas pats rezultatas gautas ir naudojant RT-PCR (duomenys neparodyti). Šie duomenys paremia išvadą, kad tik adipocitai ekspresuoja OB geną. Kultūrinių adipocitų duomenys patvirtina šią išvadą. Šiuose tyrimuose 3T3-F442A ląstelės buvo kultivuotos, naudojant sąlygas, kurios duoda lipidų akumuliaciją, kaip dalis ląstelinės programos, vedančios prie diferenciacijos į adipocitus. OB RNR neekspresuojama eksponentiškai augančiose ląstelėse, neekspresuojama ir susiliejusiose 3T3 F442A preadipocitų ląstelėse, kurios ekspresuoja ankstyvuosius markerius, tuo tarpu šių ląstelių diferenciacija į adipocitus duoda pastebimų OB RNR kiekių ekspresiją (fig. 31) [Dani *et*

al., J. Biol. Chem., 264:10119-10125 (1989)]. OB RNR kiekis yra ypatingai jautrus kultivavimo sąlygoms, kadangi signalų nebuvo vėlesnėse, nepaveiktose insulinu sulietose ląstelėse.

Hibridizacijos tyrimai parodė, kad OB RNR ekspresuojama *in vivo* keliose skirtingose riebalų sandaupuose, įskaitant antsklidžio, priegimdžio, pilvo, esančius aplink inkstą ir kirkšnies riebalinius audinius (fig. 32A). Tikslus ekspresijos lygis kiekvienoje sandaupoje šiek tiek skyrėsi; kirkšnies ir priegimdžio riebalai ekspresavo mažesnius OB RNR kiekius. OB RNR ekspresuoja ir rudasis adipozinis audinys, nors ekspresijos lygis yra apie 50 kartų mažesnis ruduosiuose riebaluose, lyginant su kitų adipozinių audinių sandaupomis. Šie kiekybiniai skirtumai šiek tiek koreliuojasi su anksčiau aprašytais ląstelių dydžio įvairiose riebalinių ląstelių sandaupuose skirtumais [Johnson *et al.*, *J. Lipid Res.*, 13:2-11 (1972)]. OB RNR kiekio ruduosiuose riebaluose neveikia poveikis šalčiu (fig. 32B). Šiame eksperimente nesujungto baltymo (UCP) RNR kiekis padidėjo ruduosiuose riebaluose, paveikus šalčiu, tuo tarpu kai *ob* RNR kiekis nepakito [Jacobsson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260:16250-16254 (1985)]. Bendrai imant, šie duomenys patvirtina, kad visi adipocitai gali produkuoti OB RNR, ir rodo kintamą ekspresijos lygį įvairiose riebalinėse sandaupuose. Šie duomenys patvirtina tikimybę, kad koduojamo baltymo kiekis koreliuoja su visa adipozinio audinio mase.

Buvo išmatuoti OB RNR kiekiai *db/db* pelėse ir pelėse su pgumburio pakenkimais. Ventramedialinio pagumburio (VMH) pakenkimai duoda nutukimą, kaip sindromo dalį, panašų į *ob/ob* ir *db/db* pelių nutukimą [Bray *et al.*, *Metabolism*, 24:99-117 (1975)]. Parabiosės eksperimentai duoda pagrindą manyti, kad pakenkimai duoda kraujuje atsiradusio faktoriaus padidintą ekspresiją, kuris mažina maisto suvartojimą ir kūno svorį [Hervey, 1959, *supra*]. Panašūs rezultatai pastebėti ir tuo atveju, kai pelės, turinčios mutaciją *db* lokuse, sujungiamos su normaliomis pelėmis, kas leidžia manyti, kad OB receptorių gali būti koduojamas *db* lokuse [Coleman *et al.*, 1978, *supra*]. Taigi, nutukimas dėl VMH pakenkimų ir *db* mutacijos gali būti atsparumo OB baltymo poveikiui rezultatas. Jei taip yra iš tikrųjų, reiktų laukti OB RNR kiekių adipoziniame audinyje antrinio padidėjimo.

Pagumburio pakenkimai buvo sukelti CBA pelių patelėms, panaudojant cheminę aukso tiogliukozę (GTG) [Debons *et al.*, *Fed. Proc.*, 36:143-147 (1977)]. Toks apdorojimas

duoda specifinius pagumburio pakenkimus, pagrindinai ventramedialinio pagumburio (VMH), ir po to po keleto savaičių atsiranda nutukimas. Paparastai viena intraperitoninė 0,2 mg/g kūno svorio GTG injekcija per keturias savaites sukelia nutukimą. Mėnesio amžiaus CBA/J pelių patelių (20-25 g), apdorotų GTG ir apdorotų ir kontrolinių gyvuliukų tolimesnis svorio augimas parodytas 2 lentelėje. Buvo pagaminta *db/db* pelių ir GTG apdorotų gyvuliukų, kurie priaugo >20 g, adipozinio audinio RNR. Northern blotingas parodė, kad OB RNR kiekis dviejų mėnesių amžiaus *db/db* ir GTG apdorotose pelėse, lyginant su normaliais gyvuliukais, padidėjo dvidešimt kartų (fig. 33).

2 lentelė Aukso tiogliukoze apdorotų pelių svorio priaugimas

	<u>Kontrolė (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%)

Dviejų mėnesių amžiaus CBA/J pelių patelės buvo paveiktos aukso tiogliukoze (GTG). Aukso tiogliukoze (Sigma A0632) suleista intraperitoniniu būdu normaliam fiziologiniame tirpale, imant 2,0 mg/g dozę. Kontrolinių ir gavusių injekciją gyvuliukų svoris nustatytas prieš injekciją ir praėjus mėnesiui po injekcijos. Gyvuliukai apgyvendinti po 5 viename narve ir šeriami *ad libitum*. Priaugtas svoris, praėjus mėnesiui po injekcijos, parodytas 2 lentelėje. Gyvuliukai, kurie per šį mėnesį priaugo daugiau nei 20 g, atrinkti tolimesniems tyrimams.

Aptarimas

Pelės OB geno produktas cirkuliuoja pelės ir žmogaus plazmoje, kur jis gali reguliuojančiai veikti adipozinio audinio masę. Tolimesni ekspresijos reguliacijos ir OB poveikio mechanizmų tyrimai turės labai svarbią reikšmę fiziologinio kelio, kuriuo vyksta kūno svorio reguliavimas, supratimui.

Šis pavyzdys rodo, kad OB geno produktą ekspresuoja tik adipocitai visose adipozinio audinio sancaupose. Šis rezultatas paremia galimybę, kad OB geno baltymo

produktas koreliuojasi su kūno lipidų gausumu. Be to, OB RNR reguliacija yra padidinta dvidešimt kartų *db* pelėse ir pelėse su pagumburio pakenkimais. Šiuose gyvuliukuose tikrasis OB RNR kiekio/ ląstelei padidėjimas, matyt, yra dar didesnis nei dvidešimt kartų, kadangi šiuose gyvuliukuose adipocitinės ląstelės dydis yra padidintas apytikriai penkis kartus (žr. fig. 30) [Debons *et al.*, 1977, *supra*]. Šie duomenys rodo, kad *db* geno ir pagumburio padėtys yra žemyn einančia kryptimi nuo OB kelyje, kuris kontroliuoja kūno svorį, ir sutampa su hipoteze, kad OB receptoriaus yra užkoduotas *db* lokuse [Coleman *et al.*, *Diabetologia*, 14:141-148 (1978)]. OB receptoriaus ir/arba *db* geno molekulinis klonavimas turėtų išspręsti šią problemą. OB RNR kiekio *db/db* ir GTG apdorotose pelėse padidėjimas taip pat leidžia manyti, kad OB geno produktas riebalinėse ląstelėse funkcionuoja neautonomiškai. [Ashwell *et al.*, *Proc. R. Soc. Lond.*, 195:343-353 (1977); Ashwell *et al.*, *Diabetologia*, 15:465-470]. Tokiu būdu, jei užkoduotas baltymas tiesiogiai veiktų riebalines ląsteles, inhibuodamas augimą arba diferenciaciją, laukinio tipo OB geno GTG apdorotose pelėse padidinta ekspresija duotų liesą fenotipą.

Trumpiausias šių duomenų paaiškinimas yra toks, kad OB baltymas funkcionuoja kaip endokrininė signalinė molekulė, kurią išskiria adipocitai, ir veikia pagumburį arba tiesiogiai, arba netiesiogiai. Tiesioginis poveikis į pagumburį reikalautų, kad egzistuojantis mechanizmas leistų OB geno produktui pereiti hematoencefalinį barjerą. Mechanizmai, apimantys apsupamą ventrikulinį organą ir/arba specifinius transporterius turėtų leisti pasiekti smegenis tokio dydžio molekulei, kurią koduoja OB genas [Johnson *et al.*, *FASEB J.*, 7:678-686 (1983); Baura *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 92:1824-1830 (1993); Pardridge, *Endocrine Reviews*, 7:314-330 (1986)]. Tačiau šią hipotezę reikia priimti atsargiai, kol nėra nustatyti būdai, kaip šis baltymas galėtų pereiti hematoencefalinį barjerą. Be to, reikia įvertinti galimus efektus ir į kitus tikslinius organus.

Riebalinių ląstelių signalas(ai), kuris yra atsakingas už OB geno ekspresijos lygio kiekybines variacijas, dar nežinomas, bet koreliuojasi su adipocito ląstelės dydžio skirtumais. *db/db* pelių adipocitai yra 5 kartus didesni už normalių pelių adipocitus, ir ląstelės dydis yra apie 1,0 μ g lipido/ląstelei [Johnson *et al.*, 1972, *supra*]. Ankstesni duomenys parodė, kad kiekviena riebalinė ląstelė ekspresuoja nedidelį OB RNR kiekį, kuris toliau didėja proporcingai ląstelės dydžiui. Taip pat gali būti, kad ląstelės dydis nėra reikšmingas parametras, bet tiesiog koreliuojasi su intraląsteliniu signalu, kuris didina OB

geno ekspresiją *db/db* ir pelėse su pakenktu VMH adipocituose. Bet kuriuo atveju atrodo, kad signalo perdavimo kelio, reguliuojančio OB RNR sintezę, komponentai yra svarbūs, apsprendžiant kūno svorį. Genetiniai ir aplinkos poveikiai, kurie mažina OB ekspresijos lygį, turėtų veikti didindami kūno svorį, taip pat kaip ir poveikiai, kurie mažina jautrumą užkoduotam baltymui. Specifinės molekulės, kurios reguliuoja OB geno ekspresiją, iki šiol dar nežinomos, ir dar reikia nustatyti geno kontrolės, kuri sukelia OB RNR kiekių variacijas, lygius, ir ištirti OB geno reguliuojančius elementus. Molekulių, kurios reguliuoja OB geno ekspresiją adipocituose, nustatymas, o taip pat molekulių, kurios perneša koduojamo baltymo efektus į jo veikimo vietą(as), nustatymas labai padidins mūsų žinias apie fiziologinį kūno svorio reguliavimo mechanizmą.

10 PAVYZDYS: RNR ekspresijos vaizdas ir vietos fizikiniame, citogeniniame ir genetiniame žemėlapiuose nustatymas

Dideli kiekiai OB RNR yra ekspresuojami žmogaus adipoziniame audinyje ir daug mažesni - placentoje ir širdyje. Žmogaus OB genas patenka prie didžiosios dirbtinės mielių chromosomos (YAC) sankaupos, išvestos iš chromosomos 7q31.3. Apart geno santykinės padėties patvirtinimo, paremto pelės ir žmogaus palyginamųjų žemėlapių nustatymu, šiame darbe identifikuoti 8 nustatyti mikrosatelitiniai markeriai labai arti žmogaus OB geno. Kadangi pelės OB mutacijos gali duoti sindromą, kuris yra labai panašus į žmonių pataloginį nutukimą, šie genetiniai markeriai yra svarbūs įrankiai, tiriant galimą OB geno vaidmenį paveldėto žmonių nutukimo formose.

Medžiagos ir metodai

Northerno blotingas.

Bendra RNR buvo gauta iš adipozinio audinio, panaudojant Chirgwin *et al.*, *Biochem.*, 18:5294-5299 (1979) metodą. Northerno blotingas, radiožymių įvedimas ir hibridizacijos atliktos taip, kaip aprašyta Zhang *et al.*, 1994, *supra*. PoliA⁺ RNR northerno blotai (žmogaus MTN, žmogaus MTN II ir žmogaus fetalinė MTN II) gautos iš CLONETECH (Palo Alto, CA), o taip pat ir PCR pradmenys, panaudoti radiožymėto žmogaus aktino zondo gavimui.

STS išaiškinimas.

Buvo ištobulinti ir optimizuoti sekų žmogaus vietoms specifiški (STS) PCR bandymai pagrindinai taip, kaip aprašė [Green *et al.*, *PCR Methods Applic.*, 1991; Green *et al.*, *Genomics*, 11:548-564 (1991); Green "Physical mapping of human chromosomes: generation of chromosome-specific sequence-tagged sites", in *Methods in Molecular Genetics* Vol. 1, Gene and Chromosome Analysis (Part A), pp. 192-210, Adolph ed., Academic Press, Inc., San Diego (1993); Green *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 3:489-501 (1994)]. Kiekviena STS pavadinta, panaudojant priešdėlį 'sWSS', o po to eina būdingas skaičius. Devyniolikos čia aprašytų STS detalės duotos 3 lentelėje kartu su papildoma informacija (pvz., PCR reakcijos sąlygos, pilna DNR seka) randama Genbank ir/arba Genome Data Base (GDB). Mikrosatelitams specifinių STS atveju PCR bandymuose naudoti oligonukleotidiniai pradmenys (3 lentelė), atitinka arba pradmenis, naudotus genotipo analizėje (4 lentelė), arba pradmenis, sukonstruotus (dažniausiai panaudojant kompiuterinę programą OSP) [Hillier *et al.*, *PCR Methods Applic.*, 1: 124-128 (1991)], naudojant DNR seką, randamą Genbank'e. 3 lentelė iliustruoja STS YAC sankaupoje, turinčioje žmogaus OB geną.

3 lentelė

<u>STS pavadinimas</u>	<u>Kitas pavadinimas</u>	<u>Lokusas</u>	<u>Rūšis</u>	<u>PCR pradmenys</u>	<u>Dydis</u> (bp)	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>GDB ID No.</u>
<u>sWSSI734</u>		D7S2185	YAC galas	CAAGACAAATGAGATAAGG AGAGTTACAGCTTACAG	72	39	G00-455-235
<u>sWSS494</u>		D7S2016	Lambda klonas	CTAAACACCTTCCATTC TTATATTCACCTTCCCCCTC	112	40 41 42	G00-334-404
<u>sWSS883</u>	UTS28	D7S1498	Genetinis markeris	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG GTGCAGCTTTAATTGTGAGC	490	43 44	G00-455-262
<u>sWSS2359</u>	AFMa065zg ⁹	D7S1873	Genetinis markeris	AGTGTGTGTCTCTG AAAGGGAGTGTGATAAGTG	142	45 46	G00-455-247
<u>sWSS2336</u>	AFMa125wh1	D7S1874	Genetinis markeris	GGTGTACGTTTAGTTAC GGAATAATGAGAGAGAAGATTG	112	47 48	G00-455-244
<u>sWSSI218</u>	AFM309yf1	D7S680	Genetinis markeris	GCTCAACTGACAGAAAAC GACTATGTAAAGAAATGCC	154	49 50	G00-307-733
<u>sWSSI402</u>		D7S1916	YAC galas	AAAGGGCTTCTAATCTAC CCTCCAACTTCTTTGAC	137	51 52	G00-344-044
<u>sWSS999</u>		D7S1674	YAC intarpas	TAAACCCCTTCTGTTG TTGCATTAATAGTCACACCC	105	53 54	G00-334-839
<u>sWSSI751</u>		D7S2186	YAC galas	CCAAAATCAGAAATTGTCAGAA G AAACCGAAGTTCAGATACAG	186	55 56	G00-455-238
<u>sWSSI174</u>	AFM218xf10	D7S514	Genetinis markeris	AATATCTGACATTGGCAC TTAGACCTGAGAAAAAGAG	144	57 58	G00-307-700
<u>sWSS2061</u>		D7S2184	YAC galas	GTTGCACAATACAAAATCC CTTCCATTAGTGTCTTATAG	200	59 60	G00-455-241

3 lentelė, tęsinys

<u>STS pavadinimas</u>	<u>Kitas pavadinimas</u>	<u>Lokusas</u>	<u>Rūšis</u>	<u>PCR pradmenys</u>	<u>Dydis (bp)</u>	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>GDB ID No.</u>
sWSS2588		D7S2187	YAC galas	ATCACTACACACCTAATC CCAATTCTACATTCCACC	117	61 62	G00-455-253
sWSS808	Pax-4	PAX4	Genas	GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA TTGCCAGGCAAGAGGGCTGGAC	153	63 64	G00-455-259
sWSS1392	AFM206xc1	D7S635	Genetinis markeris	CTCAGGTATGTCTTTATC TGTCTCTGCATTCTTTTC	75	65 66	G00-307-815
sWSS1148	AFM199xh12	D7S504	Genetinis markeris	GACACATACAAACACAAG ATTGAGTTGAGTGTAGTAG	60	67 68	G00-307-652
sWSS1529		D7S1943	YAC galas	CAGGGATTCTTAATTGTC AAAAGATGGAGGCTTTTG	116	69 70	G00-334-119
sWSS2619	OB	OB	Genas	CGTTAAGGGAAGGAACTCTGG TGGCTTAGAGGAGTCAGGGA	106	71 72	G00-455-256
sWSS404		D7S1956	Lambda klonas	ACCAGGGTCAATACAAAG TAATGTGTCTCTCTTGCC	122	73 74	G00-334-251
sWSS2367	AFMa345wc9	D7S1875	Genetinis markeris	CAATCCTGGCTTCATTTG AAGGTGGGTAGGATGCTA	81	75 76	G00-455-250

Išvardinta 19 chromosomai 7-specifinių STS, išdėstytų YAC sankaupoje, turinčioje žmogaus OB geną (fig. 35). Kiekvienu atveju nurodytas sukurtas "sWSS" pavadinimas, atitinkamas kitas pavadinimas, GDB priskirto lokuso pavadinimas, STS šaltinis, PCR pradmenų sekos, STS dydis ir GDB identifikacijos numeris. STS šaltiniai buvo tokie: "YAC" galas (išskirtas YAC intarpo galas) [Green, 1993, *supra*], "Lambda clone" (bet koks chromosomai 7-specifinis lambda klonas) [Green *et al.*, 1991, *supra*; Green, 1993, *supra*], "Genetic marker" (mikrosatelitinis markeris, žr. 2 lentelę) [Green *et al.*, 1994, *supra*], "YAC insert" (bet koks segmentas iš YAC intarpo) ir "Gene" (genui specifinė STS). Atkreipkite dėmesį, kad kai kuriems genetiniams markeriams specifiniai STS PCR pradmenys, panaudoti YAC identifikavimui (duoti šioje lentelėje), skiriasi nuo pradmenų, panaudotų genotipo analizėje (4 lentelė), kadangi genetinį markerį turinčios YAC nustatymui nereikalinga paties polimorfinio trakto amplifikacija. Visuose nurodytuose PCR bandymuose naudota 55°C renatūracijos temperatūra, išskyrus sWSS494, sWSS883, sWSS1529 ir sWSS2619 (kuriems naudota 50°C temperatūra), sWSS999 ir sWSS1174 (kuriems naudota 60°C temperatūra) ir sWSS808 (kuriam naudota 65°C temperatūra). Papildomas detales apie STS specifinius PCR bandymus galima gauti GDB.

4 lentelė

Mikrosatelitiniai markeriai YAC sankaupoje, turinčioje žmogaus *ob* gena.

<u>Markerio pavadinimas</u>	<u>Tipas</u>	<u>Lokusas</u>	<u>Pradmenys</u>	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>GDB ID No.</u>
UT528	Tetra.	D7S1498	TGCAGTAAGCTGTGATTTGAG GTGCAGCTTTAAATTGTGAGC	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 AGATGCTGAATTCCCAGACA	83 84	G00-200-283
AFM218xf10	(CA) _n	D7S514	TGGGCAACACAGCAAA TGCAGTTAGTGCCCAATGTCA	85 86	G00-188-404
AFM206xc1	(CA) _n	D7S635	CCAGGCCATGTGGAAC AGTTCTTGGCTTGGTCAGT	87 88	G00-199-240
AFM199xh12	(CA) _n	D7S504	TCTGATTGCTGGCTGC GCGCGTGTGTATGTGAG	89 90	G00-188-280
AFMa345wc9	(CA) _n	D7S1875	AGCTCTTGGCAAACACACAT GCCTAAGGGAATGAGACACA	91 92	G00-437-259

Išvardinti 8 mikrosatelitiniai markeriai, kurių vietos nustatytos YAC sandraupoje, turinčioje žmogaus OB geną (fig. 35). Kiekvienu atveju nurodytas markerio pavadinimas (3 lentelėje duotas kaip kitas pavadinimas), mikrosatelitinio motyvo tipas (tetranukleotidas - "tetra" pasikartojimas arba $(CN)_n$ pasikartojimas, GDB - priskirto lokuso pavadinimas, pradmenų sekos, naudojamos PCR paremtoje genotipo analizėje ir GDB identifikacijos numeris. Papildomas detales apie PCR analizę ir polimorfizmą galima gauti GDB.

Žmogaus OB specifinė STS (sWSS2619) buvo sukonstruota, naudojant DNR seką, gautą iš kDNR 3' netransliuotos srities. Žmogaus *Pax4*-specifinė STS (sWSS808) buvo gauta, naudojant tokią strategiją: oligonukleotidiniai pradmenys, būdingi pelės *Pax4* genui (GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA) (SEQ ID NO:63) ir (GGGAGCCTTGTCCTGGGTACAAAG) (SEQ ID NO:93) [Walther *et al.*, 1991, *Genomics* 11:424-434 (1991)], panaudoti 204 bp fragmento iš žmogaus genomines DNR (kuri buvo to paties dydžio produktas, kaip ir gautos iš pelės genomines DNR) amplifikacijai. Šis PCR bandymas netiko atitinkamų YAC identifikavimui, nes mielių DNR taip pat amplifikuoja panašaus dydžio produktą (200 bp). Tačiau PCR produkto, generuoto iš žmogaus DNR, sekos analizė parodė, kad 20-je vietų iš 156 bazių yra pakitimai (duomenys neparodyti). Naudojant šią žmogui būdingą seką, sukurtas naujas pradmuo (TTGCCAGGCAAAGAG GGCTGGAC) (SEQ ID NO:64) ir panaudotas su pirmuoju iš aukščiau minėtų pelės *Pax4*-specifiniu pradmeniu (žr. 3 lentelėje). Šiame žmogaus *Pax4*-specifiniame PCR bandyme nebuvo žymios produkto iš mielių DNR amplifikacijos, ir todėl šis bandymas panaudotas atitinkamų YAC identifikavimui.

YAC identifikavimas, panaudojant PCR paremtą skryningą

Dauguma fig 35 pavaizduotų YAC buvo išvesta iš klonų labai praturtintų žmogaus chromosomos 7 DNR ("chromosomos 7 YAC šaltinis") rinkinio [Green *et al.*, 1995, *supra*], naudojant PCR paremtą skryningo strategiją [Green *et al.*, 1995, *supra*; Green *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1213-1217 (1990)]. Kai kuriais atvejais klonai buvo išskirti, panaudojant prieinamos bendros žmogaus genomines YAC bibliotekos, kurią sukūrė CEPH [Dausset *et al.*, *Behring Inst. Mitt.*, 91:13-20 (1992); Albertsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4256-4260 (1990)] arba ICI [Anand *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:3425-3433 (1989); Anand *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:1951-1956 (1990)], PCR paremtą skryningą [Green *et al.*,

1990, *supra*]. Kiekviena YAC pavadinta, naudojant priešdėlį “yWSS”, po kurio duodamas būdingas skaičius.

Rezultatai ir aptarimas

Žmogaus OB geno ekspresijos audiniuose tyrimas, panaudojant northerno blotingą, parodė, kad didelis kiekis OB RNR yra ekspresuojamas žmogaus adipoziniame audinyje ir daug mažesni kiekiai - placentoje ir širdyje (fig. 34). RNR dydis (apie 4,5 kb) yra vienodas žmonių ir pelių atveju, o taip pat jis vienodas ir visuose ekspresuojančiuose audiniuose. Pagal šių tyrimų duomenis, penkis kartus didesni signalai matomi 10-je μg bendros adipozinio audinio RNR, kaip 2-se μg poli A⁺ placentinės RNR. Penkis kartus mažesnis signalas matomas širdies poli A⁺ RNR, lyginant su placentos. Nustatyta, kad OB RNR kiekis placentoje yra apie 250 kartų mažesnis nei adipoziniame audinyje. Šiame eksperimente nerasta OB RNR nė viename iš kitų analizuotų audinių, įskaitant smegenis, plaučius, kepenis, skeletinius raumenis, inkstus ir kasą. Papildomi eksperimentai neparodė OB RNR buvimo blužnyje, užkrūčio liaukoje, prostatoje, sėklidėse, gimdoje, plonosiose žarnose, storioje žarnoje, periferinio kraujo limfocituose arba fetalinėse smegenyse, kepenyse arba inkstuose (duomenys neparodyti). Gali būti, kad pastaruosiuose audiniuose OB ekspresuojamas nenustatomais kiekiais (pagal northerno blotingą) arba ekspresuojamas kituose netyrinėtuose audiniuose. Stebėtas ekspresijos žmoguje vaizdas šiek tiek skiriasi nuo pelės, kurios atveju OB RNR nustatyta beveik išimtinai tik adipoziniame audinyje.

Palyginamasis OB geno sritys vietos nustatymas pelės ir žmogaus genomuose

Pelės OB genas yra 6 chromosomoje - srityje, kuri yra homologinė žmogaus 7q chromosomos daliai. Šiame segmente esantys genai yra (nuo artimiausio iki tolimiausio): *Met* protoonkogenas, cistinės fibrozės transmembraninio laidumo reguliatorius (*Cfr*), porinis box-turintis genas 4 (*Pax4*), OB ir karboksiptidazė A (*Cpa*) [Zhang *et al.*, 1994, *supra*; Friedman *et al.*, 1991, *supra*]. Pelės atveju genetinio žemėlapijo nustatymas, panaudotas parodymui, kad *Pax4* yra tvirtai prijungtas prie *ob* [Walther *et al.*, 1991, *supra*; Zhang *et al.*, 1994, *supra*]. Rasta, kad fizikinis atstumas tarp OB ir *Pax4* yra apie viena megabazių pora (Mb) [Zhang *et al.*, 1994, *supra*]. Remiantis šiais palyginamaisiais žemėlapių tyrimais, buvo laukiama, kad žmogaus OB genas turėtų būti tarp *Pax4* ir *CPA* 7q chromosomoje. Be to, kadangi žmogaus

CFTR [Heng *et al.*, *Cell. Genet.*, 62:108-109 (1993)] ir *Pax4* [Tamura *et al.*, *Cytogenet. Cell Genet.*, 66:132-134 (1994)] vietos buvo nustatytos, panaudojant fluorescentinę *in situ* hibridizaciją (FISH) su atitinkamai 7q31.3 ir 7q32, labiausiai patikima žmogaus OB geno padėtis turėtų būti arti 7q31.3-q32 ribos.

OB geno padėties nustatymas žmogaus 7 chromosomoje.

YAC klonų kolekcijos, kuri labai praturtinta žmogaus 7 chromosomos DNR, skyrinui panaudota STS (sWSS2619), amplifikuojanti mažą žmogaus OB geno 3' netransliuotos srities segmentą [Green *et al.*, 1995a, *Genomics* 25:170-183] ir nustatyti 9 YAC (yWSS691, yWSS1332, yWSS1998, yWSS2087, yWSS3319, yWSS3512, yWSS4875, yWSS4970 ir yWSS5004). Norint patikrinti, ar šios YAC turi autenišką žmogaus OB geną, atlikti dar du eksperimentai. Pirmiausia, kiekviena YAC patikrinta antruoju žmogaus OB-specifiniu PCR bandymu, ir rasta, kad visi bandymai yra teigiami (duomenys neparodyti). Antra, kiekvieno klonu mielių DNR skaldyta *EcoRI* ir analizuota gelio pernešimo hibridizacijos būdu, naudojant žmogaus OB kDNR išvestą zondą. Visais atvejais matoma tik viena hibridizacijos juostelė, ir ši juostelė yra to paties dydžio ir YAC, ir P1 klone, kuris, kaip yra žinoma, turi žmogaus OB geną (duomenys neparodyti).

Naudojant kompiuterinę programą SEGMAP [Green and Green, 1991, *supra*] ir kitus YAC paremtus STS sumarinius duomenis, kuriuos mes gavome 7 chromosomos atveju [Green *et al.*, 1991, *supra*; Green *et al.*, 1994, *supra*; Green *et al.*, 1995, *supra*], buvo rasta, kad žmogaus OB genas yra YAC sandaupoje, pavaizduotoje fig 35. Tiksliau sakant, ši sandaupa susideda iš 43 persiklojančių YAC ir 19 vienodai išdėstytų STS. Smulkesnė informacija apie kiekvieną iš 19 STS duota 3 lentelėje. Apart OB-specifinių STS, sandaupoje taip pat yra STS (sWSS808), būdinga žmogaus *Pax4* genui [Tamura *et al.*, 1994, *supra*; Stapleton *et al.*, 1993, *Nature Genet.* 3:292-298]. 7 STS, išvestos iš 7 chromosomai būdingų YAC, 2 STS, išvestos iš 7 chromosomai būdingų lambda klonų ir, kas ypač svarbu, 8 mikrosatelitams būdingų STS. Papildoma informacija apie šiuos 8 genetinius markerius, įskaitant pradmenų, panaudotų genotipo analizėje, sekas, duota 2 lentelėje. Atkreipkite dėmesį, kad sandaupoje yra perteklinis YAC-paremtas sujungimas (t.y. yra 2 arba daugiau YAC, jungiančių kiekvieną gretimą STS porą), kas labai paremia fig 35 parodytą santykinę STS eilę.

Kaip parodyta fig 35, numatyta žmogaus OB turinčio YAC sankaupos orientacija yra tokia, kad sWSS1734 yra labiausiai centromerinė STS (t.y. artimiausia CFTR), o sWSS2367 yra labiausiai telomerinė STS (t.y. artimiausia CPA). Ši orientacija daugiausiai paremta palyginamaisiais žemėlapių sudarymo duomenimis, kuriame Pax4 patalpinamas artimiausioje padėtyje, o OB tolimiausioje padėtyje sintetinio bloko, esančio žmogaus DNR, viduje [Zhang et al., 1994, supra]. OB genas patenka prie sankaupos telomerinio galo, remiantis OB būdingos STS (sWSS2619) patalpinimu.

