



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 011**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05809259 .4**

96 Fecha de presentación : **24.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1814986**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **Antagonistas de leptina.**

30 Prioridad: **26.11.2004 US 996607**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.07.2011

73 Titular/es: **Yissum Research Development
Company of the Hebrew University of Jerusalem
Ltd.
Givat Ram, P.O. Box 39135
91390 Jerusalem, IL
Institut National de la Recherche Agronomique
(INRA) y
Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)**

72 Inventor/es: **Gertler, Arieh;
Callebaut, Isabelle y
Djiane, Jean**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 363 011 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de leptina.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a antagonistas de leptina y, en particular, a mutantes de leptina, y a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se notificó que el producto del gen *ob*, la leptina, suprimía el apetito mediante la regulación de las actividades de los centros de saciedad en el cerebro por medio de su receptor, denominado OB-R, y que afectaba al peso corporal (Friedman y Halaas, 1998). Sin embargo, estudios adicionales han mostrado que los receptores de leptina se expresan en muchos otros tejidos (Cioffi *et al.*, 1996; Emilsson *et al.*, 1997; Hoggard *et al.*, 1997; Glasow *et al.*, 1998; Briscoe *et al.*, 2001), y han sugerido que la leptina está implicada en funciones biológicas más diversas que las esperadas previamente.

15 Investigaciones sistemáticas han demostrado que los niveles séricos de leptina están aumentados en seres humanos obesos como también lo están en diversos modelos animales de obesidad (Dagogo-Jack *et al.*, 1996). Se ha notificado que el polipéptido OB o "leptina" reduce los niveles plasmáticos tanto de insulina como de glucosa en el ratón *ob/ob* genéticamente obeso (Pelleymounter *et al.*, 1995). No ha habido hasta la fecha ninguna indicación de que mutaciones en el gen *ob* pudieran ser responsables de la frecuente aparición de obesidad en seres humanos.

El documento US 6.309.853 da a conocer polipéptidos OB y fragmentos de los mismos, y su uso para modular el peso corporal.

20 La diabetes no insulino dependiente (DMNID) o diabetes tipo II está provocada por resistencia a insulina, particularmente en el músculo esquelético, tejido adiposo e hígado. Por tanto, a pesar de la hiperinsulinemia, no hay suficiente insulina como para compensar la resistencia a la insulina y para mantener la glucemia en el intervalo deseable. El documento US 6.399.745 da a conocer el uso de antagonistas de leptina, que son fragmentos de leptina humana o murina, para tratar la diabetes tipo II y la resistencia a insulina en pacientes diabéticos. La solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0048773 da a conocer el uso de un antagonista de leptina para el tratamiento de trastornos que resultan de deficiencias en la secreción de insulina y de hiperglucemia, pero no se da a conocer ningún antagonista de leptina específico en esta solicitud.

30 La solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0072219 da a conocer una molécula modificada que tiene la actividad biológica de la leptina humana y que es sustancialmente no inmunogénica o menos inmunogénica que cualquier molécula no modificada que tenga la misma actividad biológica cuando se usa *in vivo*. Las proteínas de leptina variantes dadas a conocer se han diseñado mediante modelado por ordenador, pero no se han sintetizado ni sometido a prueba. Estas variantes tienen epitopos de células T alterados, preferiblemente mediante sustitución de un único aminoácido, para reducir o eliminar sitios inmunogénicos, mientras que se mantiene la actividad biológica de la leptina. Entre las secuencias dadas a conocer, están 13-meros en los que el residuo de aminoácido 39, 41 ó 42 de la leptina humana nativa se ha sustituido por alanina.

35 La obesidad se considera un factor de riesgo para muchos cánceres. A menudo, los niveles séricos de leptina están elevados en personas obesas. La leptina actúa como un agente mitogénico en muchos tejidos; por tanto, puede actuar promoviendo el crecimiento de células cancerosas. De hecho, se mostró que la leptina actuaba como un factor de crecimiento para células de cáncer de próstata *in vitro*, inducía un aumento de la migración de células de cáncer de próstata y la expresión de factores de crecimiento tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), y potenciaba el crecimiento del cáncer de próstata. (Somasundar *et al.*, 2004; Frankenberry *et al.*, 2004).

40 Además de desempeñar un importante papel en la regulación de la ingesta de alimentos y el consumo de energía en el cerebro, la leptina también actúa como posible estimulador del crecimiento en células de cáncer de mama normales y neoplásicas. Se mostró también recientemente que inducía la proliferación celular en células de cáncer de ovario *in vitro* (Choi *et al.*, 2004).

45 Se ha mostrado recientemente que la leptina promueve la diferenciación de células T auxiliares 1 (Th1) y modula a aparición y evolución de respuestas autoinmunitarias en varios modelos animales de enfermedad (La Cava y Matarese, 2004). Si el papel de la leptina es fundamental en enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunitarias mediadas por Th1, tales como síndrome inflamatorio del intestino, entonces puede anticiparse un efecto terapéutico mediante el bloqueo que la acción periférica de la leptina (Matarese *et al.*, 2005). Se ha mostrado también que la leptina está implicada en la patogénesis de la artritis reumatoide y en el desarrollo de encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo de ratón para la esclerosis múltiple (Peelman *et al.*, 2004).

SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha encontrado ahora, según la presente invención, que reduciendo la hidrofobicidad de un sitio de unión de leptina de mamífero en las posiciones 39-42, se obtienen mutantes de leptina que son antagonistas de leptina.

5 Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un antagonista de leptina sintético que consiste en: (a) un polipéptido de leptina de mamífero en el que el sitio de unión hidrófobo LDFI en las posiciones correspondientes a las posiciones 39-42 de la secuencia de leptina humana de tipo salvaje, está modificado de manera que de desde dos hasta cuatro residuos de aminoácido de dicho sitio de unión hidrófobo están sustituidos por diferentes residuos de aminoácido de manera que el sitio se vuelve menos hidrófobo, siendo dicho polipéptido un antagonista de leptina; o (b) un fragmento de dicho polipéptido de leptina de mamífero modificado de (a) que comprende dicho sitio de unión hidrófobo alterado, en el que dicho fragmento es por sí mismo un antagonista de leptina.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ADN aislada que codifica dicho antagonista de leptina.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dicho antagonista de leptina sintético, o un fragmento del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 Las figuras 1A-1C muestran la determinación de la pureza de los mutantes de leptina humana y ovina aislados. (A) Análisis de filtración en gel, (B) análisis de SDS-PAGE (gel al 15%), los carriles 1-5 corresponden a leptina humana de tipo salvaje (WT, *wild type*), mutantes de leptina L39A/D40A, F41A/I42A, L39A/D40A/F41A y L39A/D40A/F41A/I42A y los carriles 6-10 a leptina ovina de WT y sus mutantes, y (C) cromatografía de fase inversa.

20 La figura 2 muestra el análisis de filtración en gel de complejos entre el dominio de unión de leptina de pollo (chLBD) y leptina humana u ovina en una columna Superdex™ 75 HR 10/30. La formación de los complejos se llevó a cabo durante una incubación de 20 min. a temperatura ambiente en tampón TN usando diversas razones molares y entonces se aplicaron alícuotas (200 µl) de la mezcla a la columna, equilibrada previamente con el mismo tampón. La concentración inicial de leptina (10 µM) era constante en todos los casos. Se desarrolló la columna a 0,8 ml/min. y se calibró con albúmina sérica bovina (66 kDa), lactógeno placentario ovino (23 kDa) y lisozima (14 kDa). Se monitorizó la concentración de proteína en el eluato mediante la absorbancia a 220 nm.

25 Las figuras 3A-3B muestran el ensayo de radioreceptor (RRA) usando homogeneizado de células BAF3 transfectadas de manera estable con la forma larga del receptor de leptina humana. Se usó ¹²⁵I-leptina ovina como ligando y las leptinas humana (A) u ovina (B) o sus análogos como competidores.

30 Las figuras 4A-4B muestran la inhibición de la actividad de leptina mediante el mutante de leptina humana L39A/D40A/F41A/I42A. (A) Inhibición de la fosforilación inducida por leptina de MAPK (erk1/2) en un bioensayo de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (la figura superior muestra el efecto del aumento de la dosis de leptina) y (B) inhibición de la transactivación inducible por leptina del gen indicador de luciferasa en células CHO transfectadas de manera transitoria con receptor de leptina y estimuladas con 6,25 nM de leptina humana.

35 La figura 5 muestra el análisis de agregados hidrófobos (HCA). El análisis se realizó suponiendo que la interacción del sitio III de la leptina con el dominio de tipo inmunoglobulina (IGD) del receptor de leptina (LEPR) se parece a la de IL-6 que interacciona con gp130. Los agregados hidrófobos resaltados corresponden principalmente a las estructuras secundarias regulares de la proteína considerada tal como se muestra en la figura 6.

40 La figura 6 muestra modelos 3D comparativos de IL-6 viral (vIL-6) que interacciona con el dominio IGD de gp130 (parte superior) y la leptina humana correspondiente (parte inferior): sitio III, comparación de la estructura experimental de IL-6 viral, tal como se observa en el complejo con gp130 (parte superior, sólo se muestra el dominio D1 de una molécula de gp130 en gris en la representación de cintas mostrada a la izquierda) y leptina humana aislada, para la que no era visible ningún residuo en la densidad electrónica para el bucle AB desordenado (parte inferior, línea discontinua de color naranja). Se superpusieron las dos estructuras basándose en las hélices estructuralmente conservadas (superposición con rmsd de 2,2 en 89 C ± átomos). Se muestra la Tyr119 de la leptina en violeta en la figura en la parte inferior.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La estructura terciaria de la leptina en solución reveló su pertenencia a la superfamilia de citocinas de cadena larga (Zhang *et al.*, 1997). Aunque se ha determinado la estructura terciaria del receptor de leptina, todavía el análisis de su secuencia de aminoácidos indicaba una alta similitud con receptores de la familia de receptores de citocinas de clase I, como receptores para la hormona del crecimiento (GH), factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina-6 (IL-6) y eritropoyetina (EPO). Los receptores de esta familia comparten múltiples dominios similares en su parte extracelular, como C2, CK y F3. Como el G-CSFR, el receptor de leptina tiene dos repeticiones de dominios CK-F3, que se sugiere que son el sitio de unión a ligandos (Wells y de Vos, 1996; Livnah *et al.*, 1999;

Aritomi *et al.*, 1999). Fong y colaboradores localizaron el dominio de unión a leptina (LBD) para el dominio CK-F3 proximal a la membrana (~ 200 aminoácidos) en el dominio extracelular del receptor de leptina (ECD) (Fong *et al.* 1999). Sin embargo, datos recientes muestran que la unión de la leptina a su receptor se parece más a la interacción de IL-6 con su receptor (Boulanger *et al.*, 2003; Muller-Newen 2003) y el dominio de tipo inmunoglobulina (IGD) ubicado entre el CK-F3 distal y el proximal es esencial para la dimerización productiva del receptor de leptina (Zabeau *et al.* 2004).