Kadangi fig. 35 parodyta sankaupa buvo išvesta SEGMAP būdu, neatsižvelgiant į YAC dydžius (taigi išdėstant STS vienodu atstumu vienas nuo kito), panaši duomenų analizė SEGMAP būdu, kurioje įskaitomi YAC dydžiai, parodė, kad srities, kurią apima sankaupa, visas dydis yra daugiau nei 2 Mb (duomenys neparodyti). Taigi, kadangi visos 8 mikrosatelitams būdingos STS (4 lentelė) yra genominiame intervale, kuris tęsiasi apie 2 Mb, trys artimiausios prie sankaupos telomerinio galo (sWSS1392, sWSS1148 ir sWSS2367) yra ypatingai arti prie paties OB geno (tikriausiai tik apie 500 kb intervalo ribose). Faktiškai visos 3 pastarosios STS yra mažiausiai viename žmogaus OB turinčiame YAC. Atkreipkite dėmesį, kad yra nustatyta, kad tarpas tarp žmogaus *Pax4* (sWSS808) ir *ob* (sWSS2619) yra apie 400 kb, tuo tarpu kai pelės atveju manoma, kad ši sritis tęsiasi apie 1 Mb [Zhang et al., 1994, supra]. Be to, 3 iš YAC sankaupoje (yWSS691, yWSS999 ir yWSS2935) taip pat buvo analizuoti FISH metodu, ir rasta, kad kiekvienas iš jų hibridizuojasi tik su 7q31.3. Viena iš šių YAC (yWSS691) turi OB būdingą STS, o kiti du klonai turi *Pax4* būdingą STS. Pastarieji rezultatai, bendrai imant, sutampa su ankstesniu citogenetiniu žmogaus *Pax4* priskyrimu 7q32 [Tamura et al., 1994, supra]. Remiantis šiais duomenimis, žmogaus OB genas gali būti priskirtas 7q31.3 citogenetiniam ruožui.

11 PAVYZDYS: Žmogaus OB polipeptidas yra biologiškai aktyvus pelėse

Grupėms po 10 ob/ob pelių į pilvą leidžiama 10 µg/g/per dieną rekombinantinio (bakterinio) žmogaus ir pelės OB polipeptido arba fiziologinio tirpalo. Po 4 dienų, grupė, gavusi fiziologinį tirpalą, priaugo 0,3 g. Grupė, gavusi pelės OB, prarado 3,2 g. Grupė, gavusi žmogaus OB, prarado 2 g ($p < 0,01$ lyginant su fiziologinio tirpalo kontrole). Tirtas šių grupių

maisto suvartojimas. Maisto suvartojimo duomenys parodyti 5 lentelėje; kūno masės duomenys parodyti 6 lentelėje.

5 lentelė

Apdorotų ob/ob pelių maisto suvartojimas g/per dieną (vertė $\pm$ standartinis nukrypimas)

Apdorojimas	0 diena	1 diena	2 diena	3 diena	4 diena	5 diena	6 diena	7 diena
Fiziologinis tirpalas	13,4 $\pm$ 2,6	12,8	12,8	13,1	14,0	12,3	12,4	8,3
Pelės OB	14,9	3,7	4,4	5,1	8,9	8,1	8,7	3,5
Žmogaus OB	14,3	10,3	8,7	7,0	8,9	5,3	3,8	13,0

6 lentelė

Apdorotų ob/ob pelių kūno svoris ir svorio pokytis (vertė $\pm$ standartinis nukrypimas)

Apdorojimas	Kūno svoris (0 diena)	Kūno svoris (4 diena)	Procentinis pokytis (0-4 dienos)	Kūno svoris (6 diena)	Procentinis pokytis (0-6 dienos)
Fiziologinis tirpalas	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
pelės 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
žmogaus 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

Šie duomenys rodo, kad žmogaus OB yra biologiškai aktyvus pelėse.

12 PAVYZDYS: Didelės OB dozės veikia laukinio tipo peles

Laukinio tipo pelėms (C57B16J +/-) daromos 10 μ g/g/per dieną rekombinantinio pelės OB i.p. injekcijos, ir kas keturios dienos matuojama kūno masė. Rezultatai parodyti 7 lentelėje.

7 lentelė

Normalių pelių, gaunančių OB, kūno masė (g)

Poveikis	0 diena	4 diena	8 diena	12 diena	16 diena
Fiziologinis tirpalas	22,6 $\pm$ 1,4	22,2 $\pm$ 1,2	22,5 $\pm$ 1,3	23	22,5
Pelės OB	22,4 $\pm$ 1,5	20,6 $\pm$ 1,5	20,8 $\pm$ 1,3	20,8	21,8

Šie duomenys rodo, kad OB veikia laukinio tipo pelių svorį taip pat kaip ir nutukusių (ob/ob) pelių, tik daug mažesniu laipsniu.

13 PAVYZDYS: OB polipeptidas vartojamas nepertraukiamos siurblio infuzijos būdu

Šis pavyzdys rodo, kad nepertraukiama OB polipeptido infuzija sukelia normalių pelių svorio sumažėjimą. Normalioms (nenutukusioms) pelėms duodamas pelės ob polipeptidas, panaudojant osmotinį siurblį. 0,5 mg baltymo/kg kūno svorio/per dieną dozė sukėlė 4,62% sumažėjimą (+/-1,34%) skaičiuojant nuo bazinės svorio linijos 6-tą infuzijos dieną.

Medžiagos ir metodai

Gyvuliukai

Šiame pavyzdyje naudotos laukinio tipo (+/+) C57B16 pelės. Pelės apgyvendinamos po vieną ir laikomos žmoniškomis sąlygomis. Pradiniu laiko momentu gyvuliukai buvo 8 savaičių amžiaus, o jų svoris buvo stabilizuotas. Kiekvienam atvejui imama po 10 pelių (tirpiklio palyginimas su baltymu).

Šėrimas ir svorio matavimas

Pelėms duodamas sumaltas graužikų maistas (PMI Feeds Inc.) miltelių tipo žindamuose indeliuose (Allentown Caging and Equipment), kurie leidžia tiksliau ir jautriau išmatuoti maisto suvartojimą, nei naudojant paprastą blokinį maistą. Svoris matuojamas tuo pačiu laiku kiekvieną dieną (2:00 po pietų) 6 dienas. Kūno svoris prieš infuziją priimamas kaip bazinės linijos svoris.

Pelės OB DNR klonavimas

Pelės OB DNR klonavimas *E.coli* ekspresijai atliktas taip. DNR seka, išvesta iš aprašyto peptido sekos [Zhang *et al.*, 1994, *supra*, pvz., 1 pavyzdys, *supra*] atvirkščiai transliuota, naudojant *E.coli* optimalius kodonus. Galinės kodavimo vietos buvo *Xba*I iki *Bam*HI. Prieš kodavimo sritį įvesta ribosominis surišimo stiprintuvas ir stipri ribosominė surišimo vieta. Dviguba DNR seka sintezuota naudojant standartines metodikas. Teisingi

klonai patvirtinti, parodant rekombinantinio baltymo ekspresiją ir OB DNR sekos teisingumą turimoje plazmidėje. Aminorūgščių seka (ir DNR seka) yra tokia:

Rekombinantinės pelės Met OB (dviejų grandinių) DNR ir aminorūgščių seka (SEQ. ID. NOS:94 ir 95):

```

TCTAGATTTGAGTTTTAACTTTTAGAAGGAGGAATAACATATGGTACCGATCCAGAAAGT
9-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----68
AGATCTAAACTCAAATTGAAATCTTCCTCCTTATTGTATACCATGGCTAGGTCTTTCA
                                     M V P I Q K V -
TCAGGACGACACCAAAACCTTAATTAACGATCGTTACGCGTATCAACGACATCAGTCA
69-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----28
AGTCCTGCTGTGGTTTTGGAATTAATTTTGCTAGCAATGCGCATAGTTGCTGTAGTCAGT
Q D D T K T L I K T I V T R I N D I S H -
CACCCAGTCGGTCTCCGCTAAACAGCGTGTTACCGGTCTGGACTTCATCCCGGGTCTGCA
129-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----188
GTGGGTCAGCCAGAGGCGATTTGTGCGACAATGGCCAGACCTGAAGTAGGGCCAGACGT
T Q S V S A K Q R V T G L D F I P G L H -
CCCGATCCTAAGCTTGTCCAAATGGACCAGACCCTGGCTGTATACCAGCAGGTGTTAAC
189-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----248
GGGCTAGGATTTCGAACAGGTTTTACCTGGTCTGGGACCGACATATGGTCGTCCACAATTG
P I L S L S K M D Q T L A V Y Q Q V L T -
CTCCCTGCCGTCCCAGAACGTTCTTCAGATCGCTAACGACCTCGAGAACCTTCGCGACCT
249-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----308
GAGGGACGGCAGGGTCTTGCAAGAAGTCTAGCGATTGCTGGAGCTCTTGGAAGCGCTGGA
S L P S Q N V L Q I A N D L E N L R D L -
GCTGCACCTGCTGGCATTCTCCAAATCCTGCTCCCTGAAGCAGACCTCAGGTCTTCAGAA
309-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----368
CGACGTGGACGACCGTAAGAGGTTTAGGACGAGGGACGGCGTCTGGAGTCCAGAAGTCTT
L H L L A F S K S C S L P Q T S G L Q K -
ACCGGAATCCCTGGACGGGGTCCTGGAAGCATCCCTGTACAGCACCGAAGTTGTTGCTCT
369-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----428
TGGCCTTAGGGACCTGCCCCAGGACCTTCGTAGGGACATGTCGTGGCTTCAACAACGAGA
P E S L D G V L E A S L Y S T E V V A L -
GTCCCGTCTGCAGGGTTCCCTTCAGGACATCCTTCAGCAGCTGGACGTTTCTCCGGAATG
429-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----488
CAGGGCAGACGTCCCAAGGGAAGTCCTGTAGGAAGTCGTGACCTGCAAAGAGGCCTTAC
S R L Q G S L Q D I L Q Q L D V S P E C -
TTAATGGATCC
489 -+-----
AATTACCTAGG

```

Ekspresijos vektorius ir šeimininko kamienas

Baltymui gauti vartotas plazmidinis ekspresijos vektorius buvo pCFM1656, American Type Culture Collection (ATCC) depozito Nr. 69576. Aukščiau minėta DNR liguota į ekspresijos vektorių pCFM1656, kuris buvo linearizuotas *Xba*I ir *Bam*HI, ir transformuota į *E.coli* šeimininko kamieną FM5. *E.coli* FM5 ląstelės išvestos Amgen Inc., Thousand Oaks, Ca iš *E.coli* K-12 kamieno [Bachmann *et al.*, *Bacteriol. Rev.*, 40:116-167 (1976)] ir turi integruotą lambda fago represorinį geną *cI₈₅₇* [Sussman *et al.*, *C.R. Acad. Sci.*, 254:1517-1579 (1962)]. Vektoriaus gavimas, ląstelės transformacija ir kolonijos atranka atlikta standartiniais metodais, pvz., Sambrook *et al.*, 1989, *supra*. Šeimininko ląstelės augintos LB terpėje.

Baltymo arba tirpiklio vartojimo būdas

Šiuose eksperimentuose panaudotas rekombinantinis pelės OB polipeptidas, kurio koncentracijos buvo apie 0,9 mg/ml fosfatinio buferio ir NaCl tirpale, pH 7,4. Panaudota aminorūgščių seka (ir DNR seka) parodytos aukščiau. Baltymas arba tirpiklis (fosfatinio buferio ir NaCl tirpalas, pH 7,4) įvedami, panaudojant infuziją osmotiniu siurbliu. Alzet osmotiniai minisiurbliai (Alza, Palo Alto, CA, modelio Nr. 1007D) chirurginiu būdu įvedami į kiekvienos pelės subkutaninę kišenę po mente. Siurbliai sukalibruoti taip, kad būtų įvedama 0,5 ml baltymo tirpalo per valandą, susidarant 0,5 mg baltymo/kg kūno svorio/per dieną. Kontroliniams gyvuliukams fosfatinio buferio ir NaCl tirpalas (pH 7,4) įvedamas Alzet osmotiniu minisiurbliu.

Fermentacijos procesas. Baltymui gauti panaudota trijų fazių fermentacijos metodika, žinoma kaip “serijinio maitinimo” procesas. Terpių sudėtys duotos žemiau.

Serija. Azoto ir fosfato šaltinis sterilizuotas (keliant temperatūrą iki 122°C 35 minutes, 18-20 psi slėgyje) fermentacijos inde (Biolafitte, 12 litrų talpos). Atšaldžius, aseptinėmis sąlygomis įvedami anglies, magnio, vitaminų ir mikroelementų šaltiniai. 500 ml per naktį (16 h arba daugiau) išlaikytos aukščiau minėtos rekombinantinių pelės baltymą gaminančios bakterijų kultūros (išaugintos LB buljone) supilama į fermentatorių.

I maistas. Pasiekus optinį tankį OD₆₀₀ lygų 4,0-6,0, į kultūras pridedama I maisto. Augimo greičiui (μ) kontroliuoti ribotu greičiu dedama gliukozė. Augimo greičiui, kuris turi būti 0,15

generacijų/h, kontroliuoti naudojama programuojama automatinė sistema (vadinama Distributive Control System).

II maistas. Kai OD pasiekia 30, temperatūra lėtai keliama iki 42°C ir maistas pakeičiamas II maistu, kuris aprašytas žemiau. Tada fermentuojama toliau dar 10 h, kas 2 h surenkant mėginius. Po 10 valandų fermentatoriaus turinys atšaldomas žemiau 20°C ir centrifuguojama.

Terpių sudėtis:

Serija	10 g/l	Mielių ekstrakto
	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	Gliukozės
	1,0 g/l	MgSO ₄ •7H ₂ O
	2,0 ml/l	Vitamins tirpalo
	2,0 ml/l	Mikroelementų tirpalo
	1,0 ml/l	P2000 Antifoam
I maistas	50 g/l	Baktotriptono
	50 g/l	Mielių ekstrakto
	450 g/l	Gliukozės
	8,75 g/l	MgSO ₄ •7H ₂ O
	10 ml/l	Vitaminų tirpalo
	10 ml/l	Mikroelementų tirpalo
II maistas	200 g/l	Baktotriptono
	100 g/l	Mielių ekstrakto
	110 g/l	Gliukozės

Vitaminų tirpalas (Serija, I maistas): 0,5 g biotino, 0,4 g folinės rūgšties ir 4,2 g riboflavino ištirpinama 450 ml H₂O ir 3 ml 10 N NaOH ir supilama į 500 ml H₂O. 14 g piridoksino-HCl ir 61 g niacino ištirpinama 150 ml H₂O ir 50 ml 10 N NaOH ir supilama į

250 ml H₂O. 54 g pantotėninės rūgšties ištirpinama 200 ml H₂O ir supilama į 250 ml. Visi trys tirpalai sumaišomi ir praskiedžiama iki 10 litrų tūrio.

Mikroelementų tirpalas (Serija, I maistas):

Geležies(III) chloridas (FeCl₃•6H₂O): 27 g/l

Cinko chloridas (ZnCl₂•4H₂O): 2 g/l

Kobalto chloridas (CoCl₂•6H₂O): 2 g/l

Natrio molibdatas (NaMoO₄•2H₂O): 2 g/l

Kalcio chloridas (CaCl₂•2H₂O): 1 g/l

Vario sulfatas (CuSO₄•5H₂O): 1,9 g/l

Boro rūgštis (H₃BO₃): 0,5 g/l

Mangano chloridas (MnCl₂•4H₂O): 1,6 g/l

Natrio citrato dihidratas: 73,5 g/l

Pelės OB polipeptido valymo būdas

Valymas atliekamas pagal tokias stadijas (jei kitaip nenurodyta, šios stadijos atliktos 4°C temperatūroje):

1. Ląstelių pasta. *E.coli* ląstelių pasta suspenduota 5 kartus didesniame 7 mM EDTA, pH 7,0, tūryje. EDTA tirpale esančios ląstelės toliau skaldytos, du kartus praleidžiant pro mikroskystintuvą. Suskaldytos ląstelės centrifuguojamos esant 4,2k aps/min 1 h Beckman JB-6 centrifugoje su J5-4.2 rotoriumi.

2. Inkliūzijos kūnelių plovimas #1. Aukščiau minėto centrifugavimo nuopilas pašalintas, o nuosėdos resuspenduotos 5 kartus didesniame 7 mM EDTA, pH 7,0, tirpalo tūryje ir homogenizuotos. Mišinys centrifuguojamas taip, kaip aprašyta 1 stadijoje.

3. Inkliūzijos kūnelių plovimas #2. Nuopilas nuo aukščiau minėto centrifugavimo pašalinamas, o nuosėdos resuspenduojamos 10 kartų didesniame 20 mM Tris, pH 8,5, 10 mM DTT ir 1% deoksicholato tirpalo tūryje ir homogenizuojamos. Šis mišinys centrifuguojamas taip, kaip aprašyta 1 stadijoje.

4. Inkliūzijos kūnelių plovimas #3. Nuopilas po aukščiau minėto centrifugavimo pašalinamas, o nuosėdos resuspenduojamos 10 kartų didesniame distiliuoto vandens tūryje ir homogenizuojamos. Šis mišinys centrifuguojamas taip, kaip aprašyta 1 stadijoje.

5. Renatūravimas. Nuosėdos renatūruojamos 15 kartų didesniame 10 mM HEPES, pH 8,5, 1% natrio sarkozino (N-laurilsarkozino) tirpalo tūryje, kambario temperatūroje. Po 60 minučių į tirpalą pridedama vario sulfato iki 60 mM ir maišoma per naktį.

6. Sarkozino pašalinimas. Renatūruotas mišinys praskiedžiamas 5 tūriais 10 mM Tris buferio, pH 7,5, ir centrifuguojamas taip, kaip aprašyta 1 stadijoje. Nuopilas surenkamas ir maišomas maišikliu 1 valandą su 20-50 mešų Dowex 1-X4 dervos chlorido forma (0,006% bendro praskiesto renatūruoto mišinio tūrio). Šis mišinys supilamas į kolonėlę ir surenkamas išbėgęs skystis. HPLC metodu patikrinamas sarkozino pašalinimas.

7. Nusodinimas rūgštimi. Ankstesnės stadijos išbėgęs skystis surenkamas, parūgštinama iki pH 5,5 ir laikoma kambario temperatūroje 30 min. Šis mišinys centrifuguojamas taip, kaip aprašyta 1 stadijoje.

8. Katijonų mainų chromatografija. Ankstesnės stadijos nuopilas parūgštinamas iki pH 4,2 ir supilamas ant CM Sepharose Fast Flow. Naudojamas 20 kolonėlės tūrių druskos gradientas, esant 20 mM NaOAc, pH 4,2, 0-1,0 M NaCl.

9. HIC chromatografija. Į sumaišytos ankstesnės stadijos CM sefarozės pikų frakcijas (nustatyta pagal UV analizės duomenis) pridedama amonio sulfato iki 0,2 M. Panaudojamas 20 kolonėlės tūrių atvirkščias druskų gradientas, esant 5 mM NaOAc, pH 4,2, 0,4-0 M amonio sulfato. Ši medžiaga koncentruojama ir diafiltruojama į PBS.

Rezultatai

Žemiau duodami C57B16J pelių (8 savaičių amžiaus) procentiniai (%) svorio skirtumai, lyginant su bazine linija.:

8 lentelė

Svorio mažėjimas, esant nepertraukiamai infuzijai

<u>Laikas (dienos)</u>	<u>Tirpiklis (PBS)</u>	<u>Rekombinantinis OB polipeptidas</u>
1-2 dienos	3,24 ± 1,13	1,68 ± 1,4
3-4 dienos	4,3 ± 0,97	-2,12 ± 0,79
5-6 dienos	4,64 ± 0,96	-4,62 ± 1,3

Kaip matyti iš lentelės, po 6 dienų nepertraukiamos infuzijos, gyvuliukų, gavusių OB polipeptidą, kūno svoris sumažėjo daugiau nei 4%, lyginant su bazine linija. Tai yra daug greitesnis svorio mažėjimas, lyginant su mažėjimu, esant intraperitoninėms (i.p.) injekcijoms. Laukinio tipo (normalių) pelių, gavusių rekombinantinio OB polipeptido 10 mg/kg dozės i.p. injekcijas, svorio sumažėjimas po 32 dienų injekcijų laikotarpio buvo tik 2,6-3,0% ir nebuvo didesnis nei 4% bet kuriuo metu per dozavimo laikotarpį (duomenys neparodyti). Šie duomenys rodo, kad esant nepertraukiamai infuzijai, 20 kartų mažesnė dozė (0,5 mg/kg lyginant su 10 mg/kg) duoda didesnę svorio sumažėjimą per trumpesnę laikotarpį.

Pateikti rezultatai yra statistiškai reikšmingi, pvz., -4,62% su $p < 0,0001$.

14 PAVYZDYS: Rekombinantinio žmogaus OB polipeptido klonavimas ir ekspresija

Šiame pavyzdyje duodamos rekombinantinio žmogaus versijos OB polipeptido analogo gavimo metodai ir kompozicijos.

Žmogaus versijos OB DNR sukonstruota iš pelės OB DNR taip, kaip aprašyta aukščiau duotame 13 pavyzdyje, pakeičiant sritį tarp *MluI* ir *BamHI* vietų dvigrandinine DNR (padaryta iš sintetinių oligonukleotidų), kurioje buvo sukonstruota 20 kodonų. Pelės 35 subrendusios padėties arginino ir pelės subrendusios 74 padėties leucino kodonai buvo nepakeisti. *MluI* vieta parodyta po ištisine linija žemiau duodamoje sekoje. Ši DNR perkelta į pCFM 1656 vektorių (ATCC, depozito Nr. 69576) tokiu pačiu būdu, kaip ir rekombinantinio pelės baltymo atveju, kaip aprašyta aukščiau.

Rekombinantinės žmogaus met OB (dvigrandės) DNR ir aminorūgščių sekos (SEQ ID NOS: 96 ir 97)

```

CATATGGTACCGATCCAGAAAGTTCAGGACGACACCAAAACCTTAATTTAAACGATCGTT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GTATACCATGGCTAGGTCTTTCAAGTCCTGCTGTGGTTTTGGAATTAATTTTGCTAGCAA
    M  V  P  I  Q  K  V  Q  D  D  T  K  T  L  I  K  T  I  V  -
ACGCGTATCAACGACATCAGTCACACCCAGTCGGTGAGCTCTAAACAGCGTGTTACAGGC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+120
TGCGCATAGTTGCTGTAGTCAGTGTGGGTCAGCCACTCGAGATTTGTCGCACAATGTCCG
    T  R  I  N  D  I  S  H  T  Q  S  V  S  S  K  Q  R  V  T  G  -
CTGGACTTCATCCCGGGTCTGCACCCGATCCTGACCTTGTCCTAAATGGACCAGACCCTG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+180

```



```

GACCTGAAGTAGGGCCCAGACGTGGGCTAGGACTGGAACAGGTTTTACCTGGTCTGGGAC
L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L -
GCTGTATACCAGCAGATCTTAACCTCCATGCCGTCCCGTAACGTTCTTCAGATCTCTAAC
181-----+-----+-----+-----+-----+240
CGACATATGGTCGTCTAGAATTGGAGGTACGGCAGGGCATTGCAAGAAGTCTAGAGATTG
A V Y Q Q I L T S M P S R N V L Q I S N -
GACCTCGAGAACCTTCGCGACCTGCTGCACGTGCTGGCATTCTCCAAATCCTGCCACCTG
241-----+-----+-----+-----+-----+300
CTGGAGCTCTTGGAAGCGCTGGACGACGTGCACGACCGTAAGAGGTTTAGGACGGTGGAC
D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L -
CCATGGGCTTCAGGTCTTGAGACTCTGGACTCTCTGGGCGGGGTCCTGGAAGCATCCGGT
301-----+-----+-----+-----+-----+360
GGTACCCGAAGTCCAGAACTCTGAGACCTGAGAGACCCGCCCCAGGACCTTCGTAGGCCA
P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G -
TACAGCACCGAAGTTGTTGCTCTGTCCCGTCTGCAGGGTTCCCTTCAGGACATGCTTTGG
361-----+-----+-----+-----+-----+420
ATGTCGTGGCTTCAACAACGAGACAGGGCAGACGTCCCAAGGGAAGTCCTGTACGAAACC
Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W -
CAGCTGGACCTGTCTCCGGGTTGTTAATGGATCC
421-----+-----+-----+-----+----- 454
GTGACCTGGACAGAGGCCCAACAATTACCTAGG
Q L D L S P G C *

```

Fermentacija

Aukščiau minėto šeimininko ląstelių fermentacija, norint gauti rekombinantinį žmogaus OB polipeptidą, atlikta aukščiau aprašytomis rekombinantinės pelės OB medžiagos gavimo sąlygomis. Analizuota ir koreliuota rekombinantinės žmogaus OB medžiagos (ir nedidelių bakterinio baltymo kiekių) išeiga (gramais litrui) ir pradinis valymas, tiriant bakterinę ekspresiją:

9 lentelė

Žmogaus OB polipeptido ekspresijos analizė

Laikas	OD (@600 nm)	Išeiga (g/L)	Ekspresija (mg/OD•l)
Ind. + 2 h	47	1,91	41
Ind. + 4 h	79	9,48	120
Ind. + 6 h	95	13,01	137
Ind. + 8 h	94	13,24	141

Ind. + 10 h	98	14,65	149
-------------	----	-------	-----

Sutrumpinimai: Ind. + _ h reiškia valandas po baltymo ekspresijos indukcijos, kaip aprašyta 13 pavyzdyje rekombinantinės pelės medžiagos ekspresijos atveju, naudojant pCFM 1656.

O.D.: optinis tankis, išmatuotas spektrofotometru miligramai O.D. vienetui litrai

mg/O.D•l: ekspresija mg baltymo O.D. vienetui litrai.

Rekombinantinio žmogaus OB polipeptido valymas

Rekombinantinis žmogaus baltymas gali būti valomas, panaudojant metodus, panašius į tuos, kurie buvo naudoti rekombinantinio pelės baltymo valymui, kaip aprašyta aukščiau duotame 13 pavyzdyje. Rekombinantinio žmogaus OB polipeptido gavimui 8 stadija buvo atlikta, parūgštinant 7 stadijos nuopilą iki pH 5,0 ir užpilant jį ant CM sefarozės greito srauto kolonėlės. 20 kolonėlės tūrių druskos gradientas realizuotas esant 20 mM NaOAc, pH 5,5, 0-0,5 M NaCl. 9 stadijoje skiedžiamas iš CM sefarozės kolonėlės išbėgęs skystis 4 tūriais vandens, ir nustatomas pH=7,5. Į šį mišinį dedama amonio sulfato iki 0,7 M. Panaudojamas 20 kolonėlės tūrių atvirkščias druskos gradientas, esant 5 mM NaOAc, pH 5,5, 0,2-0 M amonio sulfato. Pirmosios stadijos buvo identiškos.

15 PAVYZDYS: Dozės-atsako tyrimai

Papildomas tyrimas parodė, kad yra nuo dozės priklausantis atsakas į nepertraukiamą OB baltymo įvedimą. Šiame tyrime laukinio tipo pelėms (nenutukusios, CD-1 pelės, sveriančios 35-40 g) įvedamas rekombinantinis pelės OB baltymas, naudojant panašius į 12 ir 13 pavyzdžiuose aprašytus metodus. Rezultatai buvo tokie (kūno svorio sumažėjimo %, lyginant su bazine linija, išmatuoti taip, kaip aprašyta aukščiau):

10 lentelė

Dozė-atsakas, esant nepertraukiamam įvedimui

Dozė	Laikas	Kūno svorio sumažėjimo %
0,03 mg/kg/per dieną	2 diena	3,5 %
1 mg/kg/per dieną	2 diena	7,5 %
1 mg/kg/per dieną	4 diena	14 %

Iš lentelės matyti, kad didinant dozę nuo 0,03 mg/kg/per dieną iki 1 mg/kg/per dieną, svorio praradimas padidėjo nuo 3,5 iki 7,5. Taip pat svarbu pažymėti, kad 14-tą dieną 1 mg/kg/per dieną dozė sukėlė 14 % kūno svorio sumažėjimą.

16 PAVYZDYS: Leptino įtaka į *ob/ob* pelių kūno sudėtį

Šešiolikos savaičių amžiaus C57B1/6J *ob/ob* pelės 33 dienas buvo veikiamos 5 μ g/kg/per dieną pelės leptino doze, tirpikliu arba negavo preparato. Antrajame eksperimente 7 savaičių amžiaus *ob/ob* pelės 12 dienų buvo veikiamos 10 μ g/kg/per dieną žmogaus leptino, pelės leptino dozėmis arba tirpikliu. Tada pelės buvo numarintos ir įvertintas bendras kūno svoris, kūno sudėtis, insulino ir gliukozės kiekiai. Šių eksperimentų duomenys yra pateikti 11 lentelėje

11 lentelė

Paveiktų leptinu pelių kūno svoris, sudėtis, ir insulino ir gliukozės kiekiai

Poveikio grupė	16 savaičių amžiaus pelės, 5 $\mu\text{g/g}$ /per dieną leptino				7 savaičių amžiaus pelės, 10 $\mu\text{g/g}$ /per dieną leptino		
	Pelės leptinas	Tirpiklis	Kontrolė		Žmogaus leptinas	Pelės leptinas	Tirpiklis
Bendras kūno svoris	31,90 $\pm$ 2,8	64,10 $\pm$ 4,5	67,50 $\pm$ 6,2		31,00 $\pm$ 1,3	33,40 $\pm$ 2,4	42,70 $\pm$ 1,5
Riebalų iš viso (g)	9,10 $\pm$ 1,7	38,30 $\pm$ 4,0	40,87 $\pm$ 6,1				
%	28,40 $\pm$ 3,4	59,70 $\pm$ 2,1	60,34 $\pm$ 3,7				
Liesa masė iš viso (g)	6,80 $\pm$ 1,0	7,60 $\pm$ 0,4	7,73 $\pm$ 0,5				
%	21,30 $\pm$ 1,7	11,90 $\pm$ 1,2	11,57 $\pm$ 1,6				
Vanduo iš viso (g)	16,00 $\pm$ 0,8	18,20 $\pm$ 0,7	18,90 $\pm$ 1,0				
%	50,30 $\pm$ 4,2	28,40 $\pm$ 1,0	28,10 $\pm$ 2,2				
Insulinas (UIU/ml)	<2,0	<2,0	<2,0		<2,0	<2,0	21,4
Gliukozė (mg/dl)	170,0 $\pm$ 20,9	337 $\pm$ 30,3	317,5 $\pm$ 51,0		258,3 $\pm$ 26,8	320,0 $\pm$ 44,0	789,0 $\pm$ 152,1

Kūno sudėties duomenys rodo leptino poveikį į tris kūno dalis: riebalų masę, lieso kūno masę ir vandens masę. Šie duomenys rodo, kad leptinas labai mažina riebalų masę ir turi ribotą poveikį į liesą kūno masę. Tačiau poveikis į liesą kūno masę yra statistiškai nepatikimas.

Insulino ir gliukozės kiekių palyginimas paveiktose leptinu ir kontrolinėse (nepaveiktose) pelėse rodo, kad leptinas mažina cukraus ir insulino kiekius kraujyje ir tokiu būdu gerina šiuos diabeto rodiklius.

17 PAVYZDYS: Didelių leptino dozių poveikis laukinio tipo pelėms

Norint atlikti liesumo kontrolę, ob/ob pelėms (C57B1/6J +/?) vieną kartą per dieną i.p. būdu buvo leidžiama 10 μ g/g pelės leptino arba tirpiklio (PBS) ir kitas dvi savaites matuojamas kūno svoris ir maisto suvartojimas. Pradedant nuo 4-tos dienos, pastebimas žymus kūno svorio mažėjimas ir žymus maisto suvartojimo mažėjimas pirmąją savaitę. Tačiau po vienos savaitės abiejų pelių grupių maisto suvartojimas buvo vienodas. Antrosios savaitės gale gyvuliukai buvo numarinti ir nustatyta jų kūno sudėtis. Kūno sudėties analizės rezultatai parodyti 12 lentelėje. Šie duomenys rodo leptiną gavusių gyvuliukų riebalų kiekio sumažėjimą, lyginant su PBS gavusiais gyvuliukais.

12 lentelė

Laukinio tipo pelių (+/?) kūno sudėtis ir kūno svoris

Grupė	C57Bl/6J	Kūno svoris	Reibalai Iš viso	%	Liesa kūno masė Iš viso	%	Vanduo Iš viso	%
Baltymas	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 %
Tirpiklis	Vidurkis	17,3	0,93	5,04	4,87	27,79 %	11,62	67,43 %
	Stand. Nukryp.	1,6	0,90	4,52	0,30	1,05 %	0,74	3,52 %
	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 %
	Vidurkis	18,7	2,28	12,09 %	4,75	25,54 %	11,66	62,45 %
	Stand. Nukryp.	1,1	1,07	5,08 %	0,20	1,10 %	0,72	3,83 %

Antrame eksperimente parodyta du kartus per dieną leidžiamų 12,5 $\mu\text{g/g}$ pelės leptino i.p. dozių poveikis laukinio tipo C57B1/6J pelėms. Pastebėtas labai didelis kūno svorio ir maisto suvartojimo sumažėjimas, susijęs su du kartus per dieną leidžiamomis polipeptido injekcijomis. Šiame eksperimente gyvuliukai buvo patalpinti metabolinėse kamerose. Maistas buvo miltelių pavidalo Purina #5001 dieta. Šis maistas skyrėsi nuo ankstesnių eksperimentų maisto, kuriuos sudarė dieta, susidedanti iš kramtomo maisto, tapiokos ir vandens. Taigi, metabolinėse kamerose naudotas maistas buvo kaloringesnis, ir tai paaiškina, kodėl suvartoto maisto kiekis skiriasi nuo gyvuliukų suvartoto maisto, kuriame buvo vandens.

Toliau duodamos literatūros šaltinių, susijusių su aukščiau duodamu aprašymu ir ypatingai eksperimentinėmis metodikomis ir aptarimais, sąrašas

Bahary *et al.*, *Genimics*, 11:33-47 (1991).

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

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

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

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

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

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

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

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

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. 90-101.11, Simopoulos and Childs eds., S. Karger, Basel (1990).

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

Šis išradimas gali būti realizuotas kitokiomis formomis arba kitokiais būdais, nenukrypstant nuo jo esmės arba jo esminių charakteristikų. Todėl aprašymą reikia laikyti

visokiais požiūriais kaip iliustracinį, o ne apribojantį; išradimo apimtis yra nustatyta pridedamoje apibrėžtyje, ir turima galvoje, kad jame apimami visokie pakeitimai, kurie įeina į jo prasmės ir ekvivalentiškumo sferą.

Šiame aprašyme cituojami įvairūs literatūros šaltiniai, jie visi čia pridedami pilnai. Siūlomą išradimą galima įgyvendinti pagal aukščiau duodamą aprašymą, lengvai prieinamus literatūros šaltinius ir pradines medžiagas. Vis dėlto, pareiškėjai 1995 m. rugpjūčio 9 d. deponavo Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852-1178, USA) pagal Budapešto sutartį apie mikroorganizmų deponavimą patentavimo tikslais tokius mikroorganizmus: *E. coli* H14, turinčią pETH14 plazmidę (depozito Nr. 69880) ir *E. coli* M9, turinčią pETM9 plazmidę (depozito Nr. 69879).

(1) PAGRINDINĖ INFORMACIJA

(I) PAREIŠKĖJAS: THE ROCKEFELLER UNIVERSITY

(ii) IŠRADIMO PAVADINIMAS: KŪNO SVORIO MODULIATORIAI, ATITINKAMOS
NUKLEINO RŪGŠTYS IR BALTYMAI, IR JŲ DIAGNOSTINIS IR TERAPINIS PANAUDOJIMAS

(iii) SEKŲ SKAIČIUS: 99

(iv) KORESPONDENCIJOS ADRESAS:

(A) ADRESAS: Klauber & Jackson

(B) GATVĖ: 411 Hackensack avenue

(C) MIESTAS: Hackensack

(D) VALSTIJA: New Jersey

(E) ŠALIS: JAV

(F) ZIP: 07601

(v) KOMPIUTERINĖ SKAITYMO FORMA:

(A) TERPĖS TIPAS: minkštas diskas

(B) KOMPIUTERIS: IBM PC

(C) OPERACINĖ SISTEMA: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versija #1.25

(vi) EINAMOJI PARAIŠKOS DATA:

(A) PARAIŠKOS NUMERIS:

(B) UŽPILDYMO DATA:

(C) KLASIFIKACIJA:

(vii) ANKSTESNĖ PARAIŠKOS DATA:

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: 08/483, 211

(B) UŽPILDYMO DATA: Birželio 7, 1995

(C) KLASIFIKACIJA:

(vii) ANKSTESNĖ PARAIŠKOS DATA:

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: 08/438, 431

(B) UŽPILDYMO DATA: Gegužės 10, 1995

(C) KLASIFIKACIJA:

(vii) ANKSTESNĖ PARAIŠKOS DATA:

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: 08/347, 563

(B) UŽPILDYMO DATA: Lapkričio 30, 1994

(C) KLASIFIKACIJA:

(vii) ANKSTESNĖ PARAIŠKOS DATA:

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: 08/292, 345

(B) UŽPILDYMO DATA: Rugpjūčio 17, 1994

(C) KLASIFIKACIJA:

(viii) ĮGALIOJINIO/AGENTO INFORMACIJA:

(A) VARDAS: Jackson Esq., David A.

(B) REGISTRACIJOS NUMERIS: 26,742

(C) IŠRAŠO/NURODYMŲ NUMERIS: 600-1-087 PCT

(ix) TELEKOMUNIKACINĖ INFORMACIJA:

(A) TELEFONAS: 201 487-5800

(B) TELEFAKSAS: 201 343-1684

(C) TELEKSAS: 133521

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:1:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 2793 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: dviguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(A) APRAŠYMAS: ob kDNR

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: pelė

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: CDS

(B) PADĖTIS: 57..560

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:1:

GGATCCCTGC TCCAGCAGCT GCAAGGTGCA AGAAGAAGAA GATCCCAGGG AGGAA	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	
GTC TAT CAA CAG GTC CTC ACC AGC CTG CCT TCC CAA AAT GTG CTG CAG				344
Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln				
	85	90	95	
ATA GCC AAT GAC CTG GAG AAT CTC CGA GAC CTC CTC CAT CTG CTG GCC				392
Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala				
	100	105	110	
TTC TCC AAG AGC TGC TCC CTG CCT CAG ACC AGT GGC CTG CAG AAG CCA				440
Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro				
	115	120	125	
GAG AGC CTG GAT GGC GTC CTG GAA GCC TCA CTC TAC TCC ACA GAG GTG				488
Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val				
	130	135	140	
GTG GCT TTG AGC AGG CTG CAG GGC TCT CTG CAG GAC ATT CTT CAA CAG				536
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln				
	145	150	155	160
TTG GAT GTT AGC CCT GAA TGC TGA AGTTTCAAAG GCCACCAGGC TCCCAAGA				588
Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys *				
	165			
ATCATGTAGA GGGAAGAAAC CTTGGCTTCC AGGGGTCTTC AGGAGAAGAG AGCCATGTGC				648
ACACATCCAT CATTCAATTC TCTCCCTCCT GTAGACCACC CATCCAAAGG CATGACTCCA				708
CAATGCTTGA CTCAAGTTAT CCACACAACT TCATGAGCAC AAGGAGGGGC CAGCCTGCAG				768
AGGGGACTCT CACCTAGTTC TTCAGCAAGT AGAGATAAGA GCCATCCCAT CCCCTCCATG				828
TCCCACCTGC TCCGGGTACA TGTTCTCTCCG TGGGTACACG CTTGCTGCG GCCCAGGAGA				888
GGTGAGGTAG GGATGGGTAG AGCCTTTGGG CTGTCTCAGA GTCTTTGGGA GCACCGTGAA				948
GGCTGCATCC ACACACAGCT CGAAACTCCC AAGCAGCACA CGATGGAAGC ACTTATTTAT				1008
TTATTCTGCA TTCTATTTTG GATGGATCTG AAGCAAGGCA TCAGCTTTTT CAGGCTTTGG				1068
GGGTCAGCCA GGATGAGGAA GGCTCCTGGG GTGCTGCTTT CAATCCTATT GATGGGTCTG				1128
CCCGAGGCAA ACCTAATTTT TGAGTGA CTG GAAGGAAGGT TGGGATCTTC CAAACAAGAG				1188
TCTATGCAGG TAGCGCTCAA GATTGACCTC TGGTGACTGG TTTTGTTTCT 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 TGA CTCTTTC CGGAACATTT GGAGTGTACC AGGCACCCTT GGAGGGGCTA				1548
AAGCTACAGG CCTTTTGTTG GCATATTGCT GAGCTCAGGG AGTGAGGGCC CCACATTTGA				1608
GACAGTGAGC CCCAAGAAAA GGGTCCCTGG TGTAGATCTC CAAGGTTGTC CAGGGTTGAT				1668
CTCACAATGC GTTCTTAAAG CAGGTAGAC TTTGCATGCC AATATGTGGT TCTCATCTGA				1728
TTGGTTCATC CAAAGTAGAA CCCTGTCTCC CACCCATTCT GTGGGGAGTT TTGTTCCAGT				1788
GGGAATGAGA AATCACTTAG CAGATGGTCC TGAGCCCTGG GCCAGCACTG CTGAGGAAGT				1848
GCCAGGGCCC CAGGCCAGGC TGCCAGAATT GCCCTTCGGG CTGGAGGATG AACAAAGGGG				1908
CTTGGGTTTT TCCATCACCC CTGCACCCTA TGTCACCATC AAAGTGGGGG GCAGATCAGT				1968

GAGAGGACAC TTGATGGAAA GCAATACACT TTAAGACTGA GCACAGTTTC GTGCTCAGCT 2028
 CTGTCTGGTG CTGTGAGCTA GAGAAGCTC CCACATACAT ATAAAAATCA GAGGCTCATG 2088
 TCCCTGTGGT TAGACCCTAC TCGCGGCGGT GTACTIONACC ACAGCAGCAC CGCACCCTG 2148
 GAAGTACAGT GCTGTCTTCA ACAGGTGTGA AAGAACCTGA GCTGAGGGTG ACAGTGCCCA 2208
 GGGGAACCCT GCTTGCAGTC TATTGCATTT ACATACCGCA TTTGAGGGCA 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 CAGTGTTTATA 2508
 AATAACGTTG TATGCATGAA AGACGTTTTT ACAGCATGAA CCTGTCTACT CATGCCAGCA 2568
 CTCAAAAACC TTGGGGTTTT GGAGCAGTTT JGGATCTTGGG TTTTCTGTTA AGAGATGGTT 2628
 AGCTTATACC TAAAACCATA ATGGCAAAC GGCTGCAGGA CCAGACTGGA TCCTCAGCCC 2688
 TGAAGTGTGC CCTTCCAGCC AGGTCATACC CTGTGGAGGT GAGCGGGATC AGGTTTTGTG 2748
 GTGCTAAGAG AGGAGTTGGA GGTAGATTTT GGAGGATCTG AGGGC 2793

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:2:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 168 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(A) APRAŠYMAS: pelės ob polipeptidas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:2:

Met	Cys	Trp	Arg	Pro	Leu	Cys	Arg	Phe	Leu	Trp	Leu	Trp	Ser	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Ser	Tyr	Val	Gln	Ala	Val	Pro	Ile	Gln	Lys	Val	Gln	Asp	Asp	Thr	Lys
			20					25				30			
Thr	Leu	Ile	Lys	Thr	Ile	Val	Thr	Arg	Ile	Asn	Asp	Ile	Ser	His	Thr
		35					40					45			
Gln	Ser	Val	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Val	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Ile	Pro
	50					55					60				
Gly	Leu	His	Pro	Ile	Leu	Ser	Leu	Ser	Lys	Met	Asp	Gln	Thr	Leu	Ala
65					70				75					80	
Val	Tyr	Gln	Gln	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Asn	Val	Leu	Gln
				85					90					95	
Ile	Ala	Asn	Asp	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Leu	Leu	Ala
			100					105					110		
Phe	Ser	Lys	Ser	Cys	Ser	Leu	Pro	Gln	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Lys	Pro

115						120					125				
Glu	Ser	Leu	Asp	Gly	Val	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser	Thr	Glu	Val
130						135					140				
Val	Ala	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Gln	Gln
145						150					155				
Leu	Asp	Val	Ser	Pro	Glu	Cys	*								
165															

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:3:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 700 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: dviguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: kDNR

(A) APRAŠYMAS: žmogaus ob kDNR, kur N reiškia bet kokį nukleotidą

(iii) HIPOTETIŠKA: Ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: Ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: CDS

(B) PADĖTIS: 46..546

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:3:

NNNGNNGTTG CAAGGCCCAA GAAGCCCANN 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 CTG	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 CAG	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 TGAGGCCCTT GAAGGTCCTT CTCCTGCAA GGACTNACGT	585
Ser Pro Gly Cys	
165	
TAAGGGAAGG AACTCTGGTT TCCAGGTATC TCCAGGATTG AAGAGCATTGCATGGACACC	645
CCTTATCCAG GACTCTGTCA ATTTCCCTGA CTCCTCTAAG CCACTCTTCC AAAGG	700

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:4:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 167 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(A) APRAŠYMAS: žmogaus ob polipeptidas

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:5:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 166 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(A) APRAŠYMAS: pelės ob polipeptidas neturintis Gln 49 padėtyje

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: pelė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:6:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 167 amino rūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(A) APRAŠYMAS: žmogaus ob polipeptidas neturintis Gln 49 padėtyje

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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	Leu	His	Pro	Ile	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Met	Asp	Gln	Thr	Leu	Ala
65						70					75				
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

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(A) APRAŠYMAS: 2G7 egzons

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:7:

GTGCAAGAAG AAGAAGATCC CAGGGCAGGA AAATGTGCTG GAGACCCTG TGTCGGGTCC	60
NGTGGNTTTG GTCCTATCTG TCTTATGTNC AAGCAGTGCC TATCCAGAAA GTCCAGGATG	120
ACACCAAAAG CCTCATCAAG ACCATTGTCA NCAGGATCAC TGANATTTCAC CACACG	165

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:8:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 18 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (praimeris)

- (A) APRAŠYMAS: 2G7 egzono PCR 5' pradmuo

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:8:

CCAGGGCAGG AAAATGTG

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:9:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 22 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: 2G7 egzono PCR 3' pradmuo

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: taip

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:9:

CATCCTGGAC TTTCTGGATA GG

22

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:10:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 23 aminorūgštys
- (B) TIPAS: aminorūgštis
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

- (A) APRAŠYMAS: N-galiniis signalinis peptidas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:11:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 287 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: dviguba
- (D) TOPOLOGIJA: cirkuliarinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (plazmidė)

- (A) APRAŠYMAS: pET-15b ekspresijos vektorius

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINE: ne

(ix) BRUOŽAS:

- (A) PAVADINIMAS/RAKTAS: T7 promotorius
- (B) PADĖTIS: 20..37

(ix) BRUOŽAS:

- (A) PAVADINIMAS/RAKTAS: lac-operatorius
- (B) PADĖTIS: 39..64

(ix) BRUOŽAS:

- (A) PAVADINIMAS/RAKTAS: CDS
- (B) PADĖTIS: 108..243

(ix) BRUOŽAS:

- (A) PAVADINIMAS/RAKTAS: His-Tag
- (B) PADĖTIS: 123..137

(ix) BRUOŽAS:

- (A) PAVADINIMAS/RAKTAS: trombino skaldymo vieta
- (B) PADĖTIS: 184..196

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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	

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:12:

(A) ILGIS: 45 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:12:

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:13:

(A) ILGIS: 32 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĒS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijine

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: pelės 5' pradmuo

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĒ: ne

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:13:

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:14:

(A) ILGIS: 32 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINÈS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: pelės 3' praimeris

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: taip

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:14:

TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC

32

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:15:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 32 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: žmogaus 5' pradmuo

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:15:

TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC

32

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:16:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 32 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (praimeris)

(A) APRAŠYMAS: žmogaus 3' praimeris

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: taip

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:16:

TTCCTTCCCA TATGGTACTC CTTGCAGGAA GA

32

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:17:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 11 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: dviguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: kDNR
 - (A) APRAŠYMAS: akceptorius susijungimo vieta ob
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (ix) BRUOŽAS:
 - (A) PAVADINIMAS/RAKTAS: akceptorius susijungimo vieta
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:17:

AGCAGTCGGT A

11

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:18:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 16 aminorūgščių
 - (B) TIPAS: aminorūgštis
 - (D) TOPOLOGIJA: nežinoma
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas
 - (A) APRAŠYMAS: ob peptido fragmentas
- (v) FRAGMENTO TIPAS: vidinis
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: pelė
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS:

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

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:19:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 15 aminorūgščių
 - (B) TIPAS: aminorūgštis
 - (D) TOPOLOGIJA: nežinoma
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas
 - (A) APRAŠYMAS: ob peptido fragmentas
- (v) FRAGMENTO TIPAS: vidinis
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: pelė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:19:

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

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:20:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 19 aminorūgščių

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: nežinoma

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(A) APRAŠYMAS: ob peptido fragmentas

(v) FRAGMENTO TIPAS: vidinis

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: pelė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:21:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 20 aminorūgščių

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: nežinoma

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(A) APRAŠYMAS: ob peptido fragmentas

(v) FRAGMENTO TIPAS: karboksilo galas

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: pelė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:22:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 414 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: dvibuba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(A) APRAŠYMAS: žmogaus ob geno dalis, turinti nekoduojančią seką aukščiau pirmo egzono, koduojančią pirmojo egzono seką ir pirmojo introno 5' sritį

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: CDS

(B) PADĖTIS: 38..181

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: pirmojo introno 5' sritis

(B) PADĖTIS: 182..414

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: žmogaus ob geno 5' nekoduojanti seka, iš kurios buvo generuotas HOB 1gF DNR pradmuo

(B) PADĖTIS: 11..28

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: žmogaus ob geno introninė seka, iš kurios buvo generuotas HOB 1gR pradmuo

(B) PADĖTIS: 241..260

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:22:

GGTTGCAAGG CCCAAGAAGC 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

AAGAAACATT TATTGAACGC CTCCTGAATG CCAGGCACCT ACTGGAAGCT GAGAAGGATT 321
 TTGGATAGCA CAGGGCTCCA CTCTTTCTGG TTGTTTCTTN TGGCCCCCTC TGCCTGCTGA 381
 GATNCCAGGG GTTAGNGGTT CTTAATTCCT AAA 414

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:23:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 48 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(A) APRAŠYMAS: žmogaus ob baltymo, koduojančio pirmą egzoną, N-galinė dalis

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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			

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:24:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 801 bazių pora

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: dviguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(A) APRAŠYMAS: žmogaus ob geno dalis, turinti pirmo introno 3' sritį, antrojo egzono koduojančią seką ir 3' nekoduojančią seką

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: CDS

(B) PADĖTIS: 291..648

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: pirmojo introno 3'

(B) PADĖTIS: 1..290

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: žmogaus ob geno HOB introninė seka, iš kurios buvo generuotas HOB 2gF pradmuo

(B) PADĖTIS: 250..269

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: žmogaus ob geno nekoduojanti 3' seka, iš kurios buvo generuotas HOB 2gR DNR pradmuo

(B) PADĖTIS: 707..728

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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
CGATTCTCC 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 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 AGGTCACCTCT TCCTGCAAGG ACTACGTTAA	688
Leu Ser Pro Gly Cys	
115	
GGGAAGGAAC TCTGGCTTTC CAGGTATCTC CAGGATTGAA GAGCATTGCA TGGACACCCC	748
TTATCCAGGA CTCTGTCAAT TTCCCTGACT CCTCTAAGCC ACTCTTCCAA AGG	801

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:25:

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:27:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 4 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: nežinoma

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(v) FRAGMENTO TIPAS: vidinis

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: mielės pichia

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:27:

Glu Ala Glu Ala

1

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:28:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 4 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: nežinoma

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(v) FRAGMENTO TIPAS: vidinis

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: mielės pichia

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:28:

Leu Glu Lys Arg

1

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:29:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 18 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: HOB 1gF DNR pradmuo, generuotas iš žmogaus ob geno 5' nekoduojančios sekos

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:29:

CCCAAGAAGC CCATCCTG

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:30:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: HOB 1gR DNR pradmuo, generuotas žmogaus ob geno pirmos introninės sekos

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: taip

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:30:

GACTATCTGG GTCCAGTGCC

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:31:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (praimeris)

- (A) APRAŠYMAS: HOB 1gF DNR pradmuo, generuotas iš žmogaus ob geno pirmos introninės sekos

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:31:

CCACATGCTG AGCACTTGTT

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:32:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 22 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: HOB 2gr DNR pradmuo, generuotas iš žmogaus ob geno 3' nekoduojančios sekos

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: taip

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:32:

CTTCAATCCT GGAGATACCT

22

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:33:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 51 bazių pora

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: dviguba

(D) TOPOLOGIJA: cirkuliarinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR

(A) APRAŠYMAS: pPIC.9 klonavimo vieta

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:33:

CTCGAGAAAA GAGAGGCTGA AGCTTACGTA GAATTCCTA GGCCGGCCGG G

51

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:34:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 40 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: PCR 5' pradmuo žmogaus ob kDNR sekos amplifikacijai

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:34:

GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCCATCCAA AAAGTCCAAG

40

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:35:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 31 bazių pora

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: PCR 3' pradmuo žmogaus ob kDNR sekos amplifikacijai

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: taip

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:35:

GCGCGAATTC TCAGCACCCA GGGCTGAGGT C

31

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:36:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 40 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: PCR 5' pradmuo pelės ob kDNR sekos amplifikacijai

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:36:

GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCTATCCAG AAAGTCCAGG

40

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:37:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 31 bazių pora

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: PCR 3' pradmuo pelės ob kDNR sekos amplifikacijai

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: taip

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:37:

GCGCGAATTC TCAGCATTCA GGGCTAACAT C

31

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:38:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 4 aminorūgštys

- (B) TIPAS: aminorūgštis
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas
 - (A) APRAŠYMAS: N-galiniis renatūruoto pelės ob baltymo tetrapeptidas po trombino skaldymo
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: pelė
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:38:

Gly Ser His Met
1

- (2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:39:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 19 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1734
 - (iii) HIPOTETIŠKA: ne
 - (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
 - (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
 - (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:39:

CAAGACAAAT GAGATAAGG

19

- (2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:40:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1734
 - (iii) HIPOTETIŠKA: ne
 - (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
 - (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:40:

AGAGTTACAG CTTTACAG

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:41:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 19 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS494

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:41:

CTAAACACCT TTCCATTCC

19

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:42:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 22 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS494

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:42:

TTATATTCAC TTTTCCCCTC TC

22

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:43:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS883
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:43:

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:44:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 20 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS883
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:44:

GTGCAGCTTT AATTGTGAGC

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:45:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2359

- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:45:

AGTGTTGTGT TTCTCCTG

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:46:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 19 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2359
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:46:

AAAGGGGATG TGATAAGTG

19

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:47:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2336
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:47:

GGTGTACGT TTAGTTAC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:48:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2336

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:48:

GGAATAATGA GAGAAGATTG

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:49:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 18 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1219

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:49:

GCTCAACTGA CAGAAAAC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:50:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis

- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1218
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:50:

GACTATGTAA AAGAAATGCC

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:51:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1402
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:51:

AAAGGGCTTC TAATCTAC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:52:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1402
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:52:

CCTTCCAAC TCTTTGAC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:53:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 18 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS999

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:53:

TAAACCCCCT TTCTGTTC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:54:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 19 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS999

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:54:

TTGCATAATA GTCACACCC

19

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:55:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 22 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1751

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:55:

CCAAAATCAG AATTGTCAGA AG

22

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:56:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1751

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:56:

AAACCGAAGT TCAGATACAG

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:57:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 18 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1174
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:57:

AATATCTGAC ATTGGCAC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:58:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1174
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:58:

TTAGACCTGA GAAAAGAG

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:59:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 19 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2061
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:59:

GTTGCACAAT ACAAATCC

19

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:60:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2061

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:60:

CTTCATTAG TGTCTTAG

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:61:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 18 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2588

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:61:

ATCACTACAC ACCTAATC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:62:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 18 bazių porų

- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2588
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:62:

CCATTCTACA TTTCCACC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:63:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 24 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS808
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:63:

GGCTGTGTGA GCAAGATCCT AGGA

24

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:64:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 23 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS808
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne

- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:64:

TTGCCAGGCA AAGAGGGCTG GAC

23

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:65:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1392
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:65:

CTCAGGTATG TCTTTATC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:66:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1392
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:66:

TGTCTCTGCA TTCTTTTC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:67:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 18 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1148

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:67:

GACACATACA AACACAAG

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:68:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 19 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1148

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:68:

ATTGAGTTGA GTGTAGTAG

19

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:69:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 18 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1529

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:69:

CAGGGATTTTC TAATTGTC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:70:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 18 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS1529

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:70:

AAAAGATGGA GGCTTTTG

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:71:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 21 bazių pora

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2619

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:71:

CGTTAAGGGA AGGAACTCTG G

21

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:72:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2619

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:72:

TGGCTTAGAG GAGTCAGGGA

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:73:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 18 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS404

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:73:

ACCAGGGTCA ATACAAAG

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:74:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 18 bazių porų

- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS404
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:74:

TAATGTGTCC TTCTTGCC

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:75:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2367
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:75:

CAATCCTGGC TTCATTTG

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:76:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: Sekos surišimo vietai specifinis PCR pradmuo sWSS2367
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne

- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:76:

AAGGTGGGTA GGATGCTA

18

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:77:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 20 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS:UT528 markeris
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:77:

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:78:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 20 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS:UT528 markeris
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:78:

GTGCAGCTTT AATTGTGAGC

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:79:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: AFMa065zg9 markeris

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINE: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:79:

AGCTTCAAGA CTTTNAGCCT

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:80:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 19 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: AFMa065zg9 markeris

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINE: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:80:

GGTCAGCAGC ACTGTGATT

19

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:81:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 19 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: AFMa125wh1 markeris
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:81:

TCACCTTGAG ATTCCATCC

19

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:82:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 20 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: AFMa125wh1 markeris
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:82:

AACACCGTGG TCTTATCAAA

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:83:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 20 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: AFM309yf10 markeris
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:83:

CATCCAAGTT GGCAGTTTTT

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:84:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 20 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS:AFM309yf10 markeris

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINE: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:84:

AGATGCTGAA TTCCCAGACA

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:85:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 16 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS:AFM218xf10 markeris

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINE: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:85:

TGGGCAACAC AGCAAA

16

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:86:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 20 bazių porų

- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS:AFM218xf10 markeris
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:86:

TGCAGTTAGT GCCAATGTCA

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:87:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 16 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS:AFM206xcl markeris
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne
- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:87:

CCAGGCCATG TGGAAC

16

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:88:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 20 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS:AFM206xcl markeris
- (iii) HIPOTETIŠKA: ne

- (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:88:

AGTTCTTGGC TTGCGTCAGT

20

- (2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:89:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 16 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: AFM199xh12 markeris
 - (iii) HIPOTETIŠKA: ne
 - (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
 - (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
 - (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:89:

TCTGATTGCT GGCTGC

16

- (2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:90:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
 - (A) ILGIS: 17 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)
 - (A) APRAŠYMAS: AFM199xh12 markeris
 - (iii) HIPOTETIŠKA: ne
 - (iv) ANTIPRASMINĖ: ne
 - (vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: žmogus
 - (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:90:

GCGCGTGTGT ATGTGAG

17

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:91:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: AFMa345wc9 markeris

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:91:

AGCTCTTGGC AAATCACAT

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:92:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

- (A) APRAŠYMAS: AFMa345wc9 markeris

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

- (A) ORGANIZMAS: žmogus

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:92:

GCCTAAGGGA ATGAGACACA

20

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:93:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 24 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖS TIPAS: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (pradmuo)

(A) APRAŠYMAS: pelės Pax4 geno pradmuo

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: pelė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:93:

GGGAGCCTTG TCCTGGGTAC AAAG

24

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:94:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 491 bazių pora

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: dviguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: kDNR

(A) APRAŠYMAS: Rekombinantinis pelės met ob

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: pelė

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: CDS

(B) PADĖTIS: 41..478

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:94:

TCTAGATTTG AGTTTAACT TTTAGAAGGA GGAATAACAT ATG GTA CCG ATC CAG	55
Met Val Pro Ile Gln	
1 5	
AAA GTT CAG GAC GAC ACC AAA ACC TTA ATT AAA ACG ATC GTT ACG CGT	103
Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg	
10 15 20	
ATC AAC GAC ATC AGT CAC ACC CAG TCG GTC TCC GCT AAA CAG CGT GTT	151
Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val	
25 30 35	
ACC CGT 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	

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:95:

(A) ILGIS: 146 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijine

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(A) APRAŠYMAS: rekombinantinis pelės met ob baltymas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:95:

[illegible]

145

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:96:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 454 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖS TIPAS: dviguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR

(A) APRAŠYMAS: Rekombinantinis žmogaus ob

(iii) HIPOTETIŠKA: ne

(iv) ANTIPRASMINĖ: ne

(vi) ORIGINALUS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: žmogus

(ix) BRUOŽAS:

(A) PAVADINIMAS/RAKTAS: CDS

(B) PADĖTIS: 4..444

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:96:

CAT ATG GTA CCG ATC CAG AAA GTT CAG GAC GAC ACC AAA ACC TTA ATT	48
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile	
1 5 10 15	
AAA ACG ATC GTT ACG CGT ATC AAC GAC ATC AGT CAC ACC CAG TCG GTG	96
Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val	
20 25 30	
AGC TCT AAA CAG CGT GTT ACA GGC CTG GAC TTC ATC CCG GGT CTG CAC	144
Ser Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His	
35 40 45	
CCG ATC CTG ACC TTG TCC AAA ATG GAC CAG ACC CTG GCT GTA TAC CAG	192
Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln	
50 55 60	
CAG ATC TTA ACC TCC ATG CCG TCC CGT AAC GTT CTT CAG ATC TCT AAC	240
Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Leu Gln Ile Ser Asn	
65 70 75	
GAC CTC GAG AAC CTT CGC GAC CTG CTG CAC GTG CTG GCA TTC TCC AAA	288
Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys	
80 85 90 95	
TCC TGC CAC CTG CCA TGG GCT TCA GGT CTT GAG ACT CTG GAC TCT CTG	336
Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu	
100 105 110	
GGC GGG GTC CTG GAA GCA TCC GGT TAC AGC ACC GAA GTT GTT GCT CTG	384
Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu	
115 120 125	
TCC CGT CTG CAG GGT TCC CTT CAG GAC ATG CTT TGG CAG CTG GAC CTG	432

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

TCT CCG GGT TGT TAATGGATCC

454

Ser Pro Gly Cys
 145

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:97:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 147 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(A) APRAŠYMAS: Rekombinantinis žmogaus met ob baltymas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: 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) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:98:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 21 aminorūgštis

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:98:

[illegible]

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(B) TIPAS: aminorūgštis

(ii) MOLEKULÈS TIPAS: peptidas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:99:

[illegible]

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Nutukimo (OB) polipeptidas, kuriame yra 145-167 aminorūgštys, galintis moduluoti gyvūnų kūno svorį, turintis aminorūgščių seką, pavaizduotą SEQ ID NO:2 arba SEQ ID NO:4 arba jo aleliniai variantai, analogai arba fragmentai, turintys tą patį biologinį aktyvumą.