Dado que no existe información estructural de la estructura 3D del receptor de leptina, pueden considerarse dos posibles modelos. Uno, característico para GH/GHR, o para prolactina (PRL)/PRLR o EPO/EPOR, que se caracteriza por homodimerización del receptor inducida por hormonas que lleva al Jak2 yuxtapuesto a transfosforilación mutua (De Vos *et al.*, 1992), y otro sugerido para IL-6 (Muller-Newen, 2003). En este último modelo, se forma gradualmente un complejo hexamérico, en primer lugar mediante la molécula de IL-6, que interacciona con el IL-6R-alfa, luego con gp130 formando un trímero inactivo, que posteriormente se dimeriza formando un hexámero activo. La formación del hexámero se logra debido a la interacción de la IL-6 unida en un trímero (a través de su sitio III) con IGD de gp130 del otro trímero (Boulanger *et al.*, 2003; Muller-Newen, 2003). Para evaluar el posible sitio de interacción del sitio III de unión a leptina supuesto e IGD, se modeló el receptor de leptina basándose en su alineación con gp130, cuya estructura 3D está disponible. Posteriormente, se ajustó la leptina sobre vIL-6 del complejo IL-6/gp130 (basándose en la superposición de cuatro bloques conservados) y se ajustó el IGD del receptor de leptina sobre IGD de gp130. A pesar de que faltaba información sobre el bucle AB, se han identificado los aminoácidos 39-42 de la leptina (LDFI en todos los mamíferos), que están conservados en todas las especies de leptina, como una supuesta secuencia principal que interacciona con IGD. Para verificar esta hipótesis y someter a prueba su generalidad, se han preparado y purificado hasta la homogeneidad 4 mutantes de alanina de leptina recombinante ovina y 4 de humana de esta región y se muestra en el presente documento que actúan como antagonistas competitivos.

La presente invención proporciona por tanto un antagonista de leptina sintético que consiste en: (a) un polipéptido de leptina de mamífero en el que el sitio de unión hidrófobo LDFI en las posiciones correspondientes a las posiciones 39-42 de la secuencia de leptina humana de tipo salvaje, está modificado de manera que de desde dos hasta cuatro residuos de aminoácido de dicho sitio de unión hidrófobo están sustituidos por diferentes residuos de aminoácido de manera que el sitio se vuelve menos hidrófobo, siendo dicho polipéptido un antagonista de leptina; o (b) un fragmento de dicho polipéptido de leptina de mamífero modificado de (a) que comprende dicho sitio de unión hidrófobo alterado, en el que dicho fragmento es por sí mismo un antagonista de leptina.

Tal como se usa en el presente documento, el término "mamífero" incluye un mamífero humano así como mamíferos no humanos. Por tanto, según la presente invención, la leptina nativa puede ser leptina humana o una leptina de mamífero no humano tal como leptina ovina, de rata, de ratón, de caballo y de cerdo, y las secuencias LDFI representan la secuencia LDFI 39-42 de leptina humana o de una leptina de mamífero no humano. En una realización preferida, la leptina es leptina humana. En otra realización preferida, la leptina es leptina ovina.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "antagonista de leptina" y "mutante de leptina" se usan de manera intercambiable para indicar un polipéptido de leptina de mamífero en el que al menos dos de los aminoácidos en las posiciones 39-42 de una secuencia de leptina de mamífero humano o no humano están sustituidos por otros aminoácidos de manera que el sitio se vuelve menos hidrófobo. La expresión "polipéptido de leptina de mamífero" abarca polipéptidos de leptina de mamífero que se producen de manera natural y variantes biológicamente activas de los mismos, así como fragmentos biológicamente activos de leptina que se produce de manera natural y variantes de los mismos. "Variante" se refiere a un polipéptido que difiere del polipéptido de leptina de mamífero, pero que conserva propiedades esenciales del mismo.

Según la presente invención, al menos dos de los residuos de aminoácido en las posiciones 39-42 de una leptina de mamífero de tipo salvaje pueden estar sustituidos por uno o más residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina y serina. En la realización más preferida, dicho residuo de aminoácido es alanina.

En una realización preferida de la invención, dos cualesquiera de los residuos de aminoácido en cualquiera de las posiciones 39-42 de una secuencia de polipéptido de leptina de mamífero están sustituidos por alanina, por ejemplo en las posiciones 39, 40, o 39, 41, o 39, 42, o 40, 41, o 40, 42, o 41, 42.

En una realización, el antagonista de leptina con dos sustituciones de alanina se deriva de leptina humana. En una realización preferida, el antagonista de leptina humana es el polipéptido de leptina recombinante humana que porta dos mutaciones de Ala en las posiciones 39 y 40, designado en el presente documento como mutante L39A/D40A de leptina humana (SEQ ID NO: 1). En otra realización preferida, el antagonista de leptina humana es el polipéptido de leptina recombinante humana que porta dos mutaciones de Ala en las posiciones 41 y 42, designado en el presente documento como mutante F41A/I42A de leptina humana (SEQ ID NO: 2).