2. OB polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis turi aminorūgščių seką SEQ ID NOS: 5 arba 6.

3. OB polipeptido pagal 1 punktą imunogeninis fragmentas.

4. OB polipeptido imunogeninis fragmentas, besiskiriantis tuo, kad jis yra pasirinktas iš:

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) ir

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. Žmogaus OB polipeptido analogas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jame viena arba daugiau aminorūgščių, pasirinktų iš 53, 56, 71, 85, 89, 92, 95, 98, 110, 118, 121, 122, 126, 127, 128, 129, 132, 139, 157, 159, 163 ir 166 aminorūgščių (pagal SEQ ID NO:4 numeraciją), yra pakeista kita aminorūgštimi.

6. Žmogaus OB polipeptido analogas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad jame pakeičiama nesutampančiomis su pelės OB polipeptido aminorūgštimis, kaip parodyta SEQ ID NO: 2.

7. Žmogaus OB polipeptido analogas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad pakeičiama alaninu.

8. Žmogaus OB polipeptido analogas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad jame:

(a) serino liekana 53 padėtyje yra pakeista glicinu, alaninu, valinu, cisteinu, metioninu arba treoninu;

(b) serino liekana 98 padėtyje yra pakeista glicinu, alaninu, valinu, cisteinu, metioninu arba treoninu; arba

(c) arginino liekana 92 padėtyje yra pakeista asparaginu, lizinu, histidinu, glutaminu, glutamino rūgštimi, asparto rūgštimi, serinu, treoninu, metioninu arba cisteinu.

9. OB polipeptido analogas pagal 1 ir 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis turi 83 procentų arba didesnę aminorūgščių sekos homologiją su žmogaus OB polipeptido aminorūgščių seka, kuri parodyta SEQ ID NOS: 4 arba 6.

10 Žmogaus OB polipeptido analogas pagal 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad jame:

(a) viena arba daugiau asparto rūgšties liekanų yra pakeista glutamino rūgštimi;

(b) viena arba daugiau izoleucino liekanų yra pakeista alaninu;

(c) viena arba daugiau glicino arba valino liekanų yra pakeista alaninu;

(d) viena arba daugiau arginino liekanų yra pakeista histidinu;

(e) viena arba daugiau tirozino arba fenilalanino liekanų yra pakeista triptofanu;

(f) viena arba daugiau iš 121-128 liekanų (pagal SEQ ID NO: 4 numeraciją) yra pakeista glicinu arba alaninu; arba

(g) viena arba daugiau liekanų, esančių 54-60 arba 118-166 padėtyse (pagal SEQ ID NO: 4 numeraciją) yra pakeista lizinu, glutamino rūgštimi, cisteinu arba prolino.

11. OB polipeptidas pagal bet kurią iš 1, 2, 3, 5, 6 arba 9 punktų, besiskiriantis tuo, kad:

(a) jis turi pašalintas 1-21 liekanas; ir

(b) jis yra (a) poskyrio polipeptidas, turintis metioniną 21 padėtyje; arba turintis glicino-serino-histidino-metionino seką (SEQ ID NO: 38) 18-21 padėtyse; arba turintis metionino-glicino-serino-serino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-serino-serino-glicino-leucino-valino-prolino-arginino-glicino-serino-histidino-metionino seką (SEQ ID NO: 98) 1-21 padėtyse.

12. OB polipeptidas, besiskiriantis tuo, kad jis turi SEQ ID NO:4 pavaizduotas 22-167 aminorūgštis, ir, esant reikalui, N-galinį metioniną.

13. OB polipeptidas pagal bet kurį iš 1, 2, 3, 5, 6 arba 9 punktų, besiskiriantis tuo, kad:

- (a) jis turi pašalintas 1-21 liekanas; arba
- (b) jis yra (a) poskyrio polipeptidas, turintis leucino-glutamino rūgšties-lizino-arginino- glutamino rūgšties-alanino-glutamino rūgšties-alanino seką (SEQ ID NO: 26) 14-21 padėtyse; arba turintis glutamino rūgšties-alanino-glutamino rūgšties-alanino seką (SEQ ID NO: 27) 18-21 padėtyse; arba turintis leucino-glutamino rūgšties-lizino-arginino seką (SEQ ID NO: 28) 18-21 padėtyse; arba turintis metionino-glicino-serino-serino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-serino-serino-glicino-leucino-valino-prolino-arginino-glicino-serino-prolino seką (SEQ ID NO: 99) 2-21 padėtyse; arba turintis glicino-serino-prolino seką 18-21 padėtyse.

14. OB polipeptidas pagal bet kurį iš 7, 8 arba 10 punktų, besiskiriantis tuo, kad:

- (a) jis turi pašalintas 1-21 liekanas; arba
- (b) jis yra (a) poskyrio polipeptidas, turintis metioniną 21 padėtyje; arba turintis glicino-serino-histidino-metionino seką (SEQ ID NO: 38) 18-21 padėtyse; arba turintis metionino-glicino-serino-serino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-serino-serino-glicino-leucino-valino-prolino-arginino-glicino-serino-histidino-metionino seką (SEQ ID NO:98) 1-21 padėtyse; arba turintis leucino-glutamino rūgšties-lizino-arginino-glutamino rūgšties-alanino-glutamino rūgšties-alanino seką (SEQ ID NO: 26) 14-21 padėtyse; arba turintis glutamino rūgšties-alanino-glutamino rūgšties-alanino seką (SEQ ID NO: 27) 18-21 padėtyse; arba turintis leucino-glutamino rūgšties-lizino-arginino seką (SEQ ID NO: 28) 18-21 padėtyse; arba turintis metionino-glicino-serino-serino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-serino-serino-glicino-leucino-valino-prolino-arginino-glicino-serino-prolino seką (SEQ ID NO: 99) 2-21 padėtyse; arba turintis glicino-serino-prolino seką 18-21 padėtyse.

15. OB polipeptido sutrumpintas analogas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jame (pagal SEQ ID NO: 4 numeraciją):

- (a) pašalinta viena arba daugiau liekanų, esančių 121-128 padėtyse;
- (b) pašalintos 1-116 liekanos;
- (c) pašalintos 1-21 ir 54-167 liekanos;

- (d) pašalintos 1-60 ir 117-167 liekanos;
- (e) pašalintos 1-60 liekanos;
- (f) pašalintos 1-53 liekanos;
- (g) pašalinta viena arba daugiau liekanų 121-128 padėtyse ir pašalintos 1-21

liekanos, arba

(h) jis yra (a)-(g) poskyrių analogas, turintis N-galinę aminorūgštį arba aminorūgščių seką, pasirinktą iš grupės, susidedančios iš:

- (1) metionino,
- (2) glicino-serino-histidino-metionino sekos (SEQ ID NO: 38),
- (3) metionino-glicino-serino-serino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-serino-serino-glicino-leucino-valino-prolino-arginino-glicino-serino-histidino-metionino sekos (SEQ ID NO: 98),
- (4) leucino-glutamino rūgšties-lizino-arginino-glutamino rūgšties-alanino-glutamino rūgšties-alanino sekos (SEQ ID NO: 26),
- (5) glutamino rūgšties-alanino-glutamino rūgšties-alanino sekos (SEQ ID NO: 27),
- (6) leucino-glutamino rūgšties-lizino-arginino sekos (SEQ ID NO: 28),
- (7) metionino-glicino-serino-serino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-serino-serino-glicino-leucino-valino-prolino-arginino-glicino-serino-prolino sekos (SEQ ID NO: 99); ir
- (8) glicino-serino-prolino sekos.

16. Rekombinantinis OB polipeptidas pagal bet kurį iš 1-15 punktų.

17. Chemiškai sintezuotas OB polipeptidas pagal bet kurį iš 1-15 punktų.

18. OB polipeptido pagal bet kurį iš 1-17 punktų chimerinė forma.

19. OB polipeptido darinys pagal bet kurį iš 1-18 punktų, besiskiriantis tuo, kad jame yra viena arba daugiau prie jo prijungtų cheminių grupių.

20. Darinys pagal 19 punktą, besiskiriantis tuo, kad prijungta cheminė grupė yra vandenyje tirpus polimeras.

21. Darinys pagal 20 punktą, besiskiriantis tuo, kad šis vandenyje tirpus polimeras yra polietilenglikolis.

22. Darinys pagal 21 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra mono-, di-, tri- arba tetra-polietilenglikolintas darinys.

23. Darinys pagal 22 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra monopoli-etilenglikolintas N-gale.

24. Darinys pagal 23 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra OB polipeptidas, turintis sekos SEQ ID NO:4 22-167 aminorūgščių liekanas, arba SEQ ID NO:6 22-166 aminorūgščių liekanas.

25. Darinys pagal 23 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra OB polipeptidas, turintis sekos SEQ ID NO:4 22-167 aminorūgščių liekanas, arba sekos SEQ ID NO:6 22-166 aminorūgščių liekanas ir turi metioniną 21 padėtyje.

26. Išskirta nukleino rūgšties molekulė, besiskirianti tuo, kad ji koduoja OB polipeptidą pagal bet kurį iš 1-6, 9 arba 11 punktų.

27. Išskirta nukleino rūgšties molekulė, besiskirianti tuo, kad ji koduoja OB polipeptidą pagal bet kurį iš 7, 8, 10, 13, 14 arba 15 punktų.

28. DNR molekulė, skirta OB polipeptido, pasižyminčio žinduolio kūno svorio moduliavimo biologiniu aktyvumu, ekspresijai gauti, besiskirianti tuo, kad šią DNR pasirenka iš:

- (a) DNR molekulių, parodytų SEQ ID NOS: 1 ir 3 arba jų fragmentų;
- (b) DNR molekulių, kurios hibridizuojasi su DNR molekulėmis, apibrėžtomis (a) poskyryje, arba galinčių hibridizuotis jų fragmentų; ir
- (c) DNR molekulių, kurios koduoja aminorūgščių sekas, koduojamos bet kurios iš aukščiau minėtų DNR molekulių, ekspresiją.

29. DNR molekulė pagal 28 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra žmogaus genominė DNR molekulė, kurios seka yra SEQ ID NO: 22 ir 24.

30. DNR molekulė pagal 28 punktą, besiskirianti tuo, kad ji koduoja polipeptidą, turintį aminorūgščių seką, pasirinktą iš aminorūgščių sekų, kurios yra:

- (a) SEQ ID NO:2;
- (b) SEQ ID NO:2 22-167 aminorūgštys;
- (c) SEQ ID NO:4;
- (d) SEQ ID NO:4 22-167 aminorūgštys;
- (e) SEQ ID NO:5

(f) SEQ ID NO:5 22-166 aminorūgštys;

(g) SEQ ID NO:6

(h) SEQ ID NO:6 22-166 aminorūgštys; ir

(i) (b), (d), (f) arba (h) poskyrių aminorūgščių sekos, turinčios N-galinę aminorūgštį arba aminorūgščių seką, pasirinktą iš:

(1) metionino,

(2) glicino-serino-histidino-metionino sekos (SEQ ID NO: 38),

(3) metionino-glicino-serino-serino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-serino-serino-glicino-leucino-valino-prolino-arginino-glicino-serino-histidino-metionino sekos (SEQ ID NO:98).

31. DNR molekulė pagal 30 punktą, besiskirianti tuo, kad ji koduoja (b), (d), (f) arba (h) poskyrių aminorūgščių sekas, turinčias N-galinę aminorūgščių seką, pasirinktą iš:

(1) leucino-glutamino rūgšties-lizino-arginino-glutamino rūgšties-alanino-glutamino rūgšties-alanino sekos (SEQ ID NO: 26),

(2) glutamino rūgšties-alanino-glutamino rūgšties-alanino sekos SEQ ID NO: 27),

(3) leucino-glutamino rūgšties-lizino arginino sekos (SEQ ID NO: 28),

(4) metionino-glicino-serino-serino-histidino-histidino-histidino-histidino-histidino-serino-serino-glicino-leucino-valino-prolino-arginino-glicino-serino-prolino sekos (SEQ ID NO: 99), ir

(5) glicino-serino-prolino sekos.

32. DNR molekulė pagal 26 punktą, besiskirianti tuo, kad ji turi seką, išdėstytą kaip baltymą koduojanti SEQ ID NO:3 seka.

33. DNR molekulė pagal 26 punktą, besiskirianti tuo, kad ji turi seką, išdėstytą kaip SEQ ID NO:3 22-167 aminorūgštis koduojanti seka.

34. Detektuojama žymė pažymėta nukleino rūgšties molekulė, besiskirianti tuo, kad ji gali hibridizuotis su DNR molekule pagal bet kurį iš 26-33 punktų.

35. Vektorius, besiskiriantis tuo, kad jame yra DNR molekulė pagal bet kurį iš 26-33 punktų.

36. Ekspresijos vektorius, besiskiriantis tuo, kad jame yra DNR molekulė pagal bet kurį iš 26, 28, 32 arba 33 punktų, operatyviai sujungta su ekspresijos kontroline seka.

37. Ekspresijos vektorius, besiskiriantis tuo, kad jame yra DNR molekulė pagal 29 arba 31 punktą, operatyviai sujungta su ekspresijos kontroline seka.

38. Ekspresijos vektorius, besiskiriantis tuo, kad jame yra DNR molekulė pagal 27 punktą, operatyviai sujungta su ekspresijos kontroline seka.

39. Vienaląstis šeimininkas, besiskiriantis tuo, kad jis yra transformuotas arba transfekuotas DNR molekule pagal 26 arba 27 punktą arba ekspresijos vektoriumi pagal bet kurį iš 35-38 punktų.

40. Vienaląstis šeimininkas pagal 39 punktą, besiskiriantis tuo, kad ši vienaląstį šeimininką pasirenka iš bakterijų, mielių, žinduolių ląstelių, augalų ląstelių, vabzdžių ląstelių ir žmogaus ląstelių audinio kultūroje.

41. Vienaląstis šeimininkas pagal 40 punktą, besiskiriantis tuo, kad šis vienaląstis šeimininkas yra bakterija, pasirinkta iš *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, ir *Streptomyces*, žinduolio ląstelė, pasirinkta iš CHO, R1.1, B-W, LM, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, BMT10 ir vabzdžio Sf9 ląstelės.

42. Vienaląstis šeimininkas pagal 40 punktą, besiskiriantis tuo, kad šis vienaląstis šeimininkas yra mielės, pasirinktos iš *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* ir *Torulopsis*.

43. Žinduolio ląstelė, besiskirianti tuo, kad ji turi OB polipeptidą koduojančią DNR seką, ir yra modifikuota *in vitro* taip, kad duotų didesnę OB polipeptido ekspresiją homologinės rekombinacijos, kurią sudaro ekspresijos reguliatorinės sekos įterpimas betarpiškai prie OB polipeptidą koduojančios sekos, būdu.

44. Ląstelė pagal 43 punktą, besiskirianti tuo, kad joje esanti ekspresijos reguliatorinė seka, ir homologinė rekombinacija pakeičia mutantinio OB polipeptido ekspresijos reguliatorinę seką.

45. Ląstelė pagal 43 punktą, besiskirianti tuo, kad joje esančios ekspresijos reguliatorinės sekos tarpas nėra OB polipeptido reguliatorinė seka.

46. OB polipeptido gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina:

(a) ląstelės pagal bet kurį iš 39-45 punktų kultivavimas sąlygose, kuriose vyksta OB polipeptido ekspresija; ir

(b) ekspresuoto OB polipeptido išskyrimas.

47. Būdas pagal 46 punktą, besiskiriantis tuo, kad ląstelė yra bakterija arba mielės.

48. Būdas pagal 46 arba 47 punktą, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina dar ir:

(c) OB polipeptido chromatografavimas per Ni-chelatus sudarančią kolonėlę; ir

(d) OB polipeptido valymas, panaudojant gel-filtraciją.

49. Būdas pagal 48 punktą, besiskiriantis tuo, kad po (c) stadijos ir prieš (d) stadiją dar atliekamas OB polipeptido chromatografavimas per stiprių katijonitų kolonėlę.

50. Antikūnas, besiskiriantis tuo, kad jis yra specifinis OB polipeptidui pagal bet kurį iš 1-18 punktų, arba polipeptidui, gautam 46-49 punktuose apibrėžtu būdu.

51. Antikūnas pagal 50 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra monokloninis arba polikloninis antikūnas.

52. Antikūnas pagal 51 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra pažymėtas detektuojama žyme.

53. Gyvybingų ląstelių linija, besiskirianti tuo, kad ji produkuoja monokloninį antikūną pagal 51 punktą.

54. OB polipeptidui specifinio antikūno gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina:

(a) OB polipeptido pagal bet kurį iš 1-18 punktų ir/arba polipeptido, gauto 46-49 punktuose apibrėžtu būdu, konjugavimas su baltymu-nešikliu;

(b) gyvulio-šeimininko imunizavimas (a) stadijos OB polipeptido fragmento-baltymo-nešiklio konjugatu, sumaišytu su stimulatoriumi; ir

(c) antikūno išgavimas iš imunizuoto gyvulio-šeimininko.

55. OB polipeptido buvimo nustatymo mėginyje būdas, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina:

(a) mėginio, kuriame gali būti OB polipeptido, sąlytis su antikūnu, kuris specifiškai jungiasi su OB polipeptidu sąlygose, leidžiančiose susidaryti reakcijos kompleksams tarp antikūno ir OB polipeptido; ir

(b) antikūno ir mėginyje esančio OB polipeptido reakcijos kompleksų susidarymo nustatymas; šis reakcijos kompleksų susidarymas rodo, kad mėginyje yra OB polipeptido.

56. Būdas pagal 55 punktą, besiskiriantis tuo, kad antikūną prijungia prie kieto pagrindo.

57. OB polipeptido kiekio biologiniame mėginyje nustatymo *in vitro* būdas, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina:

(a) reakcijos kompleksų biologiniame mėginyje susidarymo detektavimas pagal 55 arba 56 punktą; ir

(b) susidariusių kompleksų kiekio įvertinimas; šis reakcijos kompleksų kiekis atitinka OB polipeptido kiekį biologiniame mėginyje.

58. Žinduolių ligos, susijusios su padidintais arba sumažintais OB polipeptido kiekiais, nustatymo arba diagnozavimo *in vitro* būdas, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina:

(a) OB polipeptido kiekio įvertinimas biologiniame mėginyje iš žinduolio organizmo pagal 57 punktą; ir

(b) kiekio, nustatyto (a) stadijoje, palyginimas su OB polipeptido kiekiu, esančiu normaliaame subjekte, arba tiriamame subjekte ankstesniu laiku; OB polipeptido kiekio padidėjimas, lyginant su normaliais kiekiais, rodo ligą, susijusią su padidintais OB polipeptido kiekiais, o OB polipeptido kiekio sumažėjimas, lyginant su normaliais kiekiais, rodo ligą, susijusią su sumažintais OB polipeptido kiekiais.

59. Žinduolių ligos, susijusios su padidintais arba sumažintais OB polipeptido kiekiais, terapinio gydymo kontroliavimo *in vitro* būdas, besiskiriantis tuo, kad biologinių mėginių, gautų iš žinduolio, kuris yra gydomas nuo ligos, susijusios su padidintais arba sumažintais OB polipeptido kiekiais, serijoje nustato OB polipeptido kiekius pagal 57 punktą.

60. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad į ją įeina OB polipeptidas pagal bet kurį iš 1-18 punktų, arba OB polipeptidas, gautas 46-49 punktuose apibrėžtu būdu ir farmaciškai tinkamas nešiklis.

61. Farmacinė kompozicija pagal 60 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra skirta gyvūno kūno svorio sumažinimui.

62. Farmacinė kompozicija, skirta gyvūno kūno svorio padidinimui, besiskirianti tuo, kad į ją įeina OB polipeptido pagal bet kurį iš 1-18 punktų arba OB polipeptido, gauto 46-49 punktuose apibrėžtu būdu, antagonistas ir farmaciškai tinkamas nešiklis.

63. Farmacinė kompozicija pagal 62 punktą, besiskirianti tuo, kad antagonistą pasirenka iš antikūno, kuris susijungia ir neutralizuoja OB polipeptido aktyvumą, OB polipeptido fragmento, kuris susijungia, bet neaktyvuoja OB polipeptido receptoriaus, ir OB polipeptido antagonisto, kuris yra maža molekulė.

64. Antiprasminės nukleino rūgšties molekulės, hibridizuojamos su nukleino rūgštimi, koduojančia OB polipeptidą pagal bet kurį iš 1-4 arba 9 punktų, panaudojimas vaisto, skirto žinduolių kūno svorio modifikavimui, gamyboje.

65. Nukleino rūgšties molekulės, koduojančios OB polipeptidą pagal bet kurį iš 1-18 punktų ir/arba OB polipeptidą, gautą 46-49 punktuose apibrėžtu būdu, panaudojimas genų terapijos vaisto, skirto gyvūno kūno svoriui modifikuoti, gamyboje.

66. OB polipeptido pagal bet kurį iš 1-18 punktų, ir/arba OB polipeptido, gauto 46-49 punktuose apibrėžtu būdu, panaudojimas vaisto, skirto gyvūno kūno svoriui modifikuoti, gamyboje.

67. OB polipeptido panaudojimas pagal 66 punktą vaisto skirtu sutrikimų, pasirinktų iš diabeto, aukšto kraujospūdžio ir aukšto cholesterolio kiekio, gydymui, gamyboje.

68. OB polipeptido panaudojimas pagal 66 punktą vaisto kombinacijoje su vaistu, skirtu diabeto, aukšto kraujospūdžio ir aukšto cholesterolio kiekio gydymui, gamyboje.

69. OB polipeptido pagal bet kurį iš 1-18 punktų, ir/arba OB polipeptido, gauto 46-49 punktuose apibrėžtu būdu, antagonisto panaudojimas vaisto, skirto gyvūno kūno svoriui padidinti, gamyboje.

70. Panaudojimas pagal 69 punktą, besiskiriantis tuo, kad antagonistą pasirenka iš antikūno, kuris jungiasi ir neutralizuoja OB polipeptido aktyvumą, OB polipeptido fragmento, kuris jungiasi, bet neaktyvuoja OB receptoriaus, ir OB polipeptido antagonisto, kuris yra maža molekulė.

71. Panaudojimas pagal bet kurį iš 66-70 punktų, besiskiriantis tuo, kad vaistas yra skirtas intraveniniam, intraarteriniam, intraperitoniniam, intraraumeniniam, subkutaniniam, peroraliniam arba pulmonariniam vartojimui.

GGATCCCTGCTCCAGCAGCTGCAAGGTGCA ⁴ GAAGAAGAAGATCCAGGGAGGAAATGTG	61
<u>M C</u>	2
CTGGAGACCCCTGTGTGGTTCCCTGTGGCTTTGGTCCCTATCTGTCTTATGTTCAAGCAGT	121
<u>W R P L C R F L W L W S Y L S Y V Q A V</u>	22
GCCTATCCAGAAAGTCCAGGATGACACCAAAACCCCTCATCAAGACCAATTGTCACCAGGAT	181
P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I	42
CAATGACATTTACACACGCAGTCGGTATCCGCCAAGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTT	241
N D I S H T Q S V S A K Q R V T G L D F	62
CATTCCTGGGCTTCACCCCAATTCAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTA	301
I P G L H P I L S L S K M D Q T L A V Y	82
TCAACAGGTCCTCACCAGCCTGCCCTTCCCAAATGTGCTGCAGATAGCCAATGACCTGGA	361
Q Q V L T S L P S Q N V L Q I A N D L E	102
GAATCTCCGAGACCTCCTCCATCTGCTGGCCCTTCTCCAAGAGCTGCTCCCTGCCCTCAGAC	421
N L R D L L L H L L A F S K S C S L P Q T	122
CAGTGGCCTGCAGAAGCCAGAGAGCCTGGATGGCGTCCCTGGAAAGCCTCAGCTCTACCAC	481
S G L Q K P E S L D G V L E A S L Y S T	142

FIG. 1A

AGAGGTGGTGGCTTTGAGCAGGCTGCAGGGCTCTCTGCAGGACATTCTTCAACAGTTGGA	541
E V V A L S R L Q G S L Q D I L Q Q L D	162
TGTTAGCCCTGAATGCTGAAGTTTCAAAGGCCACCAGGCTCCCAAGAATCATGTAGAGGG	601
V S P E C *	167
AAGAAACCTTGGCTTCCAGGGGTCTTCAGGAGAAGAGAGCCATGTGCACACATCCATCAT	661
TCATTTCCTCCCTCTGTAGACCACCCATCCAAGGCATGACTCCACAATGCTTGACTC	721
AAGTTATCCACACAACCTTCATGAGCACAAAGAGGGGCCAGCCTGCAGAGGGGACTCTCAC	781
CTAGTTCCTCAGCAAGTAGAGATAAGAGCCATCCCATCCCCCTCAITGTCCACCCTGCTCC	841
GGGTACATGTTCTCCGTGGGTACACGCTTCGCTGGGCCCAGGAGAGGTGAGGTAGGGA	901
TGGGTAGAGCCTTTGGGCTGTCTCAGAGTCTTGGGAGCACCGTGAAGGCTGCATCCACA	961
CACAGCTGGAACCTCCCAAGCAGCACACGATGGAAGCATTATTATTATTCTGCATTTC	1021
TATTTTGGATGATCTGAAGCAAGGCATCAGCTTTTTCAGGCTTGGGGGTACGCCAGGA	1081
TGAGGAAGGCTCCTGGGGTGTGCTTTCAATCCTATTGATGGGTCTGCCGAGGCAACC	1141

FIG. 1B

TAATTTTGTGAGTGACTGGAAGGTTGGGATCTTCCAAACAAGAGTCTATGCAGGTAG 1201
CGCTCAAGATTGACCTCTGGTGACTGGTTTTGTTTCTATTGTGACTGACTCTATCCAAAC 1261
ACGTTTGCAGCGGCATTGCCGGGAGCATAGGCTAGGTTATTATCAAAGCAGATGAATTT 1321
TGTC AAGTGTAATATGTATCTATGTGCACCTGAGGGTAGAGGATGTGTTAGAGGGAGGGT 1381
GAAGGATCCGGAAGTGTTCTCTGAATTACATATGTGTGGTAGGCTTTTCTGAAAGGGTGA 1441
GGCATTTTCTTACCTCTGTGGCCACATAGTGTGGCTTTGTGAAAAGGACAAAGGAGTTGA 1501
CTCTTTCCGGAACATTTGGAGTGTAACGAGCACCCCTTGGAGGGGCTAAAGCTACAGGCCCT 1561
TTTGTGGCATAATTGCTGAGCTCAGGGAGTGAGGGCCCCACATTTGAGACAGTGAGCCCC 1621
AAGAAAAGGGTCCCTGGTGTAGATCTCCAAGTTGTCCAGGGTTGATCTCACAAATGCGTT 1681
TCTTAAGCAGGTAGACGTTTGCAATGCCAATAATGTGGTTCTCATCTGATTGGTTTCATCCAA 1741
AGTAGAACCCCTGTCTCCACCCATTCTGTGGGGAGTTTTGTTCAGTGGGAATGAGAAAT 1801
CACTTAGCAGATGGTCTGAGCCCTGGGCCAGCACTGCTGAGGAAGTGCCAGGGCCCCAG 1861

LT 4265 B

FIG. 1C

GCCAGGCTGCCAGAATTGCCCTTCGGGCTGGAGGATGAACAAAGGGCTTGGTTTTCC 1921
ATCACCCCTGCACCCCTATGTCACCATCAAACTGGGGGGCAGATCAGTGAGAGGACACTTG 1981
ATGGAAGCAATACACTTTAAGACTGAGCACAGTTTCGTGCTCAGCTCTGCTGGTCTG 2041
TGAGCTAGAGAAGCTCACCACATACATATAAAATCAGAGGCTCATGTCCCTGTGGTTAG 2101
ACCTTACTCGGGGGGTGTACTCCACCACAGCAGCACCGCACCCTGGAAGTACAGTGCT 2161
GTCTTCAACAGGTGTGAAGAACCCTGAGCTGAGGGTGACAGTGCCCAAGGGAACCCTGCT 2221
TGCAGTCTATTGCAITTTACATACCGCAITTCAGGGCACATTAGCATCCACTCCTATGGTA 2281
GCACACTGTTGACAAATAGGACAAGGGATAGGGTTGACTATCCCTTATCCAAAATGCTTG 2341
GGACTAGAGAAGITTTGGATTTTAGAGTCTTTTCAGGCATAGGTATATTGAGTATATAT 2401
AAAATGAGATATCTTGGGATGGGGCCCAAGTATAAACATGAAGTTCATTATATTTCAT 2461
AATACCGTATAGACACTGCTTGAAGTGTAGTTTATACAGTGTTTAAATAACGTTGTAT 2521
GCATGAAGACGTTTTTACAGCATGAACCCTGTCTACTCATGCCAGCACTCAAAAACCTTG 2581

FIG. 1D

GGGTTTTGGAGCAGTTTGGATCTTGGGTTTTCTGTTAAGAGATGGTTAGCTTATACCTAA 2641
AACCATATGGCAACAGGCTGCAGGACCAGACTGGATCCTCAGCCCCTGAAGTGTGCCCT 2701
TCCAGCCAGGTCATACCCCTGTGGAGGTGAGCGGGATCAGGTTTTGTGGTGCTAAGAGAGG 2761
AGTTGGAGGTAGATTTTGGAGGATCTGAGGGC 2821

FIG. 1E

---G--GTTG CAAGGCCCAA GAAGCCCA-- -TCCTGGGA GGAATGCA 50
TTGGGAACC CTGTGGGAT TCTGTGGCT TTGGCCCTAT CTTTCTATG 100
TCCAAGCTGT GCCCATCCA AAAGTCCAAG ATGACACCAA AACCTCATC 150
AAGACAATTG TCACCAGGAT CAATGACATT TCACACACGC AGTCAGTCTC 200
CTCCAACAG AAAGTCACCG GTTTGACTT CATTCTGGG CTCACCCCA 250
TCCTGACCTT ATCCAAGATG GACCAGACAC TGGCAGTCTA CCAACAGATC 300
CTCACCAGTA TGCCTTCAG AAACGTGATC CAAATATCCA ACGACCTGGA 350
GAACCTCCGG GATCTTCTC ACGTGTGGC CTTCTCTAAG AGCTGCCACT 400
TGCCCTGGGC CAGTGGCTG GAGACCTTG ACAGCCTGG GGTGTCTG 450
GAAGCTTCAG GCTACTCCAC AGAGGTGTG GCCCTGAGCA GGCTGCAGGG 500
GTCTCTGCAG GACATGCTGT GGCAGCTGA CCTACGCCCT GGTGTGAG 550

FIG. 2A

GCCTTGAAGG TCACTCTTCC TGCAAGGACT -ACGTTAAGG GAAGGAACTC 600
 TGGTTTCCAG GATCTCTCCAG GATTGAAGAG CATTGCATGG ACACCCCTTA 650
 TCCAGGACTC TGTCAATTTC CCTGACTCCT CTAAGCCACT CTTCCAAAGG 700

FIG. 2B

1 MET HIS TRP GLY THR LEU CYS GLY PHE LEU TRP LEU TRP PRO TYR
 16 LEU PHE TYR VAL GLN ALA VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
 31 THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
 46 SER HIS THR GLN SER VAL SER SER LYS GLN LYS VAL THR GLY LEU
 61 ASP PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU THR LEU SER LYS MET
 76 ASP GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN ILE LEU THR SER MET PRO
 91 SER ARG ASN VAL ILE GLN ILE SER ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG
 106 ASP LEU LEU HIS VAL LEU ALA PHE SER LYS SER CYS HIS LEU PRO
 121 TRP ALA SER GLY LEU GLU THR LEU ASP SER LEU GLY GLY VAL LEU
 136 GLU ALA SER GLY TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU
 151 GLN GLY SER LEU GLN ASP MET LEU TRP GLN LEU ASP LEU SER PRO
 166 GLY CYS END

FIG. 3

Pelè	MCWRPLCRFL WLWSYLSYVQ AVPIOKVODD TKTLIKTIVT RINDISHTQS	50
Žmogus	MHWGTLGFL WLWPYLFYVQ AVPIOKVODD TKTLIKTIVT RINDISHTQS	
Pelè	VSAKQRTGL DFIPGLHPIL SLSKMDQTLA VYQOVLTSLP SONVLOIAND	100
Žmogus	VSSKOKVTGL DFIPGLHPIL TLSKMDQTLA VYQOILTSMPSRNVIQISND	
Pelè	LENLRDLLHL LAFSKSCSLP QTSGLQKPES LDGVLEASLY STEVVALSRL	150
Žmogus	LENLRDLLHV LAFSKSCHLP WASGLETLDS LGGVLEASGY STEVVALSRL	
Pelè	QGSLODILQQLDVSPEC	167
Žmogus	QGSLODMLWQLDLSPGC	

1 MET CYS TRP ARG PRO LEU CYS ARG PHE LEU TRP LEU TRP SER TYR
16 LEU SER TYR VAL GLN ALA VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
31 THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
46 SER HIS THR SER VAL SER ALA LYS GLN ARG VAL THR GLY LEU ASP
61 PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU SER LEU SER LYS MET ASP
76 GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN VAL LEU THR SER LEU PRO SER
91 GLN ASN VAL LEU GLN ILE ALA ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG ASP
106 LEU LEU HIS LEU LEU ALA PHE SER LYS SER CYS SER LEU PRO GLN
121 THR SER GLY LEU GLN LYS PRO GLU SER LEU ASP GLY VAL LEU GLU
136 ALA SER LEU TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU GLN
151 GLY SER LEU GLN ASP ILE LEU GLN GLN LEU ASP VAL SER PRO GLU
166 CYS END

FIG. 5

1 MET HIS TRP GLY THR LEU CYS GLY PHE LEU TRP LEU TRP PRO TYR
16 LEU PHE TYR VAL GLN ALA VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
31 THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
46 SER HIS THR SER VAL SER SER LYS GLN LYS VAL THR GLY LEU ASP
61 PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU THR LEU SER LYS MET ASP
76 GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN ILE LEU THR SER MET PRO SER
91 ARG ASN VAL ILE GLN ILE SER ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG ASP
106 LEU LEU HIS VAL LEU ALA PHE SER LYS SER CYS HIS LEU PRO TRP
121 ALA SER GLY LEU GLU THR LEU ASP SER LEU GLY GLY VAL LEU GLU
136 ALA SER GLY TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU GLN
151 GLY SER LEU GLN ASP MET LEU TRP GLN LEU ASP LEU SER PRO GLY
166 CYS END

FIG. 6

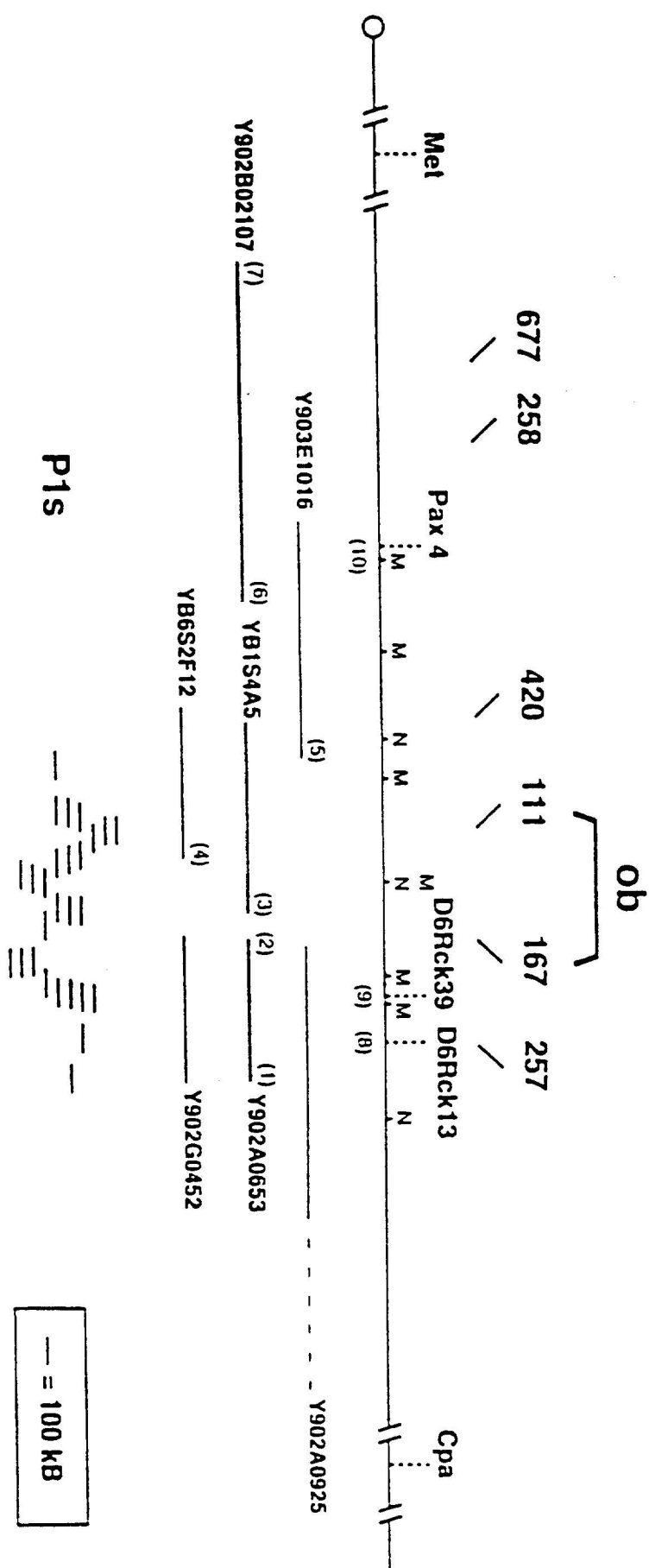


FIG. 7

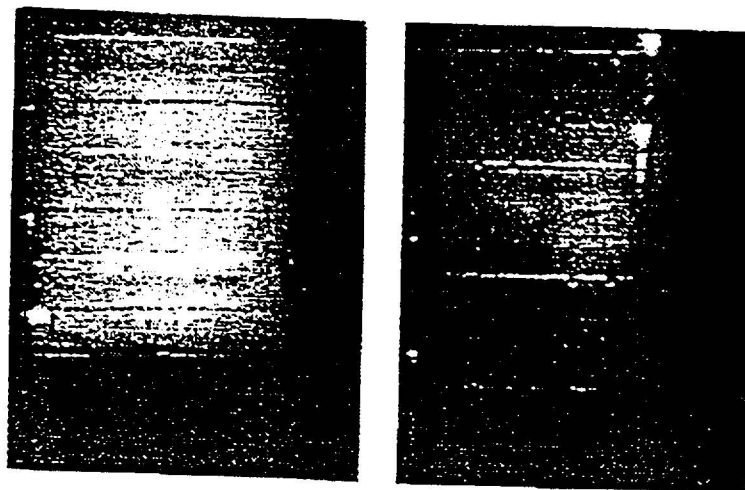


FIG. 8

1 2 3 4 5 6 7

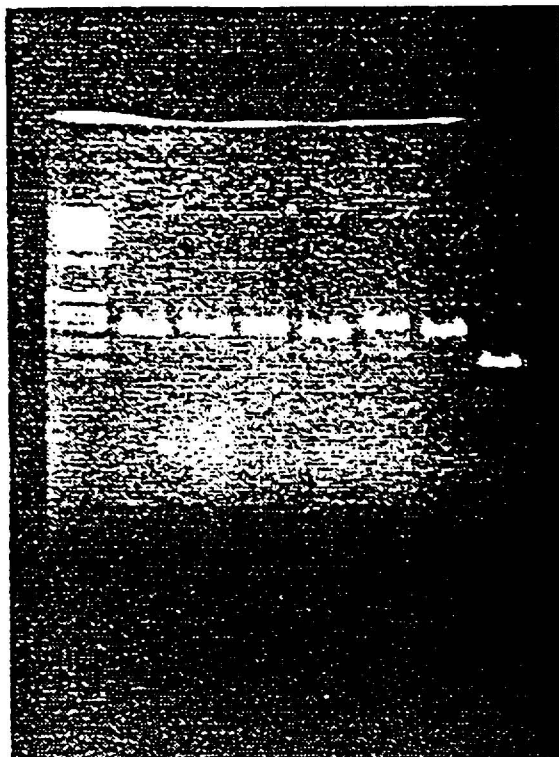


FIG. 9

+10 +20 +30 +40
 GTGCAAGAAG AAGAAGATCC CAGGGCAGGA AAATGTGCTG GAGACCCCTG

 CACGTTCTTC TTCTTCTAGG GTCCCGTCTT TTTACACGAC CTCTGGGGAC

	+10	+20	+30	+40
TGTCGGGTCC	NGTGGNTTIG	GTCCATCTCG	TCTTAATGNC	AAGCAGTGCC
-----	?-----	-----	-----	-----
ACAGCCCAGG	NCACCNAAAC	CAGGATAGAC	AGAATACANG	TTCGTCAAGG
-----	?-----	-----	-----	-----

+10 +20 +30 +40
 TATCCAGAAA GTCCAGGATG ACACCAAAG CCTCATCAAG ACCATTGTCA

ATAGGTCITT CAGGTCCTAC TGTGGTTTTT GGAGTAGTTC TGGTAACAGT

	+10	+20	+30	+40
NCAGGATCAC		TGANATTCA	CACAGG	
?-----		-----?	-----	
NGTCCTAGTG		ACTNTAAAGT	GTGTGC	

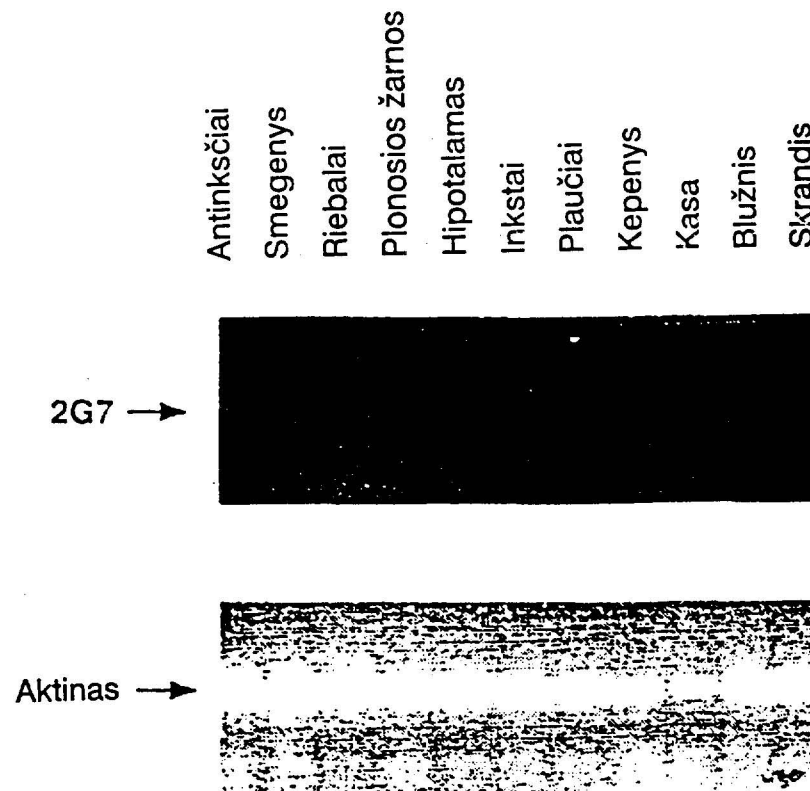


FIG. 11A

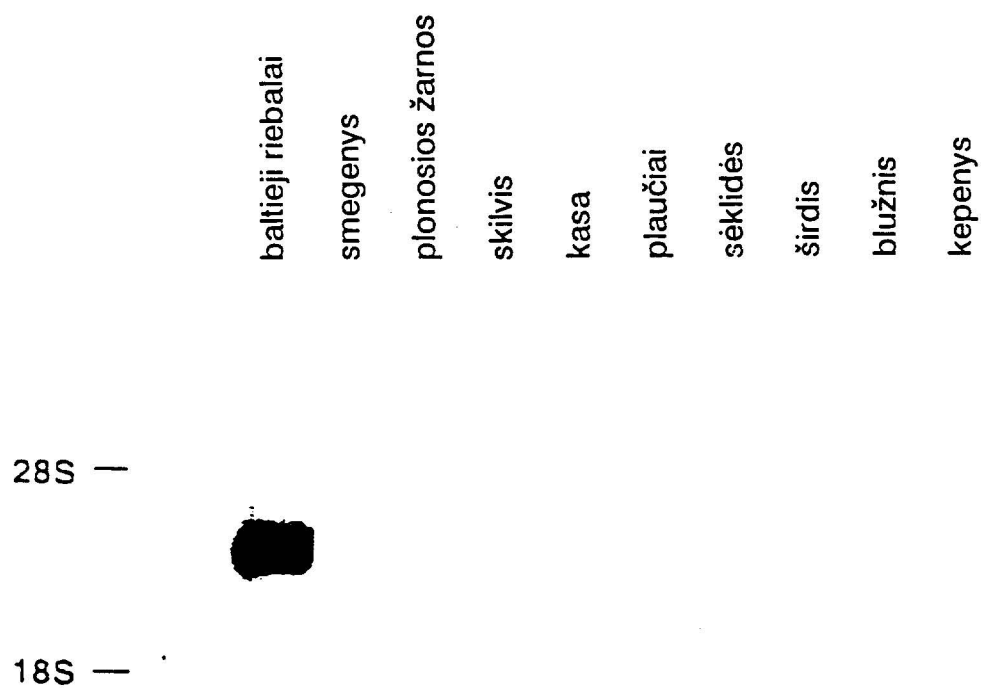


FIG. 11B

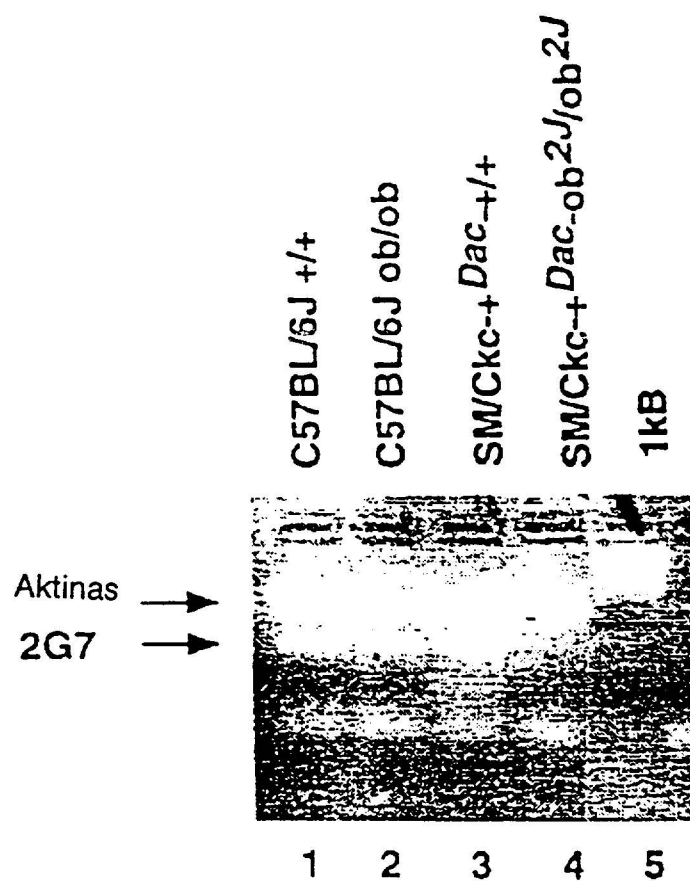


FIG. 12A

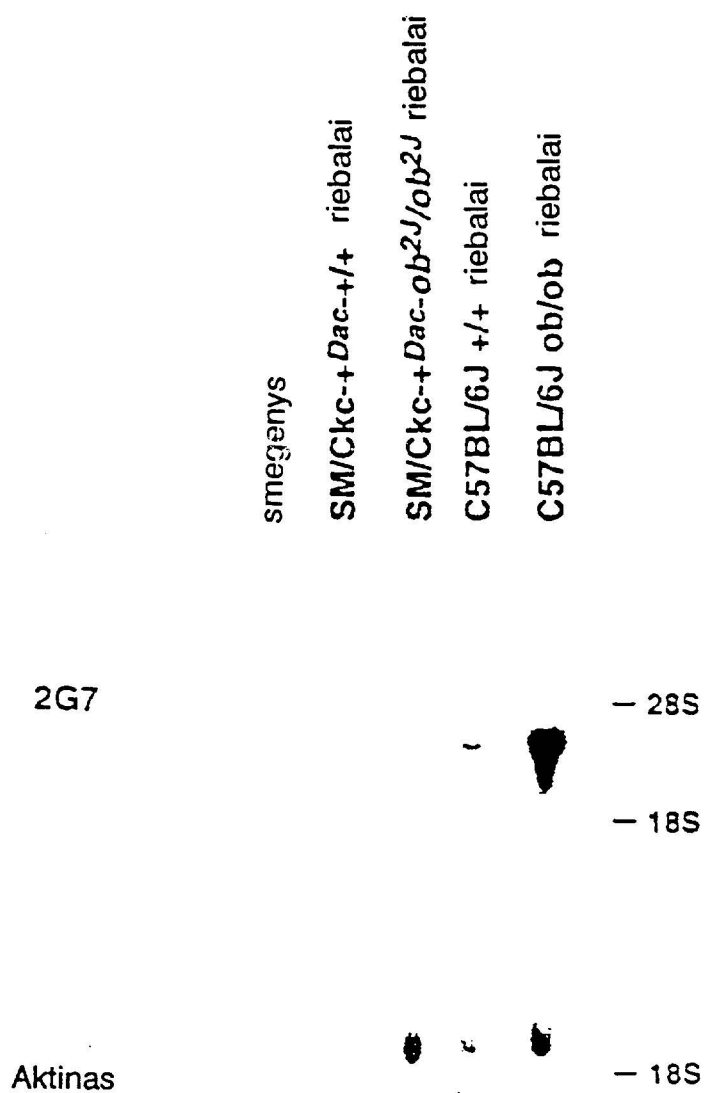


FIG. 12B

2G7

ap2

SM/Ckc-+ *Dac-ob^{2J}/ob^{2J}*

SM/Ckc-+ *Dac-+/?*

SM/Ckc-+ *Dac-ob^{2J}/ob^{2J}*

SM/Ckc-+ *Dac-+/?*

SM/Ckc-+ *Dac-ob^{2J}/ob^{2J}*

SM/Ckc-+ *Dac-+/?*

SM/Ckc-+ *Dac-+/?*

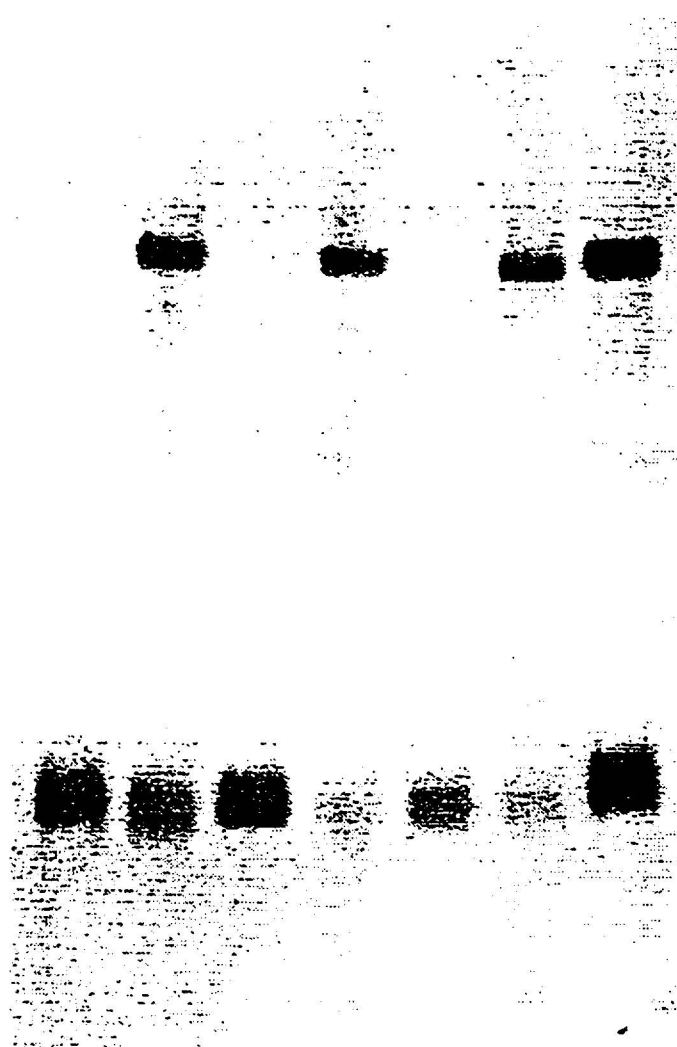


FIG. 13

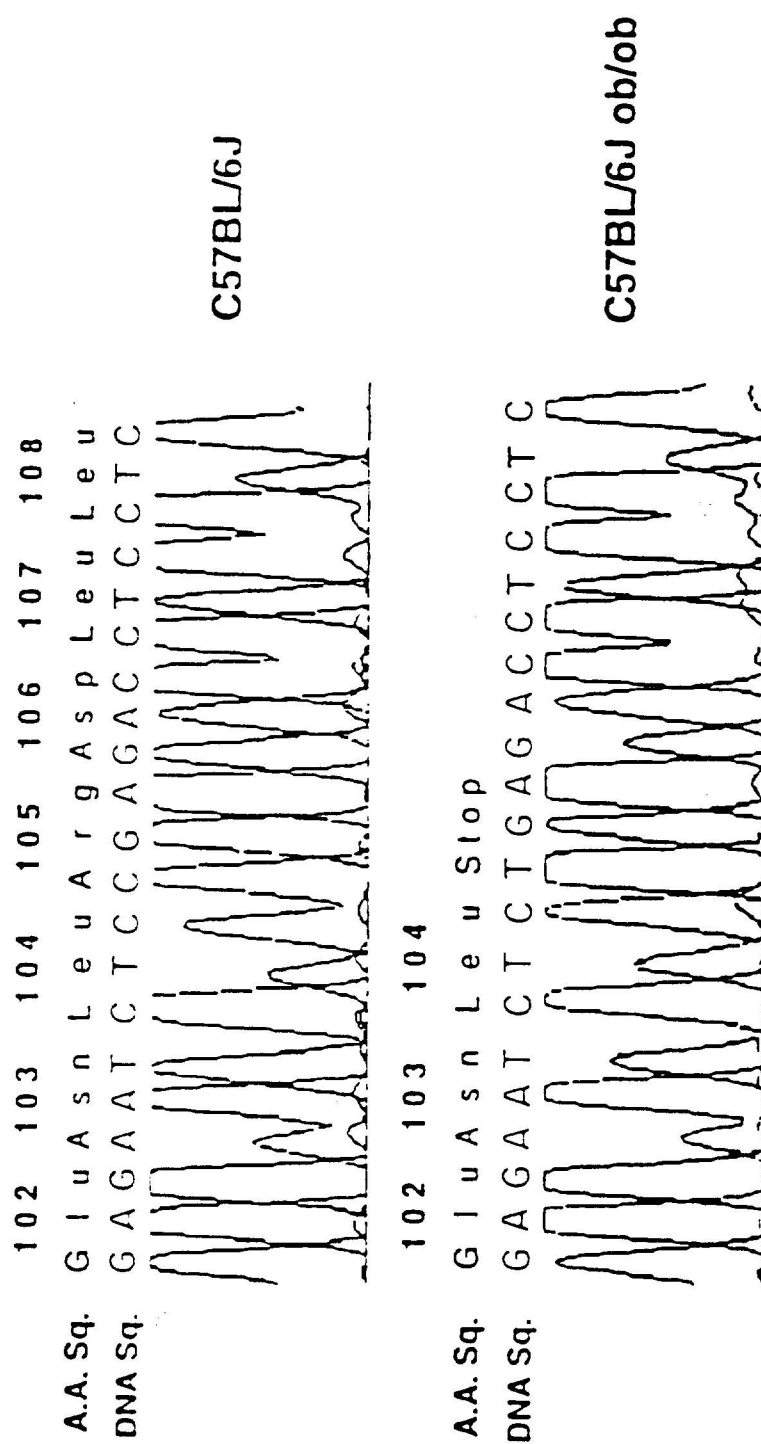


FIG. 14

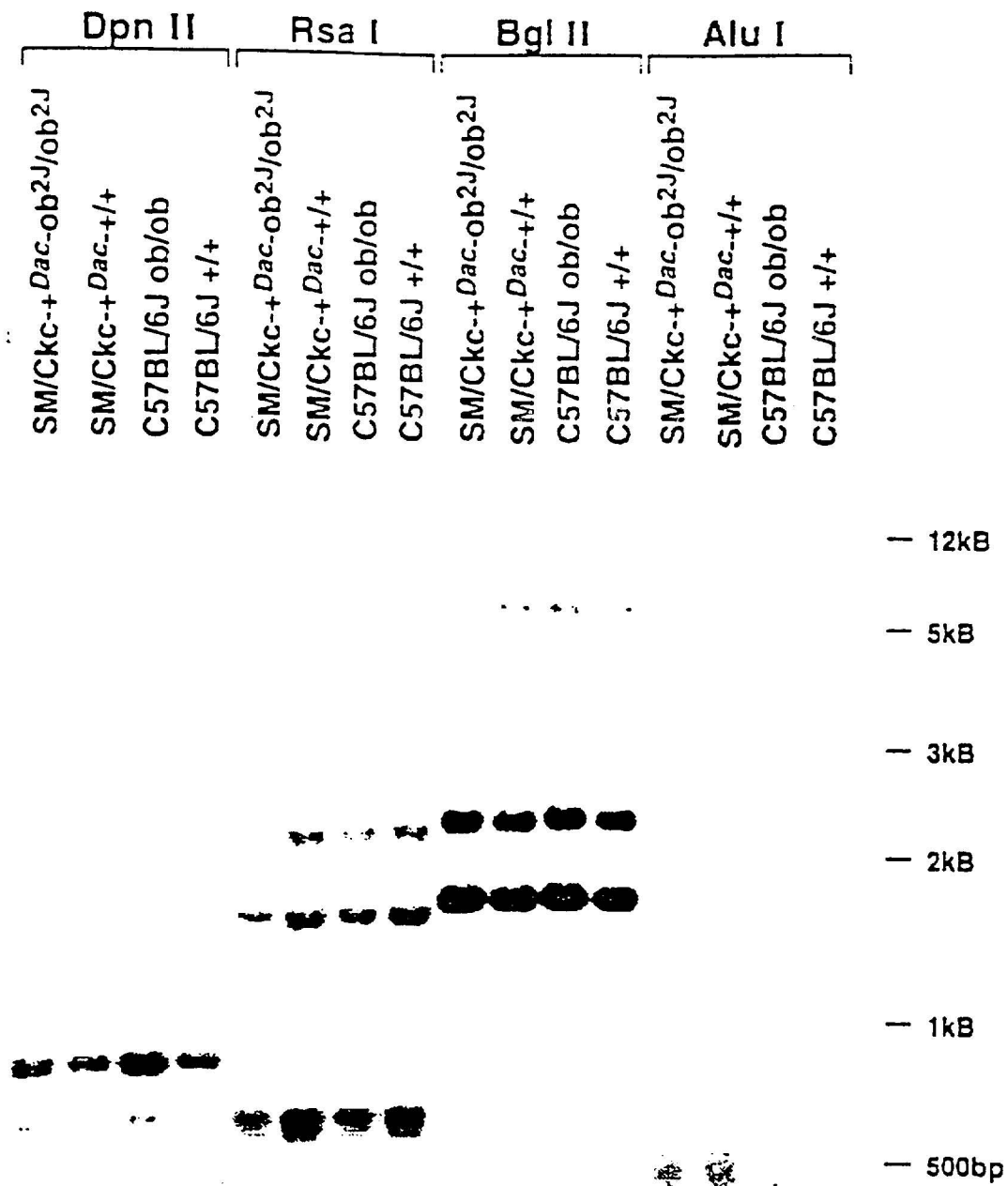


FIG. 15A

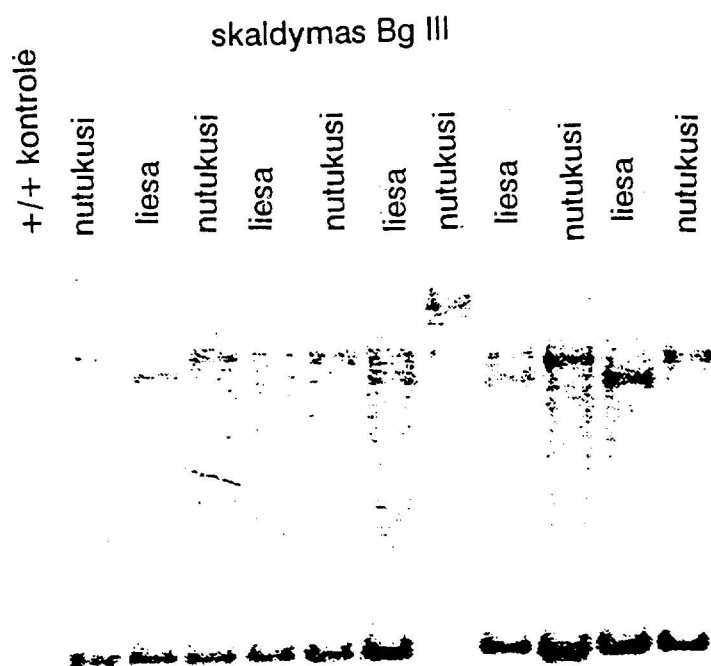


FIG. 15B

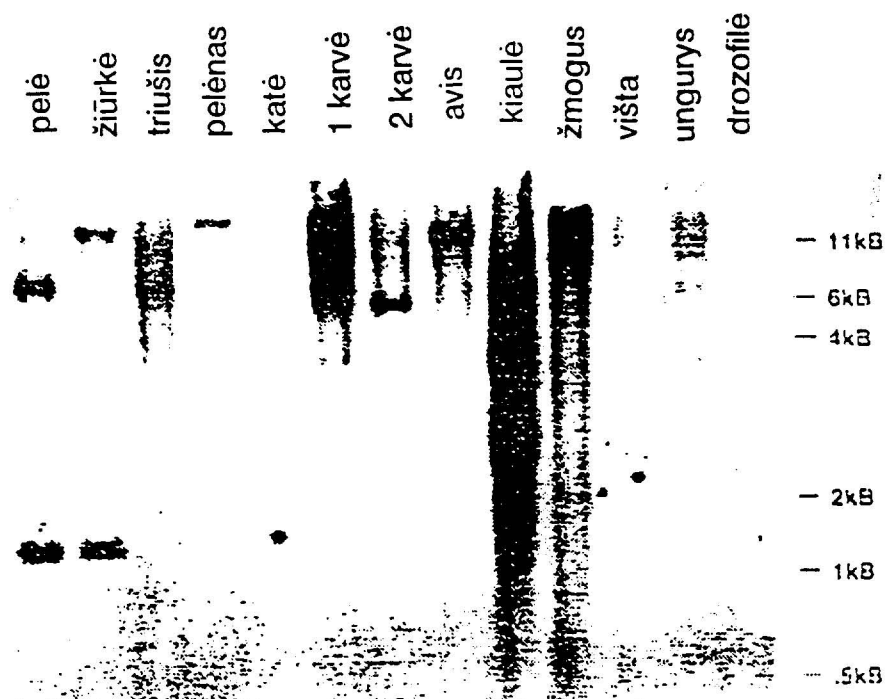


FIG. 16

T7 promotoriaus pradmuo 69348-1

----->

T7 promotorius

----->

LAC operatorius

XbaI

BglII
AGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTACA

RBS NcoI

HIS-TAG

AATAATTGTTTAACTTTAAGAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGC
METGLYSERSEHISHISHISHISSESRGLY

NdeI XhoI BamHI

CTGGTCCCGCGGCAGCCATATGCTCGAGGATCCCGCTGCTAACAAAGCCGAAAGCTGAGTTGGCT
LEUVALPROARGGLYSERHISMETLEUGLUASPPROALAAASNLYSALAARGLYSGLUALAGLULEUALA