En otra realización de la invención, el antagonista de leptina con dos sustituciones de alanina se deriva de leptina ovina. En una realización preferida, el antagonista de leptina ovina es el polipéptido de leptina recombinante ovina que porta dos mutaciones de Ala en las posiciones 39 y 40, designado en el presente documento como mutante

L39A/D40A de leptina ovina (SEQ ID NO: 3). En otra realización preferida, el antagonista de leptina es el polipéptido de leptina recombinante ovina que porta dos mutaciones de Ala en las posiciones 41 y 42, designado en el presente documento como mutante F41A/I42A de leptina ovina (SEQ ID NO: 4).

5 En otra realización preferida de la invención, tres cualesquiera de los residuos de aminoácido en cualquiera de las posiciones 39-42 de una secuencia de polipéptido de leptina están sustituidos por alanina, por ejemplo en las posiciones 39, 40, 41 o 39, 40, 42, o 39, 41, 42, o 40, 41, 42.

10 En una realización preferida de la invención, el antagonista de leptina con tres sustituciones de alanina se deriva de leptina humana. En una realización más preferida, el antagonista de leptina humana es el polipéptido de leptina recombinante humana que porta tres mutaciones de Ala en las posiciones 39, 40 y 41, designado en el presente documento como mutante L39A/D40A/F41A de leptina humana (SEQ ID NO: 5).

En otra realización preferida de la invención, el antagonista de leptina con tres sustituciones de alanina se deriva de leptina ovina. En una realización más preferida, el antagonista de leptina ovina es el polipéptido de leptina recombinante ovina que porta tres mutaciones de Ala en las posiciones 39, 40 y 41, designado en el presente documento como mutante L39A/D40A/F41A de leptina ovina (SEQ ID NO: 6).

15 En otra realización preferida de la invención, los cuatro residuos de aminoácido en las posiciones 39-42 de una secuencia de polipéptido de leptina están sustituidos por alanina. En una realización más preferida, el antagonista de leptina con las cuatro sustituciones de alanina se deriva de leptina humana y es el polipéptido de leptina recombinante humana que porta cuatro mutaciones de Ala en las posiciones 39, 40, 41 y 42, designado en el presente documento como mutante L39A/D40A/F41A/I42A de leptina humana (SEQ ID NO: 7). En otra realización
20 más preferida, el antagonista de leptina con las cuatro sustituciones de alanina se deriva de leptina ovina y es el polipéptido de leptina recombinante ovina que porta cuatro mutaciones de Ala mutaciones en las posiciones 39, 40, 41 y 42, designado en el presente documento como L39A/D40A/F41A/I42A (SEQ ID NO: 8).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ADN aislada que codifica un antagonista de leptina de la invención.

25 En una realización preferida, la molécula de ADN aislada codifica un antagonista de leptina derivado de leptina humana. En una realización preferida, la molécula de ADN es de SEQ ID NO: 9 y codifica el mutante doble de leptina humana L39A/D40A. En otra realización, la molécula de ADN es de SEQ ID NO: 10 y codifica el mutante doble de leptina humana F41A/I42A.

30 En otra realización, la molécula de ADN aislada codifica una antagonista de leptina derivado de leptina ovina. En una realización preferida, la molécula de ADN es de SEQ ID NO: 11 y codifica el mutante doble L39A/D40A de leptina ovina. En otra preferida, la molécula de ADN es de SEQ ID NO: 12 y codifica el mutante doble F41A/I42A de leptina ovina.

35 En una realización más preferida de la invención, la molécula de ADN es de SEQ ID NO: 13 y codifica el mutante triple L39A/D40A/F41A de leptina humana. En otra realización más preferida, la molécula de ADN es de SEQ ID NO: 14 y codifica el mutante triple L39A/D40A/F41A de leptina ovina.

En otra realización más preferida, la molécula de ADN es de SEQ ID NO: 15 y codifica el mutante cuádruple L39A/D40A/F41A/I42A de leptina humana.

En una realización más preferida adicional, la molécula de ADN es de SEQ ID NO: 16 y codifica el mutante cuádruple L39A/D40A/F41A/I42A de leptina ovina.

40 Para la preparación de los mutantes de leptina de la invención, se lleva a cabo mutagénesis dirigida al sitio del gen *ob* mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo usando kits comercialmente disponibles. Los mutantes se seleccionan, se secuencian para confirmar la mutación correcta, se aíslan los plásmidos mutados y se transforman células competentes con los plásmidos y se usan para la expresión de los mutantes de leptina.

45 En otra realización, la presente invención se refiere a un fragmento de antagonista de leptina sintético, comprendiendo dicho fragmento un sitio mutado en las posiciones 39-42, tal como se describe para el antagonista de polipéptido de leptina de longitud completa, y en la que dicho fragmento es por sí mismo un antagonista de leptina.

50 En una realización adicional, el antagonista de leptina sintético de la invención está en forma pegilada y tiene un número variable de moléculas de polietilenglicol (PEG) unidas al mismo. PEG de peso molecular de 4,6 kDa o 40 kDa es adecuado para este fin. La pegilación de los antagonistas de leptina de la invención aumenta su estabilidad, su semivida plasmática y farmacocinética.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un antagonista de leptina sintético de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la invención es útil en el tratamiento de cualquier trastorno en el que esté implicada una actividad no deseable o

perjudicial de leptina endógena, como por ejemplo en diabetes tipo II, anorexia, cáncer y enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, síndrome inflamatorio del intestino, artritis reumatoide.

5 Por tanto, en una realización preferida, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de diabetes tipo II y para el tratamiento de resistencia a insulina, especialmente la asociada con obesidad en un mamífero humano o no humano.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica puede usarse para la inhibición del crecimiento de células malignas y por tanto puede ser útil en el tratamiento del cáncer tal como cáncer de mama, de colon, de ovarios y de próstata.

10 Pueden formularse composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. El/los vehículo(s) debe(n) ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de la composición y no perjudiciales para el receptor de la misma.

15 Los métodos de administración de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir las vías parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, mucosa (por ejemplo, oral, intranasal, bucal, vaginal, rectal, intraocular), intratecal, tópica e intradérmica. La administración puede ser sistémica o local.

Además de su posible uso farmacéutico, los antagonistas de leptina de la invención pueden ser útiles como herramientas de investigación para el estudio de las actividades biológicas de la hormona leptina.

EJEMPLOS

20 Materiales y métodos

(i) **Materiales.** Se prepararon leptinas ovina y humana en el laboratorio tal como se describió anteriormente (Gertler *et al.* 1998, Raver *et al.* 2002). Se preparó dominio de unión de leptina de pollo recombinante (chLBD) de manera similar a la preparación de LBD humano (Sandowski *et al.* 2002, Raver *et al.* 2003). Las enzimas de restricción usadas en los experimentos de biología molecular fueron de Fermentas (Vilnius, Lituania) y New England Biolabs (Beverly, MA). Se encargaron cebadores de ADN sumamente puros a Sigma Co. (Rehovot Israel). Se adquirieron medio RPMI-1640, interleucina-3 (IL-3), ácido nalidixico y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (azul de tiazolilo, MTT) de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), suero de ternero fetal (FCS) de Biolab Co. (Jerusalén, Israel) y vector de expresión pTrc 99A, columna Superdex75 HR 10/3, Q-Sepharose de Pharmacia LKB Biotechnology AB (Uppsala, Suecia). Se adquirieron un chip sensor CM5 de calidad para investigación, N-hidroxisuccinimida (NHS), clorhidrato de N-etil-N'(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), etanolamina-HCl y tampón de ejecución HBS-EP (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM y tensioactivo P20 al 0,005% (v/v) a pH 7,4) de Biacore, AB (Uppsala, Suecia). Todos los demás compuestos químicos eran de calidad analítica.

(ii) **Determinación de la pureza y el contenido en monómero.** Se llevó a cabo SDS-PAGE según Laemmli (Laemmli, 1970) en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones reductoras. Se tiñó el gel con azul brillante de Coomassie R. Se realizó la cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 HR 10/30 con alícuotas de 0,2 ml de la fracción eluida de la columna de Q Sepharose usando tampón TN (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 8). Se llevó a cabo cromatografía de fase inversa usando una columna Vydax desarrollada con un gradiente de TFA al 0,1% en agua (disolvente A) y TFA al 0,1% en MeCN (disolvente B).

(iii) **Determinación de los espectros de DC.** Se midieron los espectros de DC en miligrados con un espectrómetro de dicroísmo circular modelo 62A DS de AVIV (Lakewood, NJ) usando una cubeta QS Hellma rectangular de 0,020 cm. Se calibró el espectrómetro con ácido canforsulfónico. Se midieron los espectros de absorción con un espectrofotómetro UV-visible IR modelo 17DS de AVIV usando una cubeta QS de 1,000 cm y corrección para la dispersión de luz. Se dializó chLBD concentrado eluido de Q Sepharose frente a tampón fosfato 20 mM, pH 7,5, durante 24 h, y luego se centrifugó a 11.000 g durante 15 min. Se realizaron las mediciones de DC a 25,0°C controladas mediante elementos termoeléctricos Peltier hasta una precisión de 0,1°C. Se midieron los espectros de DC en cinco repeticiones dando como resultado un espectro promedio. La desviación estándar de la señal de DC promedio a 222 nm estaba en el intervalo del 5%. Para la determinación de la estructura secundaria, se expresaron los datos de DC en grado cm^2/dmol por residuo medio, basándose en una masa molecular respectiva de ~16 kDa calculada para la proteína a partir de los 147 aminoácidos, ya que se sabe que el enlace Met-Ala N-terminal se hidroliza en el transcurso de la expresión (datos no publicados). Se calculó la estructura secundaria de leptina y mutantes de leptina aplicando el procedimiento y el programa informático CONTIN (Provencher y Glockner, 1981). El programa determina hélices α , hebras β y giros β como un porcentaje de residuos de aminoácido implicados en estas formas ordenadas. Se determinó la conformación no ordenada como la unidad menos la suma de todos los elementos de la estructura secundaria (Venyaminov y Yang, 1996). En este estudio, para el cálculo mediante el programa CONTIN, se empleó un conjunto de espectros de DC convencionales de 17 proteínas (Sreerama y Woody, 1993).