trombinas

BpuI1021

T7 TERMINATOR

GCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTG
ALAALATHRALAGLUGLNEND

<-----

T7pabaigos pradmuo #69337-1

LT 4265 B

FIG. 17

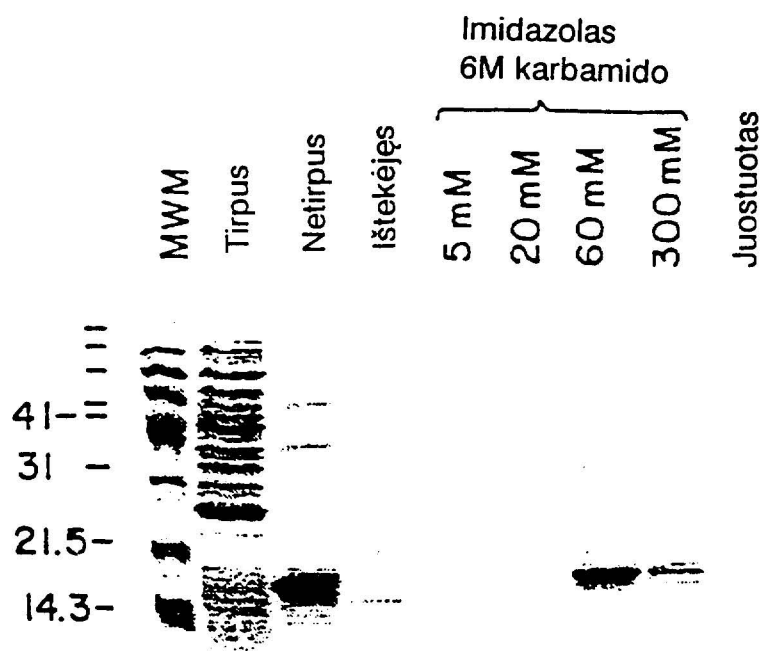


FIG. 18A

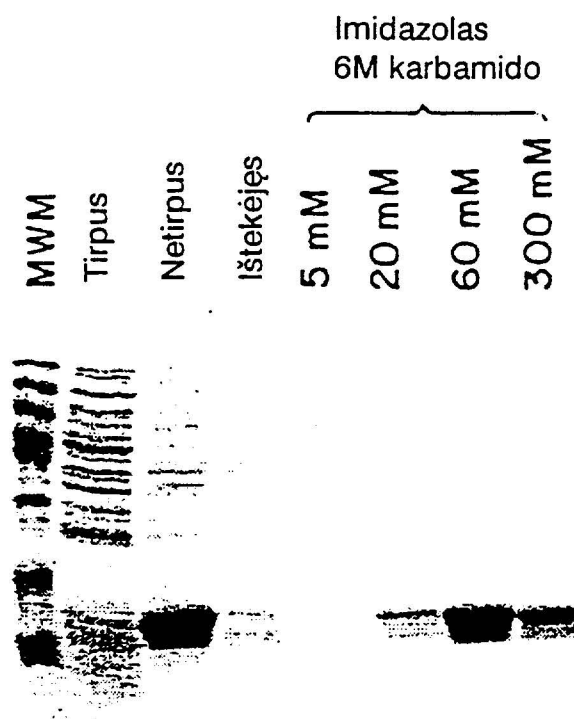


FIG. 18B

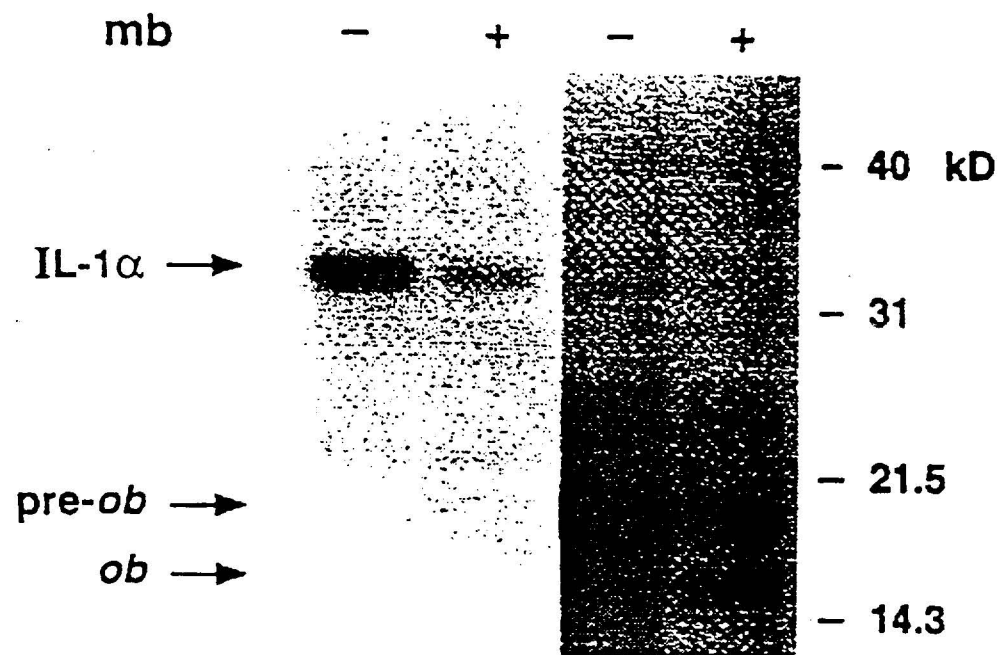


FIG. 19A

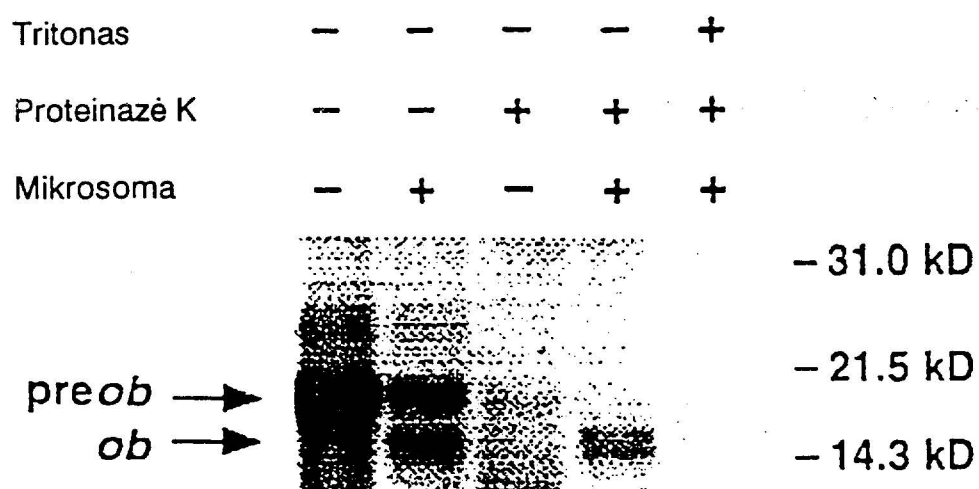
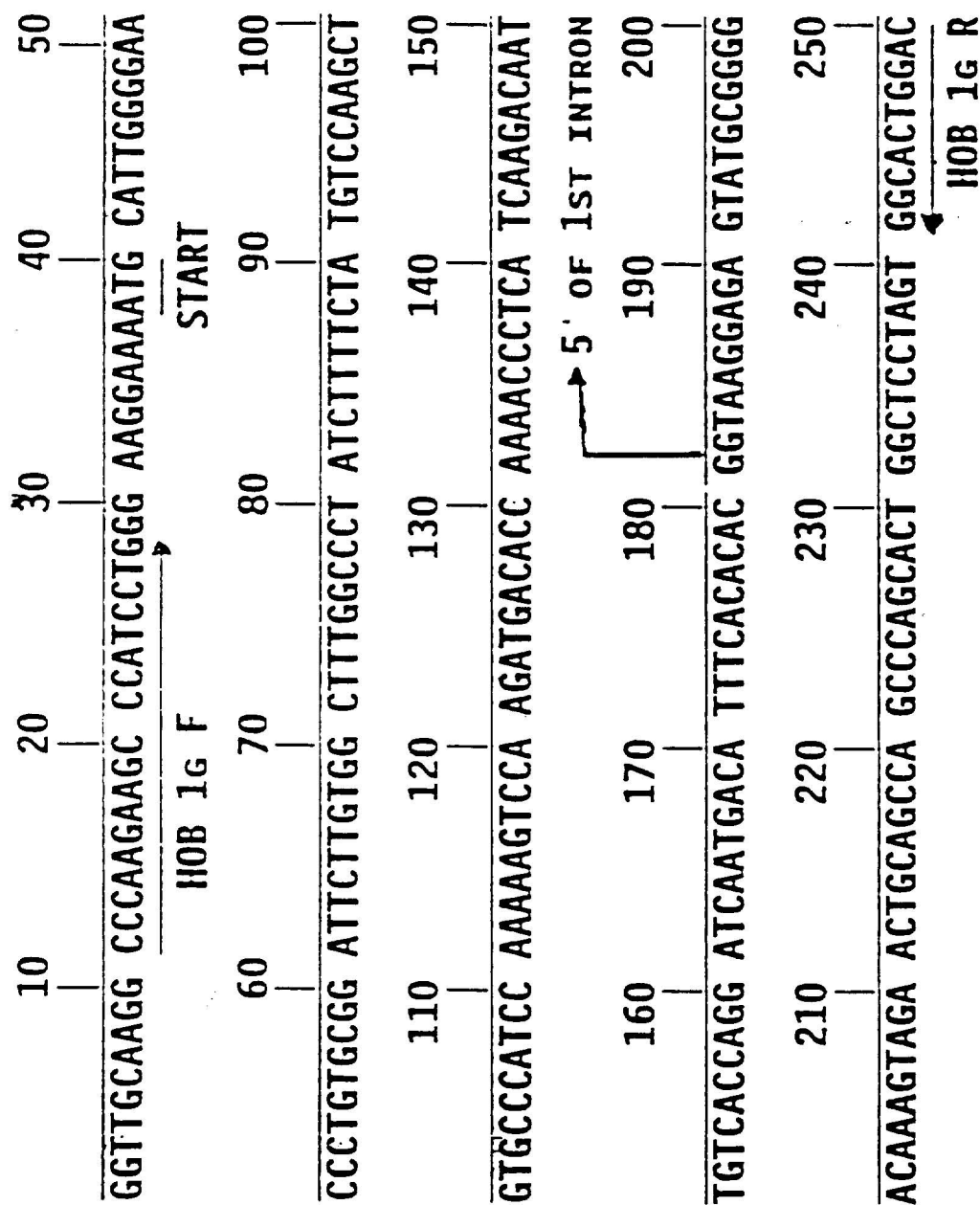


FIG. 19B

FIG. 20A



260	270	280	290	300
<u>CCAGATAGTC CAAGAAACAT TTAITGAACG CCTCCTGAAT GCCAGGCACC</u>				
310	320	330	340	350
<u>TACTGGAAGC TGAGAAGGAT TTGGATAGC ACAGGGCTCC ACTCTTCTG</u>				
360	370	380	390	400
<u>GTIGTTTCT NTGGCCCCCT CTGCTGCTG AGATNCCAGG GGTAGNGGT</u>				
410	420	430	440	450
<u>TCTTAATTC TAA-----CT</u>				
GAP OF SEQUENCE (~1.4 KB)				
460	470	480	490	500
<u>GGTTCCTTCA GGAAGAGGCC ATGTAAGAGA AAGGAATTGA CCTAGGGAAA</u>				

FIG. 20B

510	520	530	540	550
<u>ATTGGCCTGG GAAGTGGAGG GAACGGATGG TGTGGGAAA GCAGGAATCT</u>				
560	570	580	590	600
<u>CGGAGACCAG CTTAGAGGCT TGGCAGTCAC CTGGGTGCAG GANACAAGGG</u>				
610	620	630	640	650
<u>CCTGAGCCAA AGTGGTGAGG GAGGGTGGA GGAGACAGCC CAGAGAATGA</u>				
660	670	680	690	700
<u>CCCTCCATGC CCACGGGGAA GGCAGAGGGC TCTGAGAGCG ATTCTCTCCA</u>				
3' OF 1ST INTRON 4				
710	720	730	740	750
<u>CATGCTGAGC ACTTGTCTC CCCTCTCTC CTNCATAGCA GTCAGTCTCC</u>				
HOB 2G F				

FIG. 20C

760	770	780	790	800
TCCAACAGA	AAGTCACCGG	TTTGACTTC	ATTCTGGGC	TCCACCCAT
810	820	830	840	850
CCTGACCTTA	TCCAAGATGG	ACCAGACACT	GGCAGTCTAC	CAACAGATCC
860	870	880	890	900
TCACCAGTAT	GCC TTCAGA	AACGTGATCC	AAATATCCA	CGACCTGGAG
910	920	930	940	950
AACTCCGGG	ATCTTCTTA	CGTGTGGCC	TTCTCTAAGA	GCTGCCACTT
960	970	980	990	1000
GCCCTGGGCC	AGTGCCCTGG	AGACCTTGA	CAGCCTGGGG	GGTGTCTTGG

FIG. 20D

FIG. 20E

1010	1020	1030	1040	1050
<u>AAGCTTCAGG</u> C T A C T C C A C A G A G G T G G G C C C T G A G C A G G C T G C A G G G G				
1060	1070	1080	1090	1100
<u>TCTCTGCAGG</u> A C A T G C T G T G G C A G C T G G A C C T C A G C C C T G G T G C T G A G G				
STOP				
1110	1120	1130	1140	1150
<u>CC TTGAAGGT</u> C A C T C T T C C T G C A A G G A C T A C G T T A A G G A A G G A A C T C T G				
1160	1170	1180	1190	1200
<u>GCTTTCCAGG</u> T A T C T C C A G G A T T G A A G A G C A T T G C A T G G A C A C C C C T T A T				
HOB 2G R				
1210	1220	1230	1240	1249
<u>CCAGGACTCT</u> G I C A A T T T C C C T G A C T C C T C T A A G C C A C T C T T C C A A A G G				

Pelēs OB struktūra

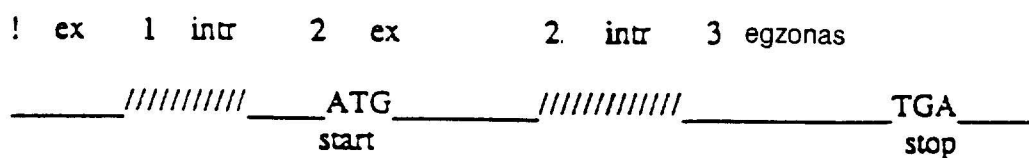


FIG. 20F

Žmogaus OB struktūra

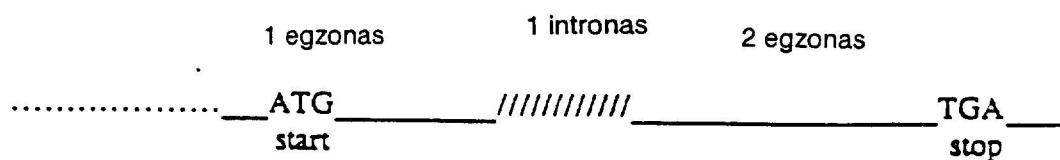


FIG. 20G

FIG. 21A

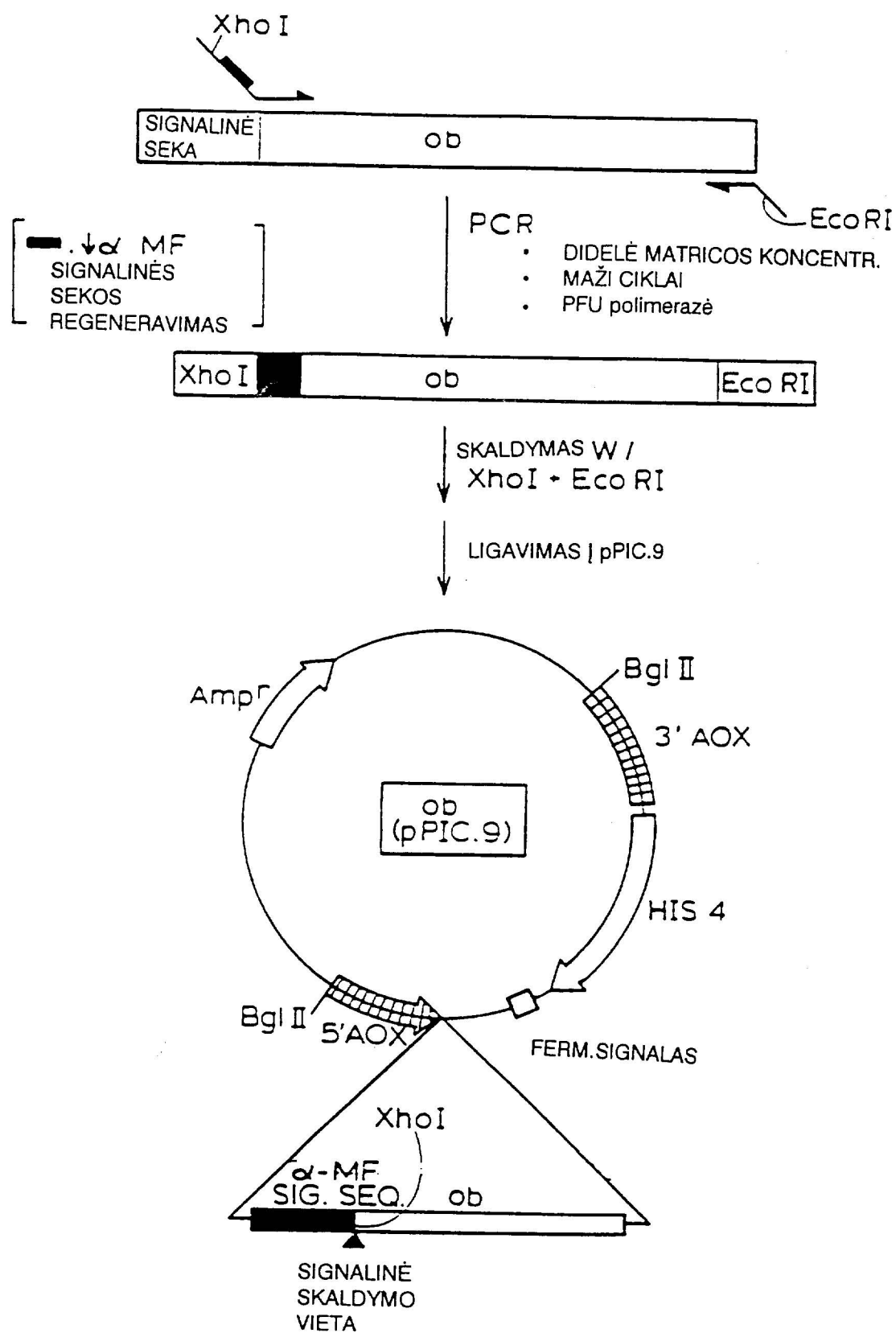


FIG. 21B

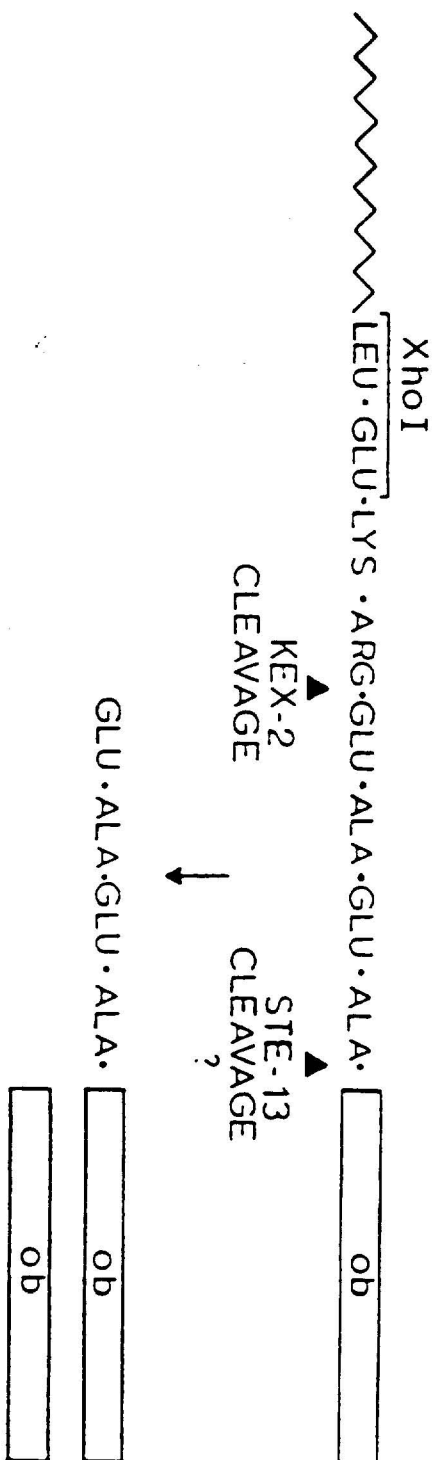


FIG. 21C

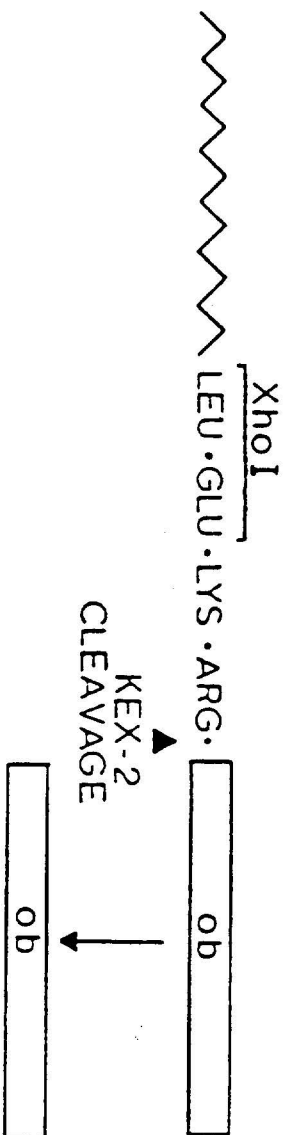
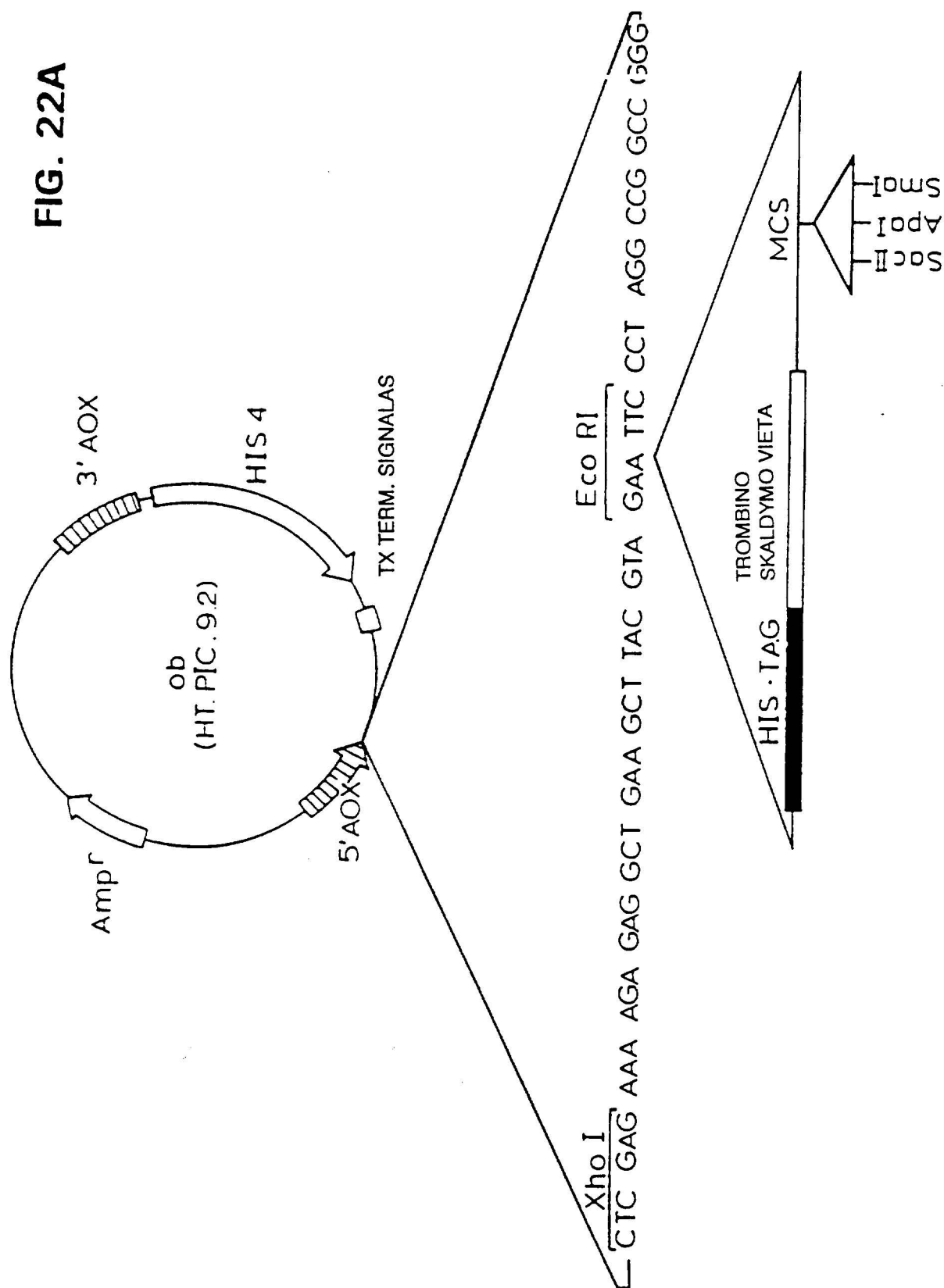


FIG. 22A



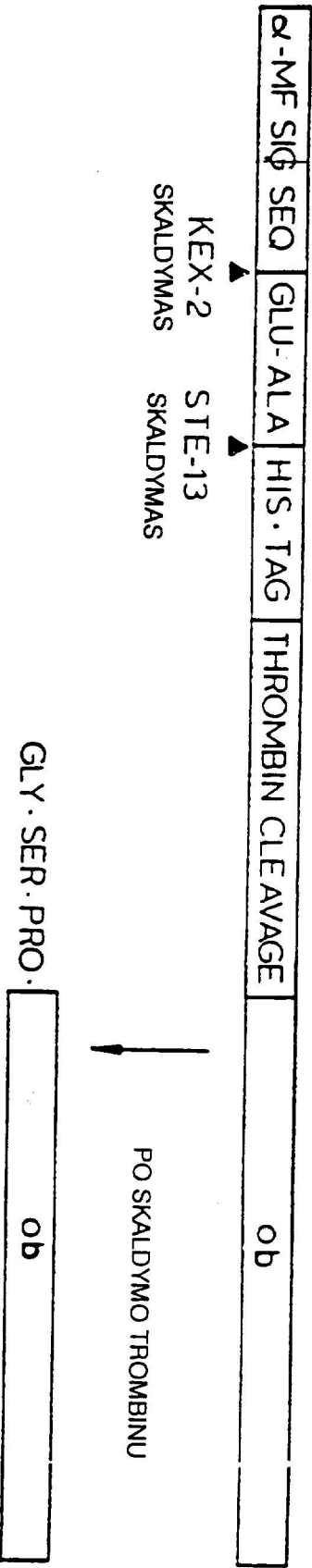


FIG. 22B

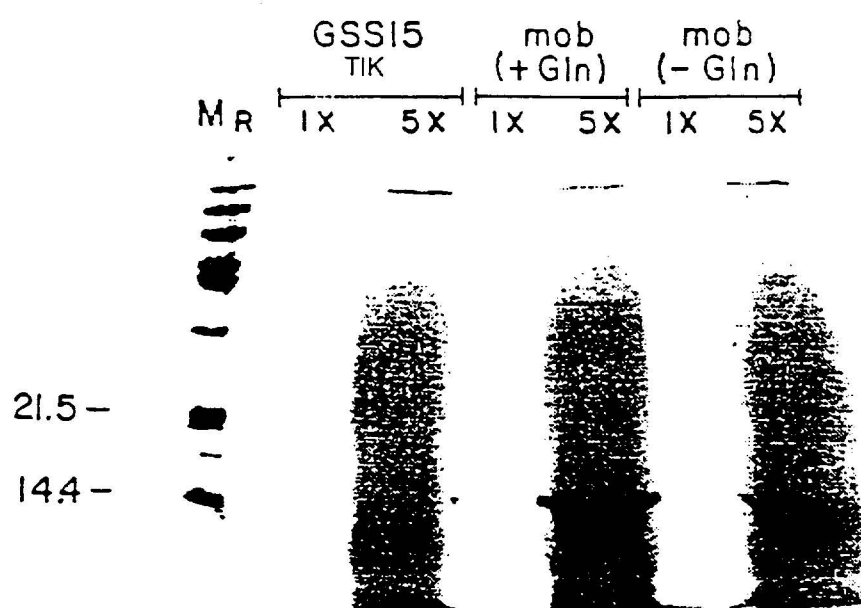


FIG. 23A

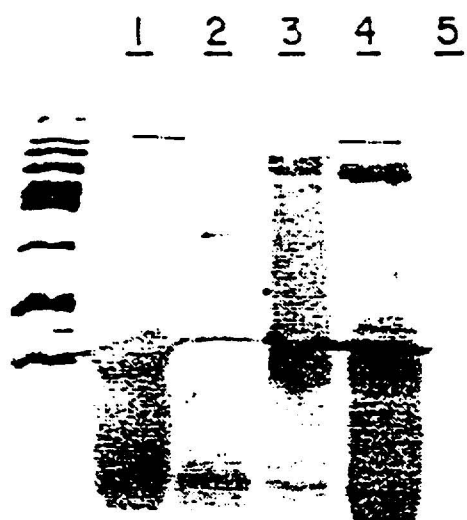


FIG. 23B

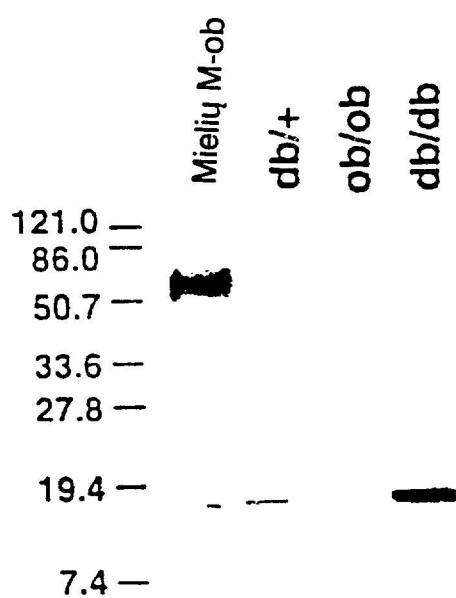


FIG. 24A

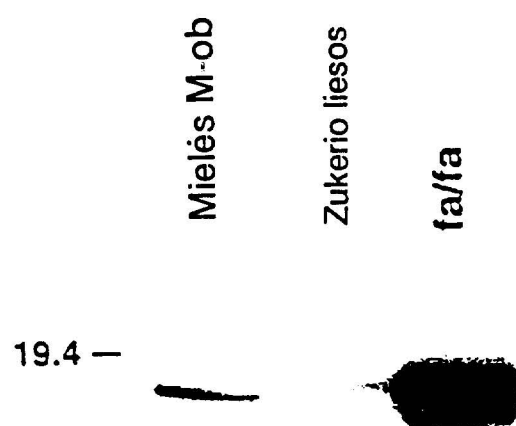


FIG. 24B

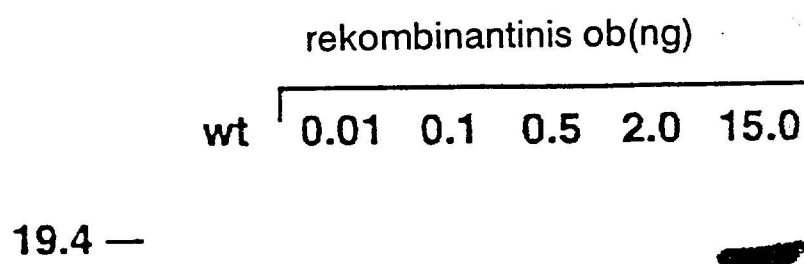


FIG. 24C

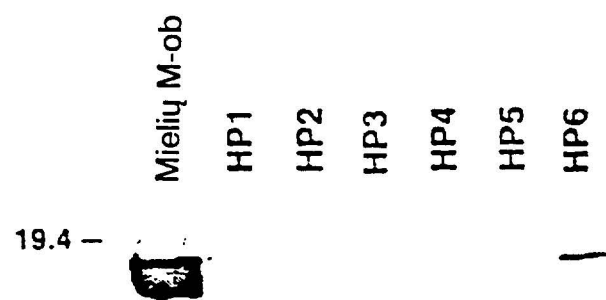
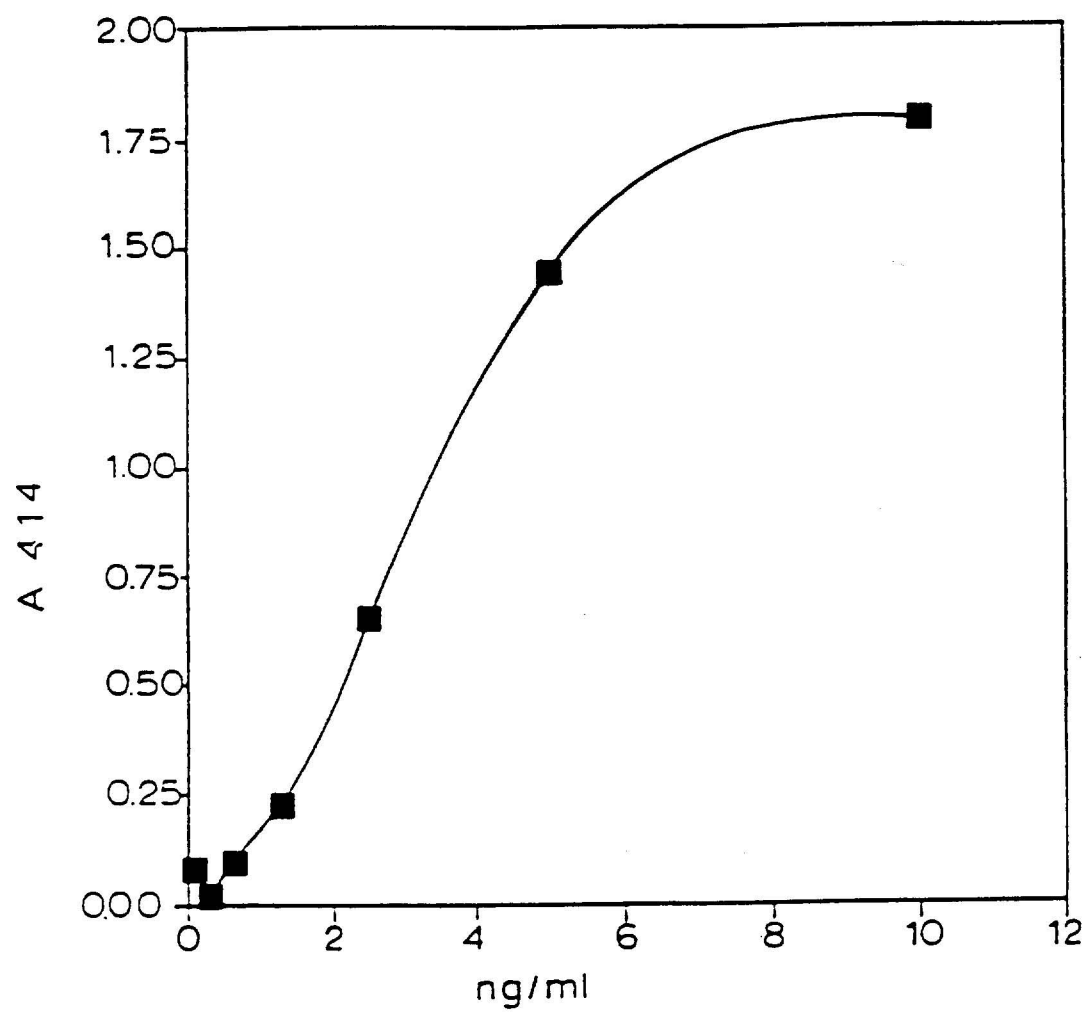


FIG. 25A

FIG. 25B



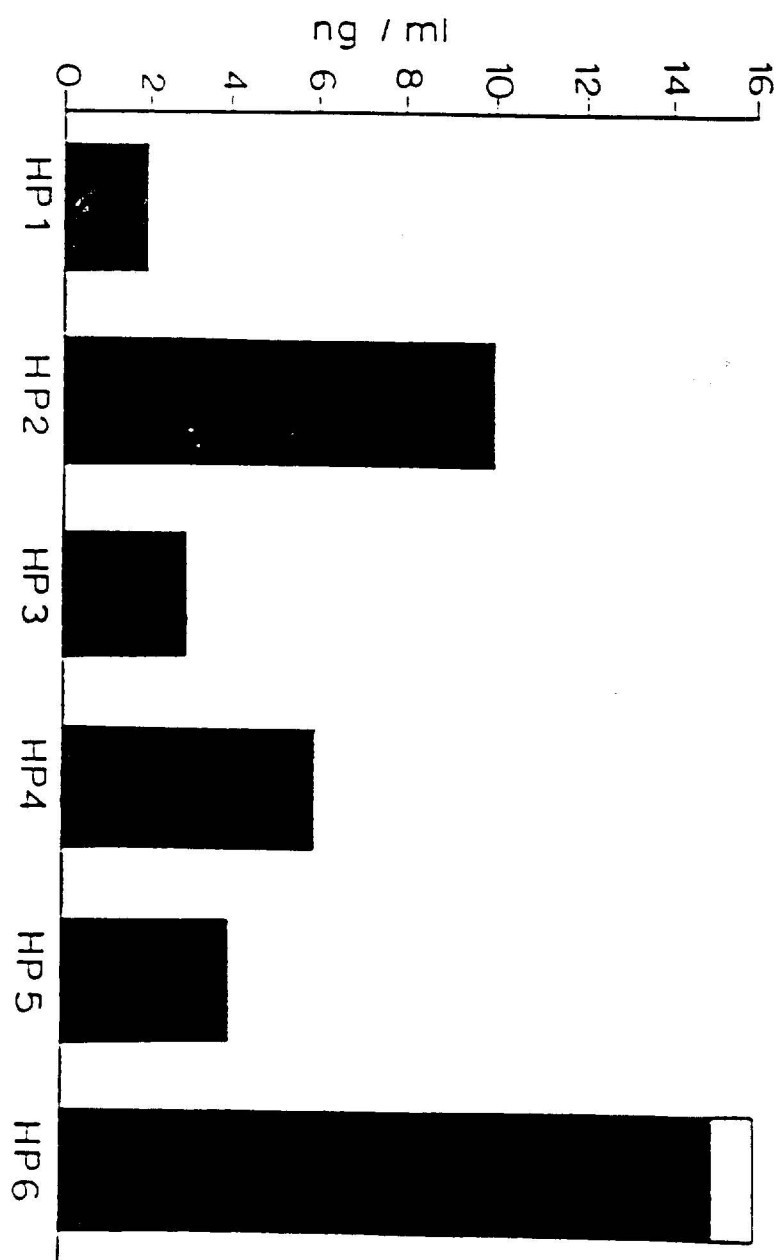


FIG. 25C

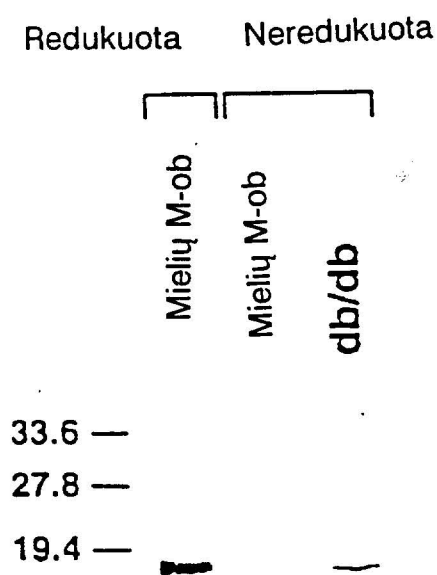
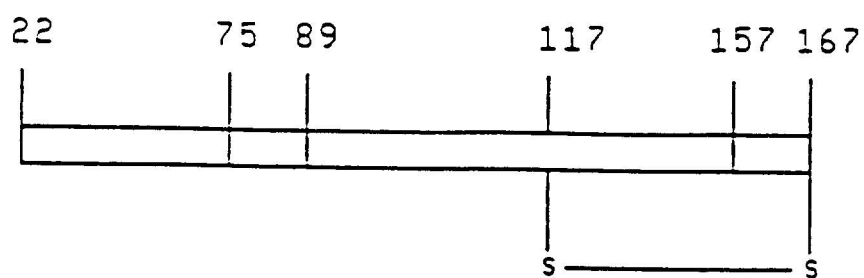


FIG. 26A

Žmogaus ob



Peptidas	Masė(DA)	
	Laukiama	Rasta
22-167	16,024	16,024 ± 3
22-75	5936.9	5936.6 ± 1
76-89	1562.7	N.D.
90-167	8434.5	8435.6 ± 1
158-167	1131.9	N.D.