(iv) Determinación de la estequiometría de los complejos. Se prepararon complejos entre chLBD y leptinas humana u ovina o sus mutantes a diversas concentraciones molares en tampón TN. Las concentraciones finales de proteínas en la razón 1:1 eran de 10 μM . Tras 20 min. de incubación a temperatura ambiente, se aplicaron alícuotas de 200 μl a una columna Superdex™ 75 HR 10/30 equilibrada previamente con tampón TN. Para determinar el peso molecular del complejo, se calibró la columna con varias proteínas puras.

(v) Mediciones cinéticas de la interacción de leptina y mutantes de leptina con chLBD. Se realizaron todos los experimentos a 25°C usando la metodología de resonancia de plasmón superficial (RPS). Se determinaron las constantes cinéticas y de equilibrio para las interacciones entre LBD recombinante humano y de pollo y hLep y de pollo usando el sistema Biacore 3000 (Uppsala, Suecia). Se inmovilizó leptina (humana, ovina o de pollo) en una celda de flujo de un chip sensor CM5 (carboximetildextrano) de calidad para investigación usando química de acoplamiento de aminas (Johnsson *et al.*, 1991). Se llevaron a cabo las etapas de inmovilización a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. en tampón HBS-EB. Se activó la superficie durante 7 min. con una mezcla de N-hidroxisuccinimida 0,05 M y clorhidrato de N-etil-N'(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida 0,2 M. Se inyectó leptina a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en acetato 10 mM, pH 3,5, hasta que se logró el nivel deseado (1000 unidades de resonancia). Se inyectó etanolamina 1 M, pH 8,5, durante 7 min. para bloquear los grupos activados restantes. Se preparó una superficie control activando los grupos carboxilo y luego bloqueando los grupos activados mediante etanolamina tal como se describió. Para los estudios de unión, se hizo pasar chLBD, resuspendido en tampón HBS-EP, a diferentes concentraciones (15,62, 31,25, 62,5, 125 y 250 nM) a través de 3 células de flujo (que portaban leptina humana u ovina o control) a una velocidad de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se realizó la regeneración de la superficie tras cada interacción usando un pulso de 10 μl de tampón glicina 10 mM, pH 2. Se controlaron los experimentos mediante la cinética Wizard del software de control Biacore, que corrige automáticamente cambios en el índice de refracción y la unión no específica mediante la resta de las respuestas obtenidas para la superficie control de los datos obtenidos para las interacciones entre LBD y leptina. Se ajustaron las curvas de unión obtenidas a las fases de asociación y disociación a todas las concentraciones de LBD de manera simultánea usando el software de evaluación Biacore. En todos los casos, se obtuvo el ajuste óptimo para una interacción bimolecular sencilla (modelo de Langmuir).

(vi) Ensayos de unión. ^{125}I -leptina ovina radiomarcada sirvió como ligando y todas las otras leptinas no marcadas o sus mutantes como competidores. Se realizaron los experimentos con homogeneizados de células BAF/3 transfectadas de manera estable con la forma larga del receptor de leptina humana. Se cultivaron las células en RPMI 1640 complementado con un 5% de FCS en presencia de IL-3 para minimizar la regulación por disminución de los receptores de leptina hasta que se alcanzó una concentración de 10^6 células/ml. Entonces se centrifugaron las células y se almacenaron a -70°C. Antes de cada experimento se descongelaron las células, se suspendieron a $1,75 \times 10^6$ células/150 μl de tampón de reacción (barbiturato de Na 12,5 mM, pH 8,6, tampón que contiene albúmina sérica bovina al 0,1%, EDTA 7,5 mM, NaCl 150 mM y Triton-X100 al 0,1% (p/v)) y se homogeneizaron con Polytrone durante 30 s a 10.000 rpm en hielo. Cada tubo contenía 150 μl de tampón de reacción, 100 μl de ^{125}I -leptina humana (700.000 - 800.000 cpm) y 100 μl de diferentes disoluciones de leptina (que proporcionan 0-5000 ng/tubo) en tampón de reacción y se inició la reacción mediante la adición de 150 μl de homogeneizado. Se incubaron los tubos durante 18 h a temperatura ambiente. Entonces se precipitó el complejo leptina-receptor añadiendo 250 μl de inmunoglobulina bovina al 1% (p/v) y 500 μl de polietilenglicol al 20% (p/v). Se mezclaron los tubos meticulosamente, se incubaron durante 30 min. a 4°C y se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min. a 4°C. Entonces se aspiró cuidadosamente el sobrenadante y se contaron los precipitados en un contador γ . Se yodó leptina humana según un protocolo previamente descrito para la yodación de hGH (Gertler *et al.*, 1984).

(vii) Ensayos de proliferación de BAF/3. Se usó la tasa de proliferación de células BAF/3 1442-Cl 4 sensibles a leptina transfectadas con la forma larga del receptor de leptina humana para estimar la actividad propia y antagonista de mutantes de leptina, usando el método de MTT (sal de tetrazolio, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) tal como se describió anteriormente (Raver *et al.*, 2000). Para determinar la actividad antagonista de mutantes de leptina, se añadió $6,25 \times 10^{-11}$ M de leptina homóloga de tipo salvaje a cada pocillo que contenía también diferentes concentraciones de leptinas mutadas. Se usó la absorbancia promedio en pocillos sin leptina (control negativo) como valor de blanco y se restó de otros valores de absorbancia para producir los valores de absorbancia corregidos. Se usó la absorbancia promedio en pocillos con leptina de tipo salvaje tras la resta del control negativo como control positivo para calcular el porcentaje de inhibición. Se trazaron las curvas de inhibición usando el programa de inhibición de un sitio sigmoideo mediante regresión no lineal Prizma (Prizma, 2003) y se calcularon los valores de CI_{50} .

(viii) Bioensayo de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Se hicieron crecer células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con un 10% de suero de ternero fetal inactivado con calor, penicilina 100 unidades/ml y estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en atmósfera de un 5% de CO_2 a 37°C; se logró la diferenciación de células SH-SY5Y mediante tratamiento con ácido retinoico (RA). Se usaron células diferenciadas tras 15 días de tratamiento con RA para obtener un alto porcentaje de células que mostraban una clara diferenciación morfológica. Se privaron de alimento células SH-SY5Y en medio de Eagle modificado por Dulbecco libre de suero durante 16 h, y se trataron previamente durante 15 minutos en presencia o ausencia de diversas concentraciones de antagonistas de leptina (de 6,25 a 320 nM) y luego se estimularon durante 10 minutos con leptina humana (6,25 nM). Tras la estimulación, se recogieron las células enjuagando en PBS enfriado con hielo

5 y raspando en tampón de lisis que contenía Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 137 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, Nonidet-P40 al 1%, glicerol al 10%, inhibidores de proteasas (PMSF 0,35 mg/ml, leupeptina 2 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml y benzamidina 10 mM) e inhibidores de fosfatasa (fluoruro de sodio 10 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y β-glicerofosfato de sodio 20 mM). Tras la lisis en hielo durante 30 min., se eliminaron los materiales insolubles mediante centrifugación (15.000 rpm a 4°C durante 30 min.) y se determinaron las concentraciones de proteína de los lisados resultantes usando un kit de ensayo de proteínas (Pierce, Chemical). Se resolvieron las proteínas mediante SDS-PAGE y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell). Se bloquearon las inmunotransferencias con leche en polvo desnatada y se incubaron en presencia de anti-fosfo-MAP cinasa o anti-MAP cinasa total (ERK 41/42) (de Cell Signaling) seguido por una incubación en presencia de anticuerpos secundarios apropiados acoplados a HRP, se lavaron las membranas de nitrocelulosa y se detectaron las proteínas seleccionadas como diana usando reactivos de quimioluminiscencia potenciada (ECL; Amersham Biosciences).

15 **(ix) Determinación de la actividad biológica mediante la activación del gen indicador de luciferasa.** Se hicieron crecer células de ovario de hámster chino (CHO) en medio HAM-F12 que contenía un 10% de FCS y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada gasificada con un 95% de aire, un 5% de CO₂. El medio mínimo GC3 usado antes de los experimentos de inducción hormonal estaba compuesto por DMEM-F12, complementado con glutamina, penicilina/estreptomicina 100 µg/ml, aminoácidos no esenciales, transferrina e insulina. Se cotransfectaron células CHO con el pCH110 junto con luciferasa pAH32 sensible a STAT3 y plásmidos que codifican para LEPRb de ratón. Se llevaron a cabo todas las transfecciones usando ExGen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, Francia) según el protocolo del fabricante. Para someter a prueba la actividad biológica, se incubaron posteriormente las células transfectadas durante 24 h en presencia de diferentes concentraciones de leptinas humanas y ovinas en presencia o ausencia de mutantes de leptina respectivos en medio GC3. Se lavaron las placas con solución salina tamponada con fosfato, y se determinó la actividad enzimática tal como se describió anteriormente (Bignon *et al.* 1993, Sotiropoulos *et al.* 1996). Se expresaron los resultados como veces de inducción, tras normalizarse la actividad luciferasa mediante la corrección de la actividad β-galactosidasa, tal como se explicó anteriormente.

Ejemplo 1. Preparación de mutantes de leptina.

30 Para preparar los mutantes de leptina de la invención, se usaron como material de partida los plásmidos de expresión pMon3401 que codificaban para la leptina ovina o humana de tipo salvaje (WT). Se modificaron los insertos de leptina con el kit de mutagénesis QuickChange de Stratagene (La Jolla, CA) según las instrucciones del fabricante, usando dos cebadores complementarios (tabla 1). Se diseñaron los cebadores para que contuviesen cambios de bases (marcados en negrita) para obtener las respectivas mutaciones pero que todavía conservan la secuencia de aminoácidos apropiada, y para modificar un sitio de restricción *BshTI* específico (subrayado) para la selección de colonias. El procedimiento incluía 12 ciclos de PCR usando Pfu polimerasa. Se digirió entonces el constructo mutado con la enzima de restricción *DpnI*, que es específica para ADN metilado y hemimetilado (secuencia diana: 5'-G^{m6} ATC-3'), con el fin de digerir el molde y seleccionar ADN sintetizado que contiene mutaciones. Entonces se transfectaron los plásmidos en células competentes XL1. Se examinaron cinco colonias de cada mutante para detectar mutación, usando el sitio de restricción específico diseñado, y revelaron una eficacia de al menos el 80%. Se secuenciaron dos colonias de cada mutante y se confirmó que contenían la mutación pero no una incorporación errónea no deseada de nucleótidos. Se transformaron células competentes XL-1 con los plásmidos mutados y se hicieron crecer en 5-10 ml de medio LB y se aislaron los plásmidos. Entonces se transformaron células competentes Mon105 con los plásmidos y se usaron para la expresión.