FIG. 26B

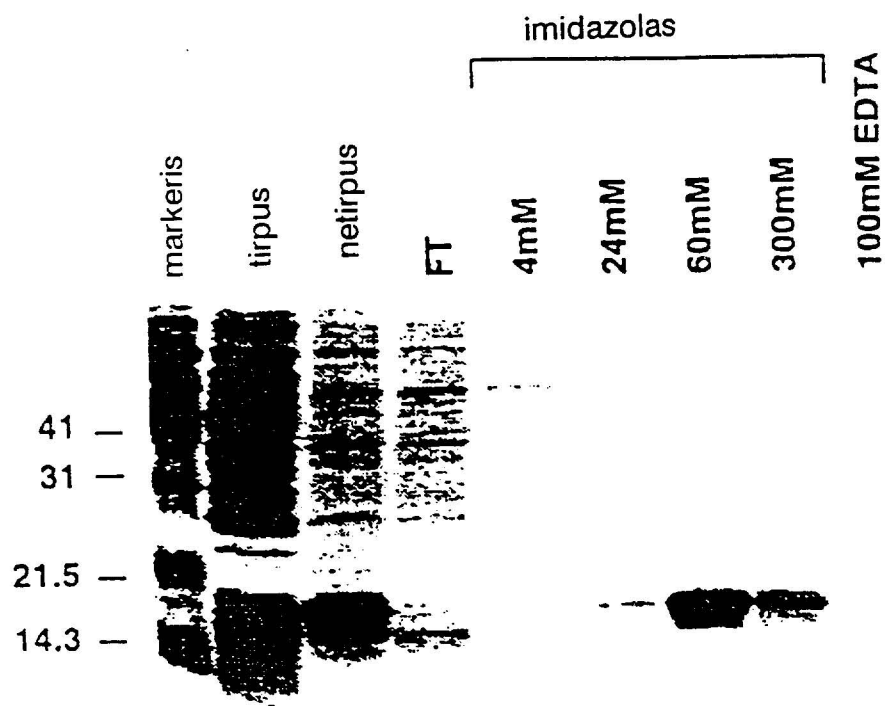


FIG. 27

ob/ob

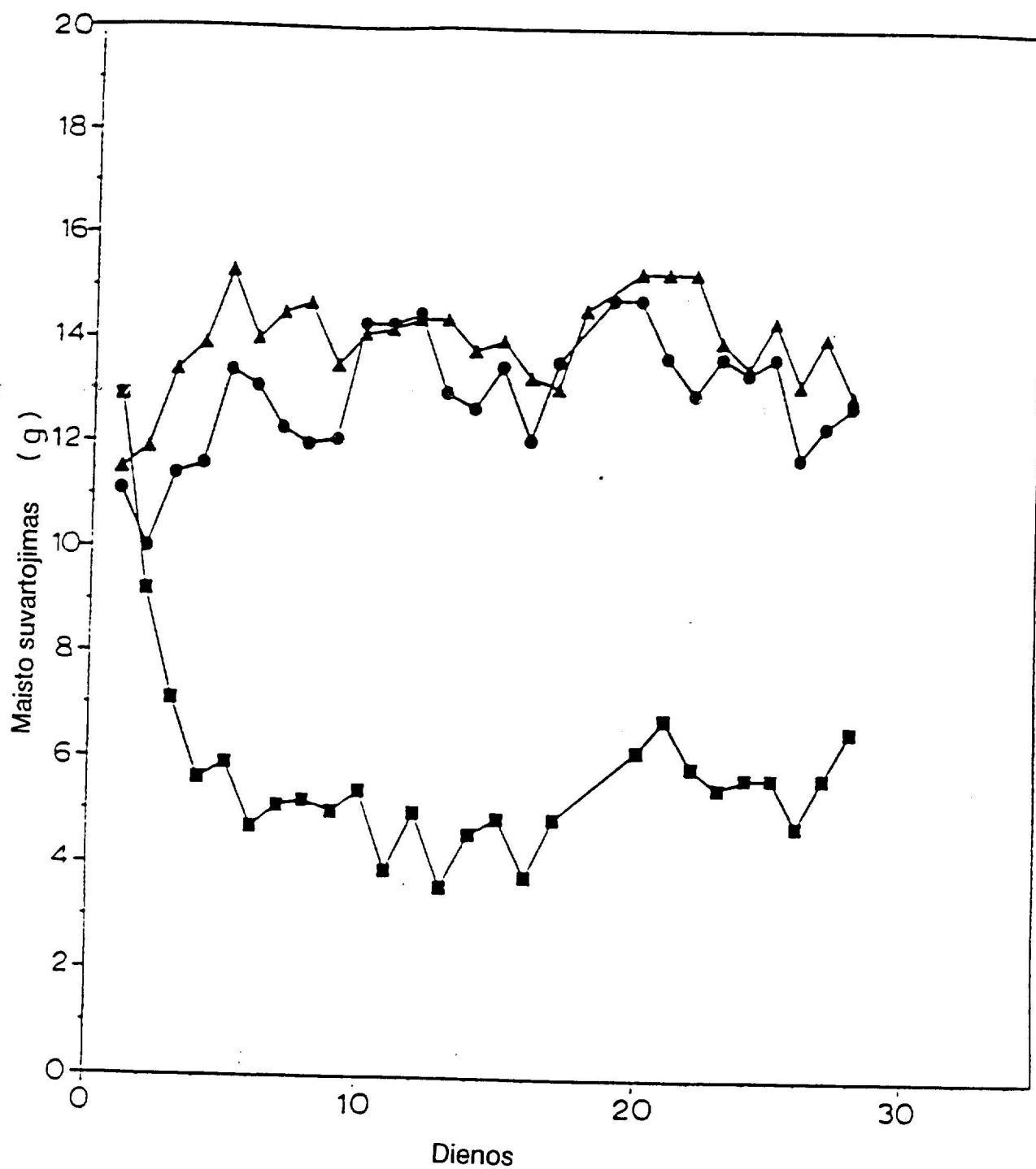


FIG. 28A

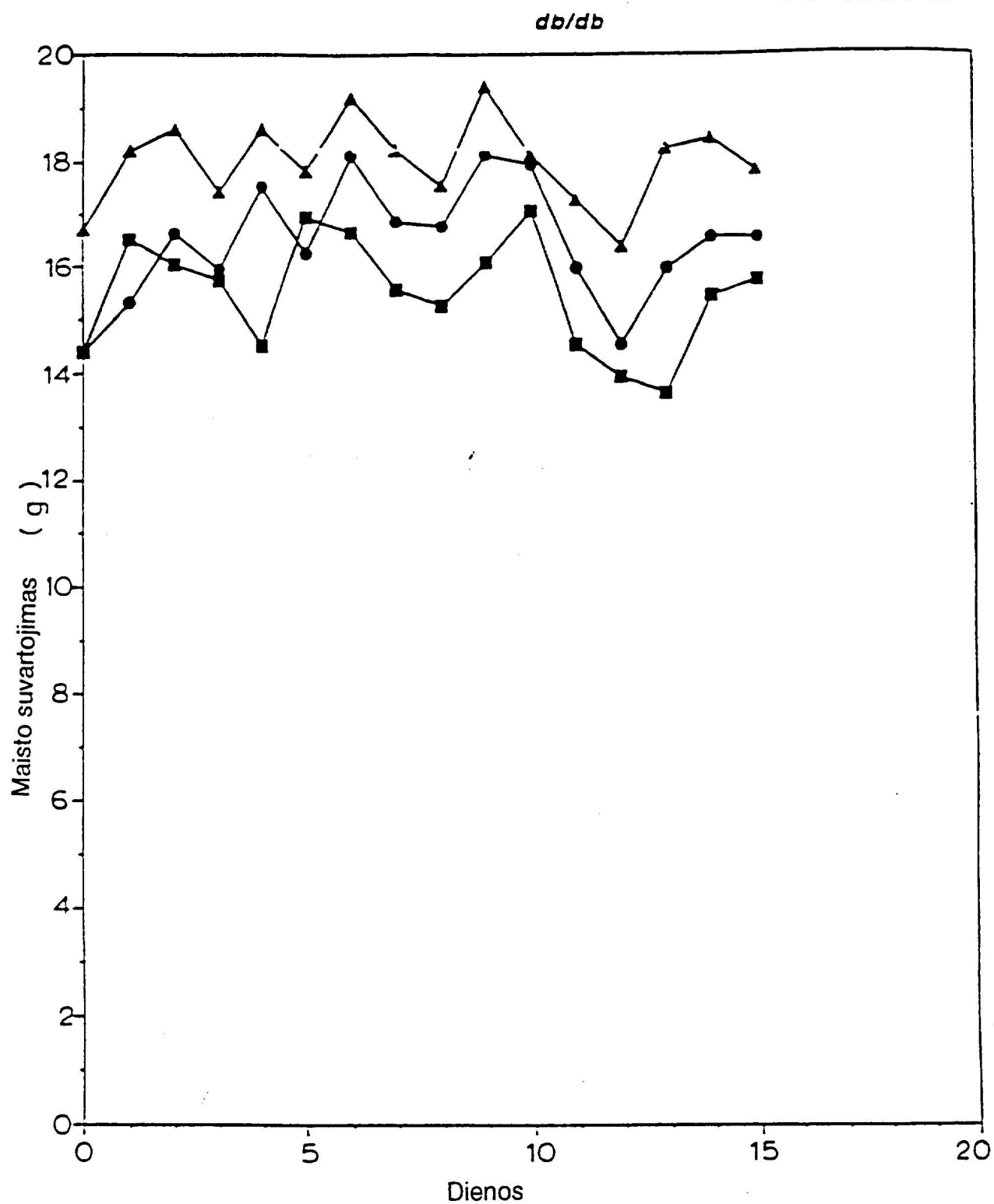


FIG. 28B

CBA/J

LT 4265 B

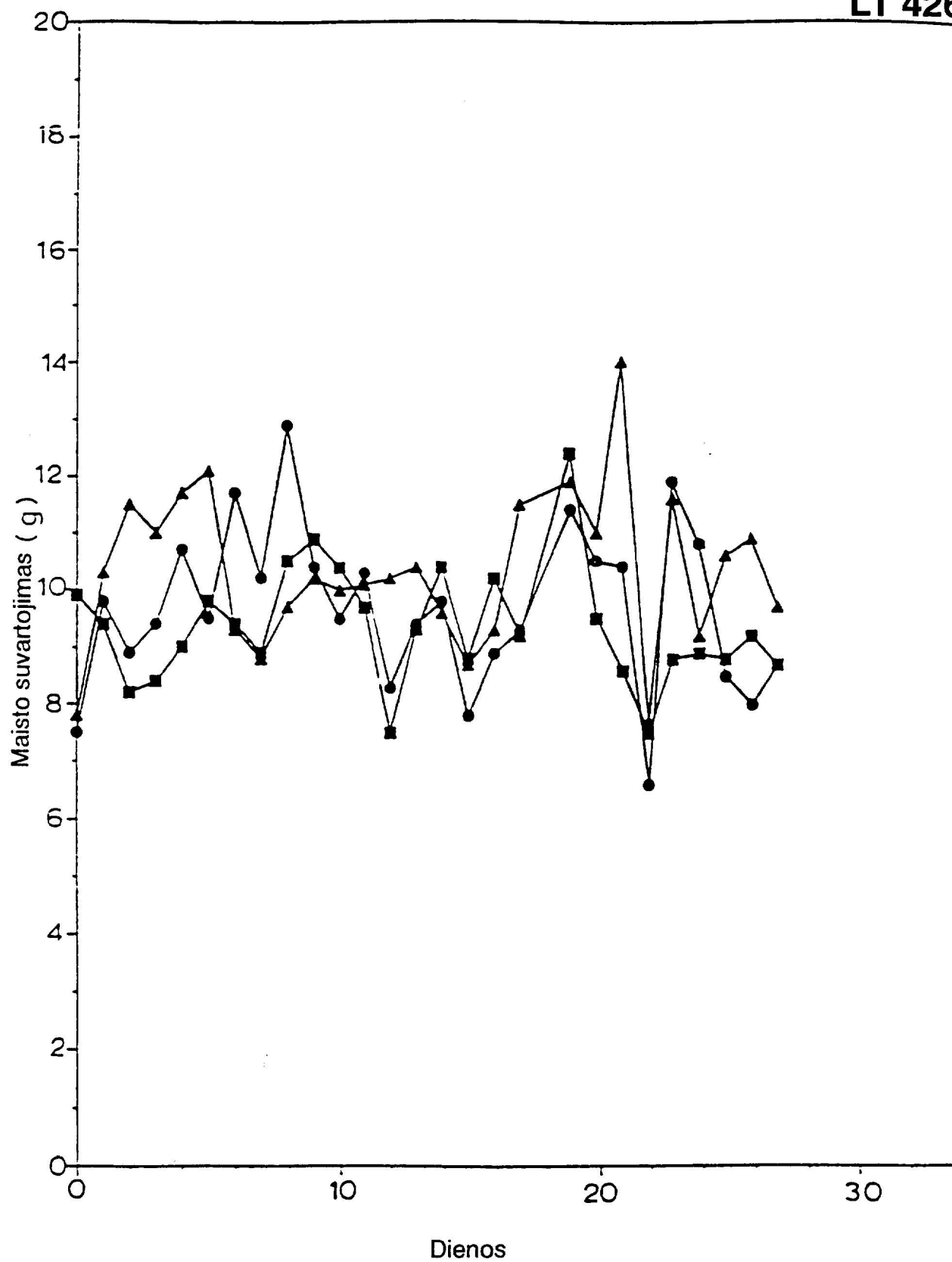


FIG. 28C

ob/ob

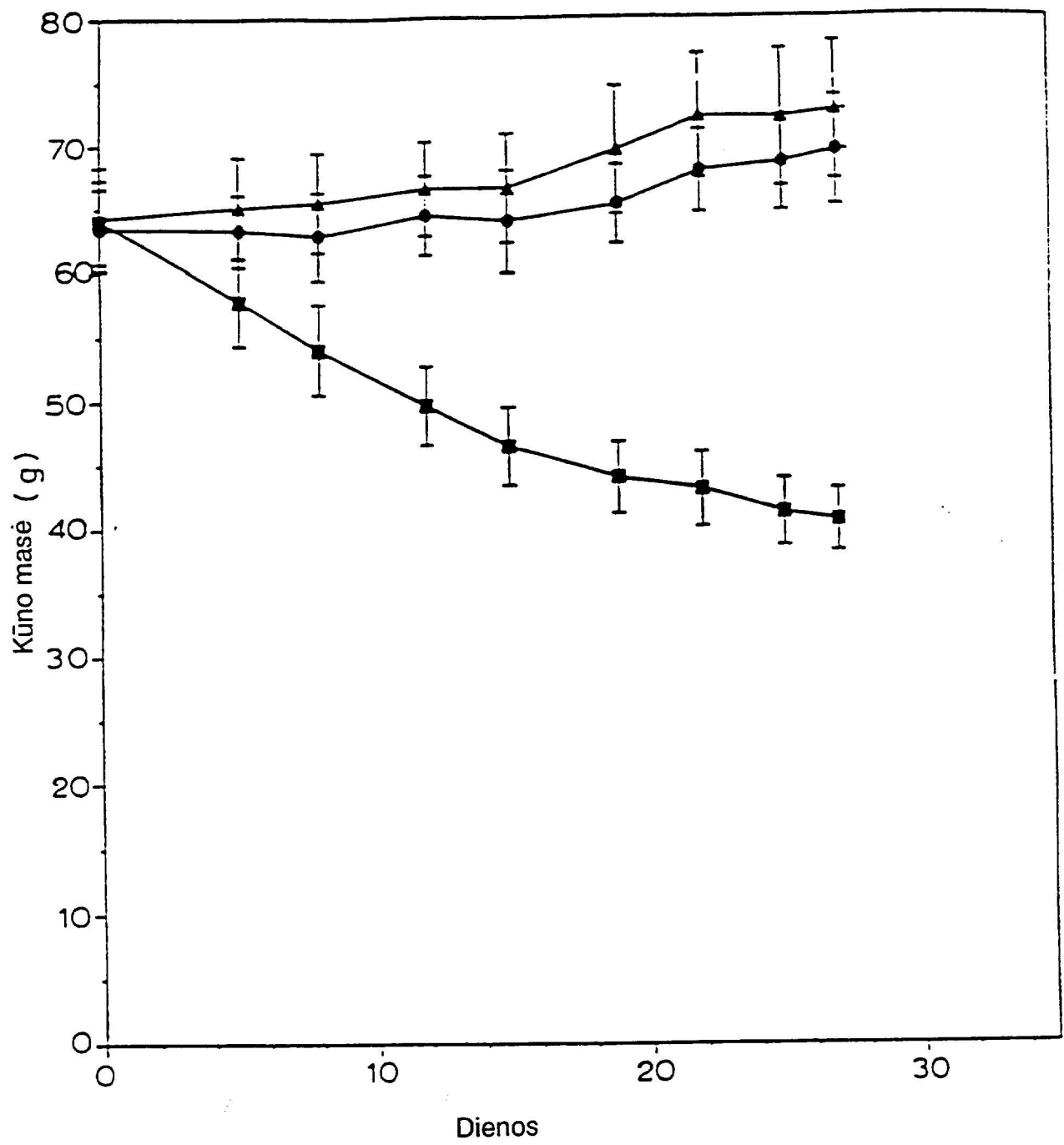


FIG. 28D

db/db

LT 4265 B

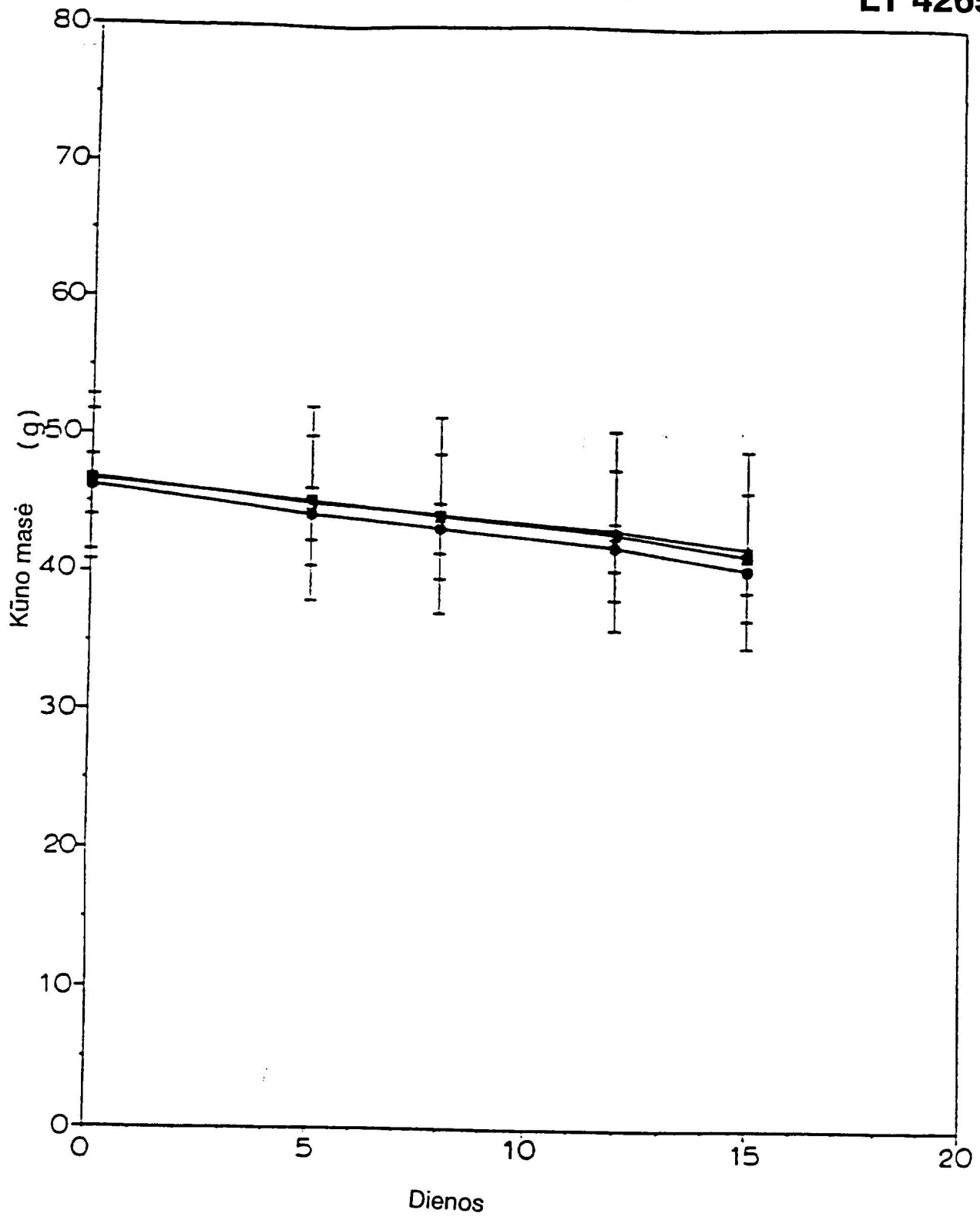


FIG. 28E

CBA/J

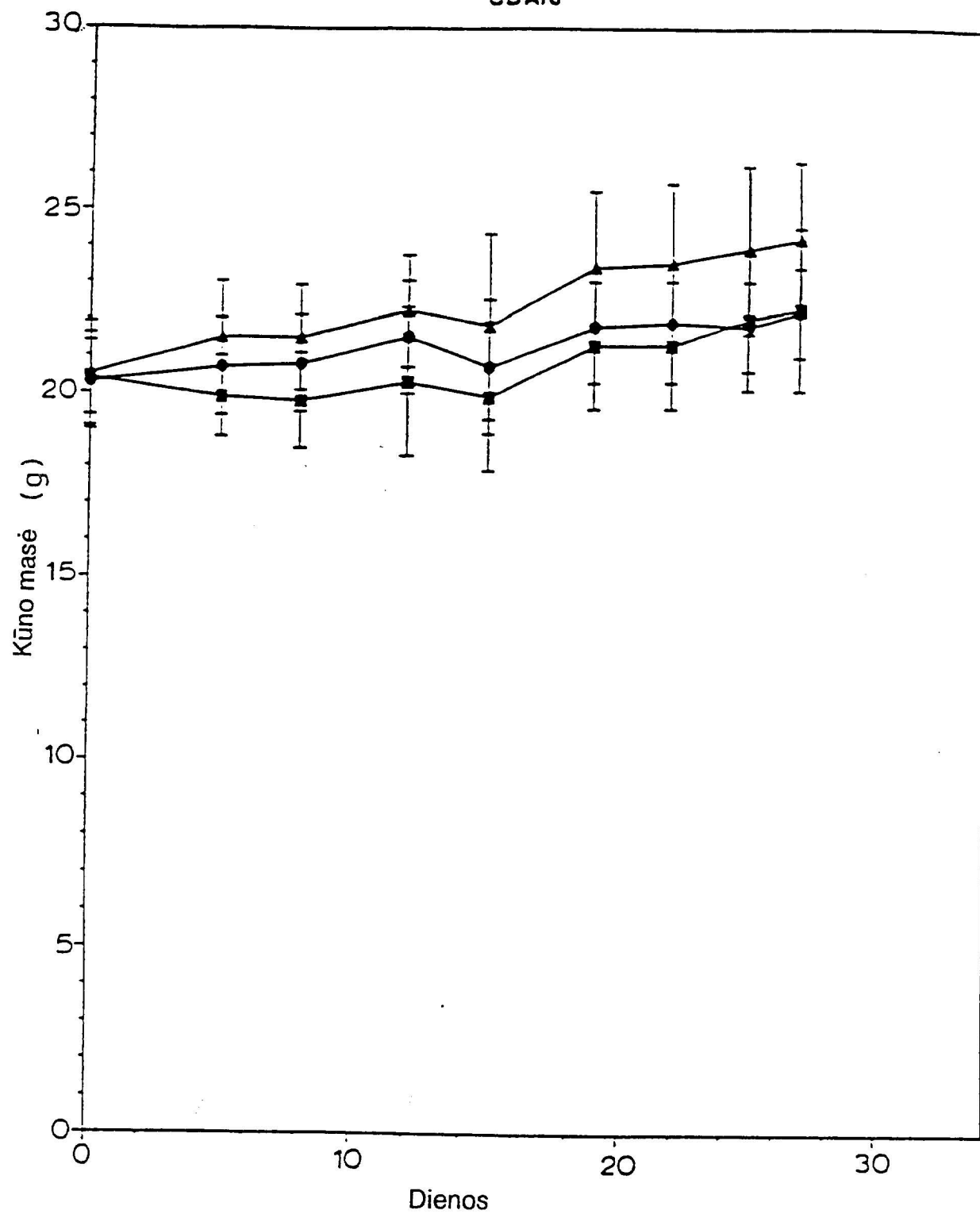


FIG. 28F

FIG. 29A

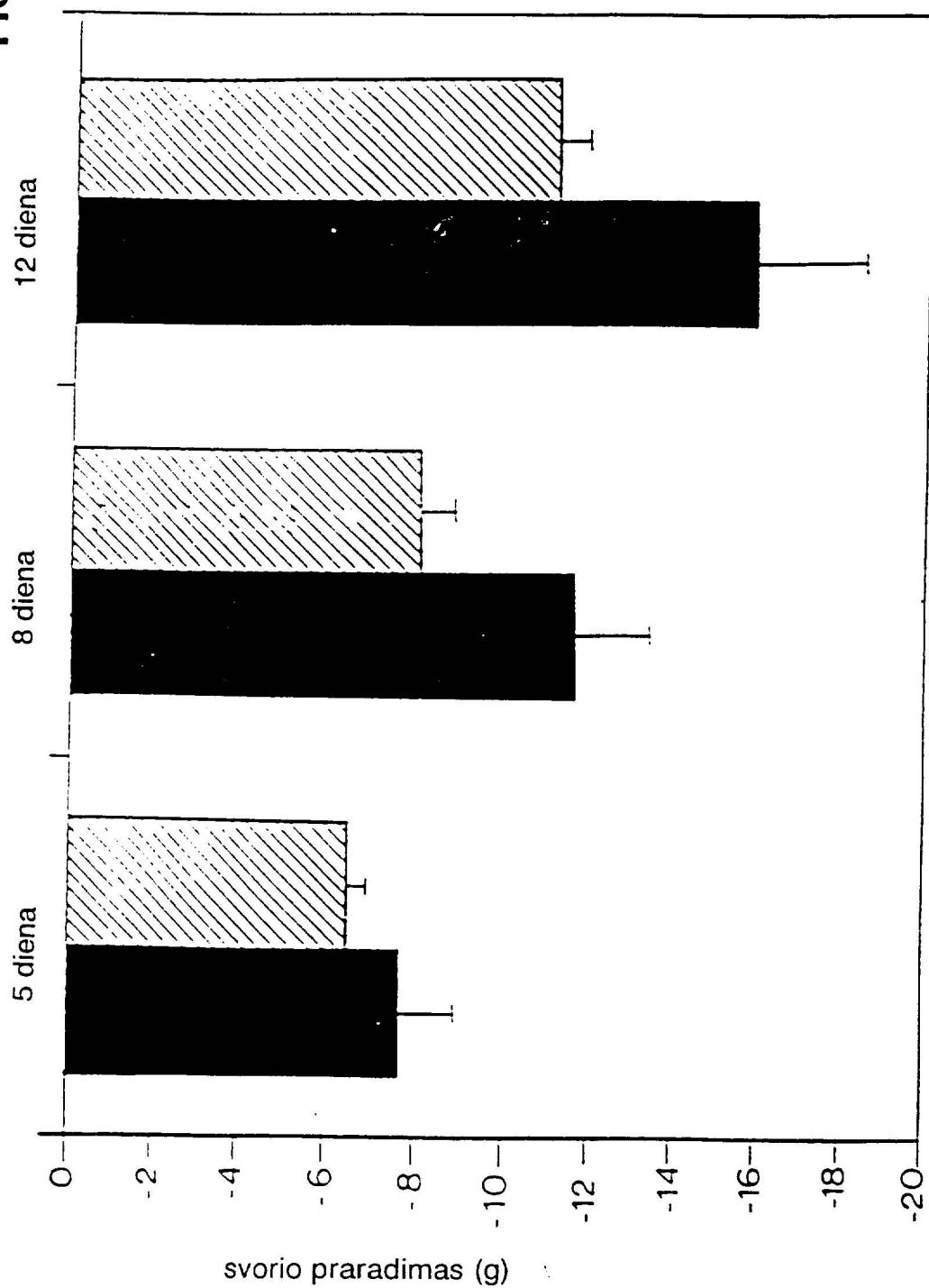




FIG. 29B

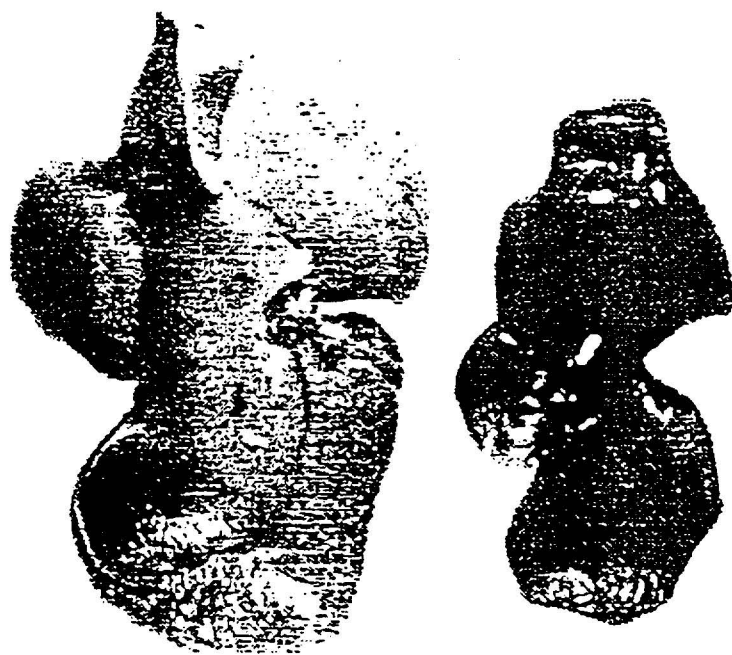


FIG. 29C

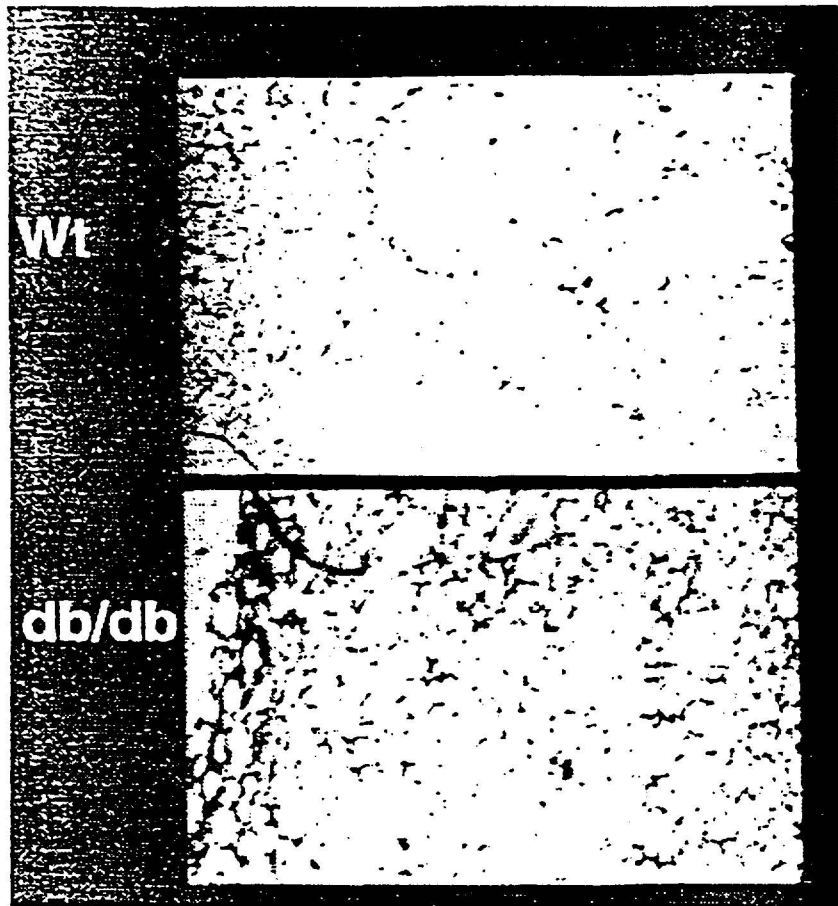


FIG. 30

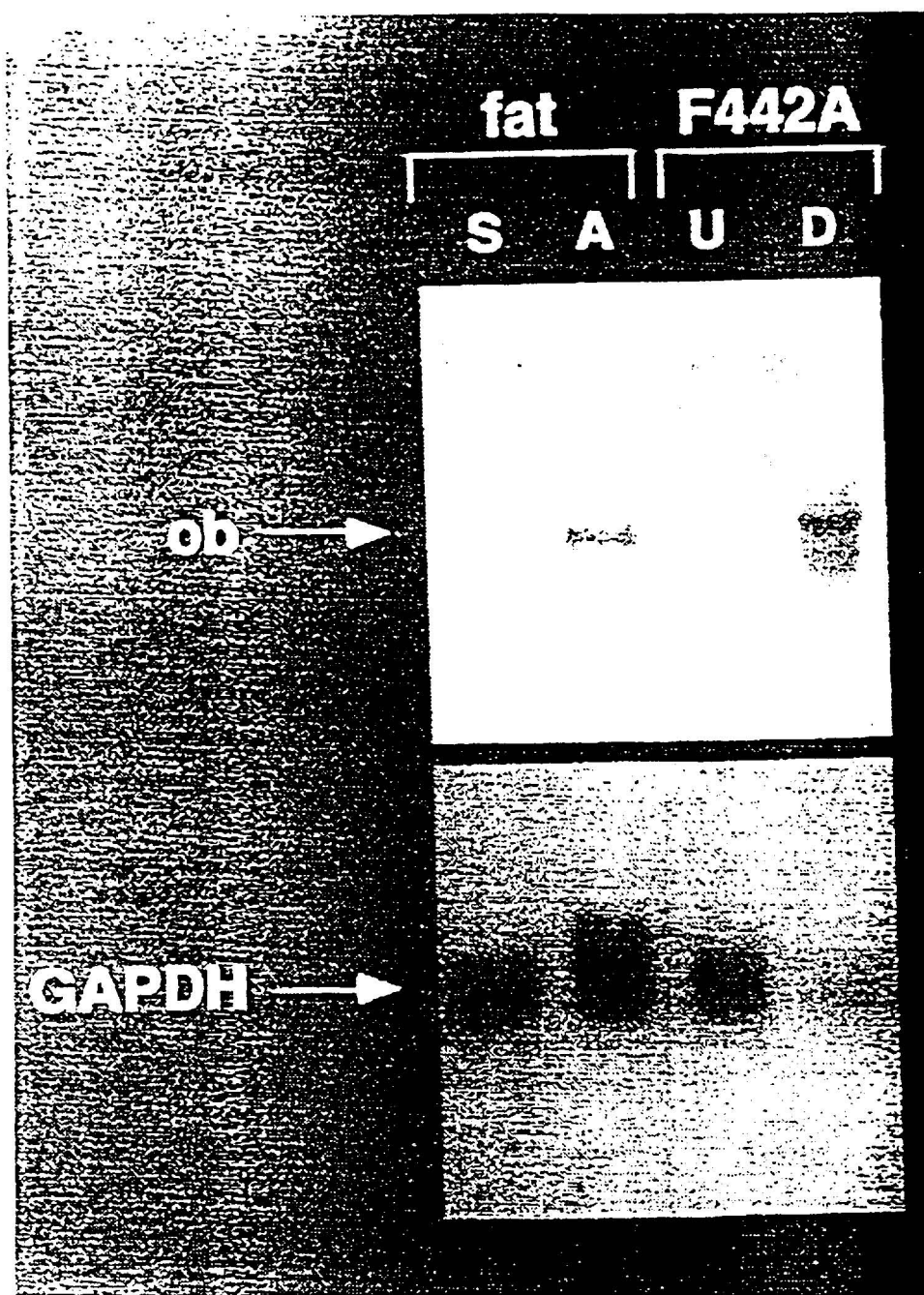


FIG. 31

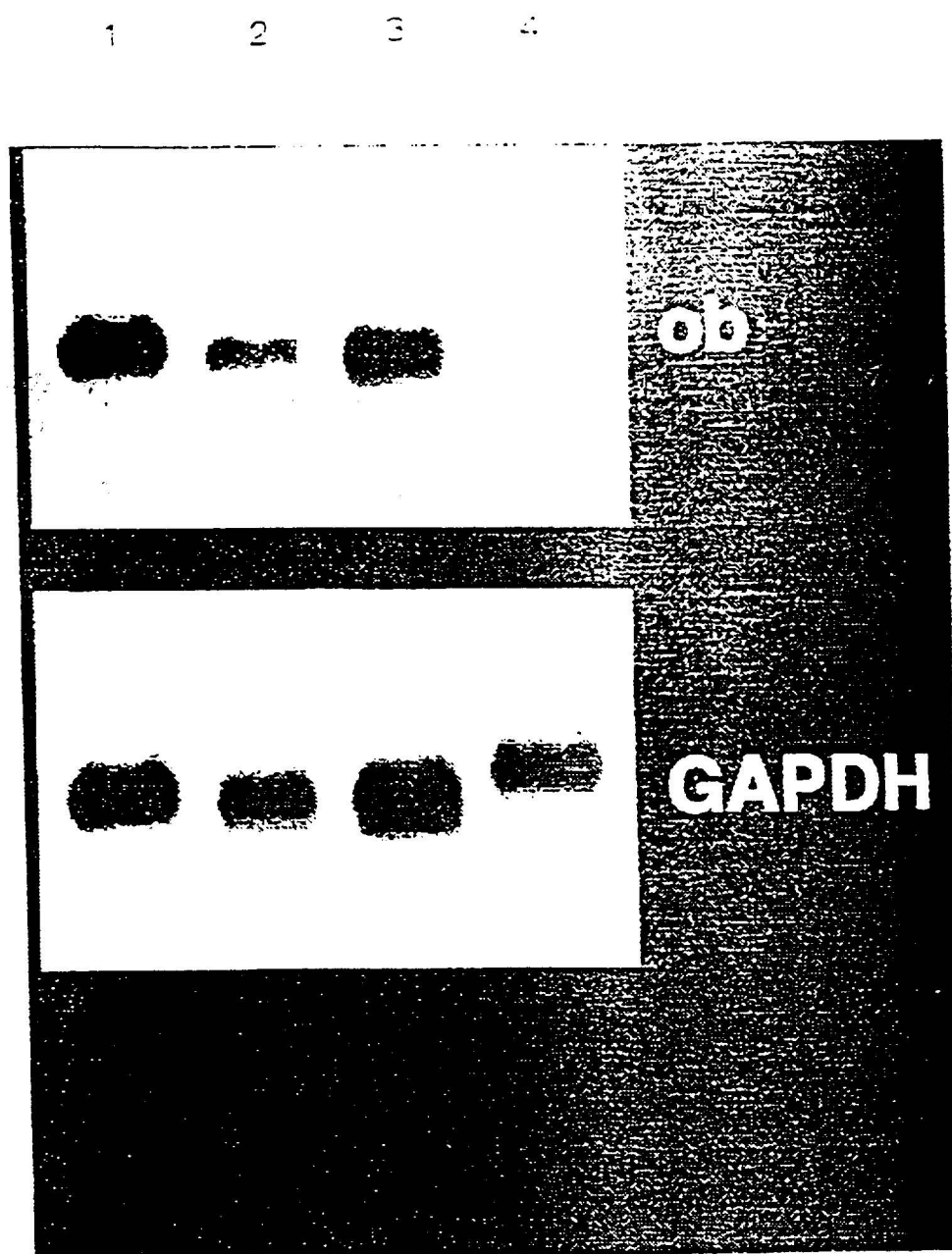


FIG. 32A

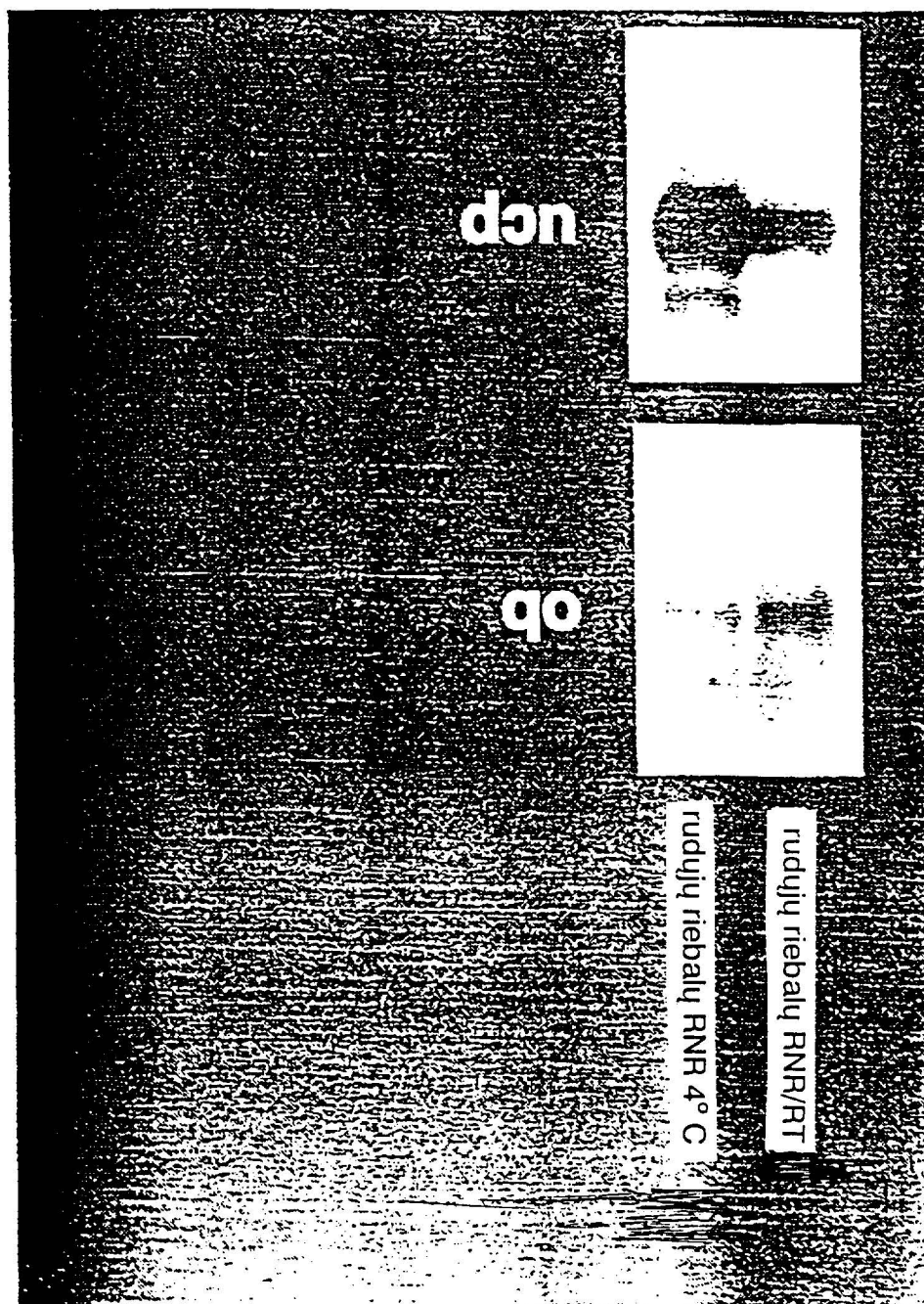


FIG. 32B

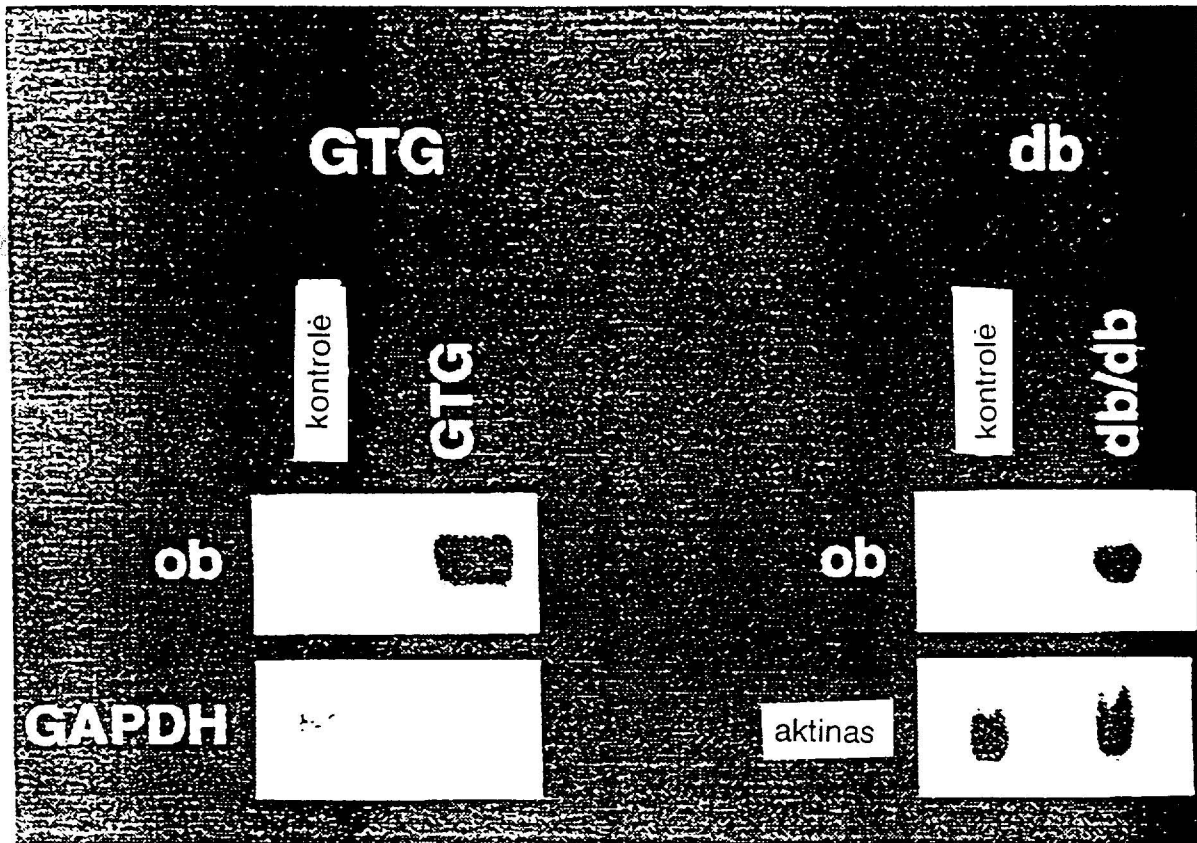


FIG. 33

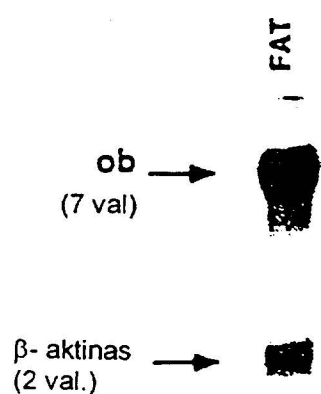


FIG. 34A

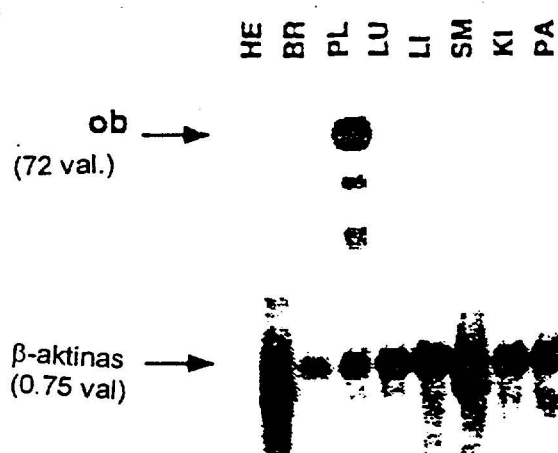


FIG. 34B

FIG.35 A

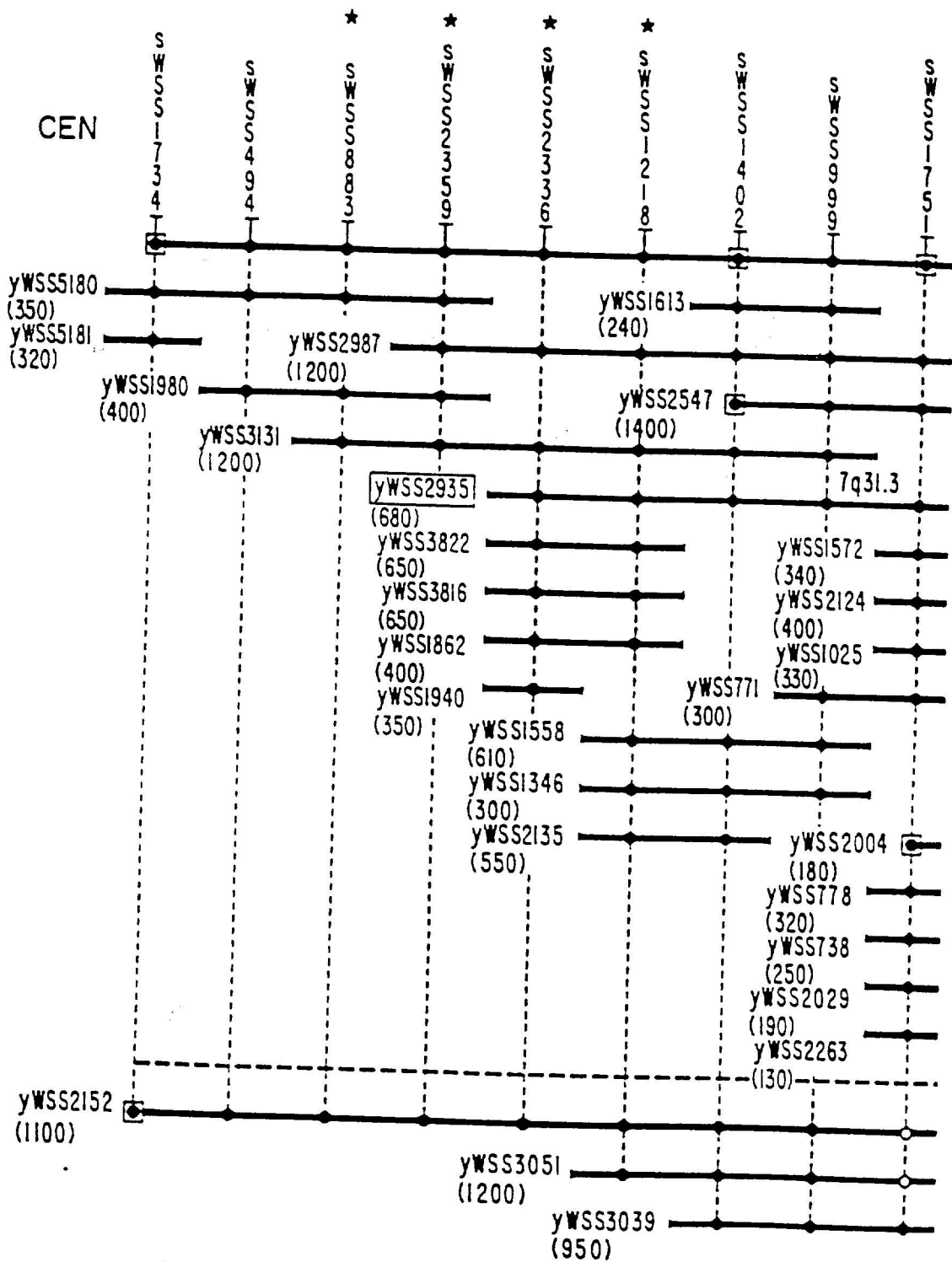


FIG. 35B