40 Los cebadores de SEQ ID NO. 17-32 usados en este experimento para la preparación de moléculas de ADN que codifican para los mutantes de leptina se muestran en la tabla 1. El sitio de restricción modificado (subrayado) es *BshTI*(-) para leptina humana y *BshTI* para leptina ovina.

45 **Tabla 1. Cebadores usados para la preparación de mutantes de leptina**

Cebador ^a	Secuencia de cebador	SEQ ID NO.
Leptina humana		
L39A/D40A-5	S 5'-CCAAACAGAAAGTCACTGGT GCGGCT TTTCATTCTGGGCTC-3'	17
L39/AD40A-3	A 5'-GAGCCCAGGAATGAAAGCCGC ACCAGT GACTTTCTGTTTGG-3	18
F41A/I42A-5	S 5'-CCAAACAGAAAGTCACTGGT TTGGACGCGCT CCTGGGCTCCACC-3'	19
F41A/I42A-3	A 5'-GGTGGAGCCCAGGAGCGGCGTCCAA ACCAGT GACTTTCTGTTTGG-3'	20

L39A/D40A/F41A-5	S 5'-CCAAACAGAAAGTCACTGGT GCGGCCGCC ATTCTGGGCTC-3'	21
L39A/D40A/F41A-3	A 5'-GAGCCCAGGAATGGCGGCCGC ACCAGT GACTTTCTGTTTGG-3'	22
L39A/D40A/F41A/142A-5	S 5'-CCAAACAGAAAGTCACTGGT GCGGCCGCCGCT CCTGGGCTCCACC-3'	23
L39A/D40A/F41A/142A-3	A 5'-GGTGGAGCCCAGGAGCGCGGCCGC ACCAGT GACTTTCTGTTTGG-3'	24
Leptina ovina		
L39A/D40A-5	S 5'-CAGAGGGTC ACCGGTGCTGCT TTTCATCCCTGGGCTCCACCC-3'	25
L39A/D40A-3	A 5'-GGGTGGAGGCCAGGGATGAAAGCAGC ACCGGT GACCCTCTG-3'	26
F41A/142A-5	S 5'-CCTCCAAACAGAGGGTC ACCGGTTTGGACGCTGCT CCTGGGCTC-3'	27
F41A/142A-3	A 5'-GAGCCCAGGAGCAGCGTCCAA ACCGGT GACCCTCTGTTTGGAGG-3'	28
L39A/D40AF41A-5	S 5'-TCCAAACAGAGGGTC ACCGGTGCTGCA GCTATCCCTGGGCTCCACCC-3'	29
L39A/D40AF41A-3	A 5'-GGGTGGAGCCCAGGGATAGCTGCAGC ACCGGT GACCCTCTGTTTGA-3'	30
L39A/D40A/F41A/142A-5	S 5'-CAGAGGGTC ACCGGTGCTGCTGCTGCT CCCGGGCTCCACCC-3'	31
L39A/D40A/F41A/142A-3	A 5'-GGGTGGAGCCCAGGAGCAGCAGCAGC ACCGGT GACCCTCTG-3'	32

^aS, cebador sentido; A, cebador antisentido; todas las mutaciones están en negrita.

Ejemplo 2. Expresión y plegamiento de leptinas humana y ovina y sus mutantes.

5 Se expresaron las leptinas humanas mutadas o de tipo salvaje (WT) recombinantes con una metionina-alanina adicional en el extremo N-terminal tras la inducción con ácido nalidixico (50 µg/ml) en 2,5 l de cultivo de células MON 105, transformadas con el plásmido de expresión apropiado. Se hicieron crecer en primer lugar las bacterias transformadas en 5 x 500 ml en matraces de 2,5 litros en medio de caldo Terrific (TB) a 37°C hasta una A₆₀₀ de 0,9 con agitación constante de 200 rpm. Cuatro horas tras la adición de ácido nalidixico, se recogieron las células mediante centrifugación durante 10 min. a 10.000 g y se congelaron a -20°C. Se descongeló en hielo el sedimento bacteriano de 2,5 l del cultivo bacteriano y se resuspendió en tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, pH 8).
10 Entonces se prepararon cuerpos de inclusión (CI) tal como se describió anteriormente (Gertler *et al.*, 1998; Raver *et al.*, 2002) y se congelaron. Posteriormente, se solubilizaron los CI obtenidos a partir de 2,5 l de cultivo bacteriano en 300 ml de urea 4,5 M, Tris 40 mM, que contenía cisteína 10 mM. En el caso de leptina ovina o sus mutantes, se solubilizaron los CI obtenidos a partir de 1,0 l de cultivo bacteriano de una manera similar en 200 ml. Se ajustó el pH de la disolución a 11,5 mediante NaOH. Tras 2 h de agitación a 4°C, se añadieron 3 volúmenes de arginina 0,67 M hasta una concentración final de 0,5 M y se agitaron durante la noche. La mañana siguiente, se transfirió la disolución a tubos de diálisis y se dializó frente a 5 x 10 l de Tris-HCl 10 mM, pH 9 (en el caso de mutantes de leptina humana) o Tris-HCl 10 mM pH 8 (en el caso de mutantes de leptina ovina), durante 60 h, con intercambio de la disolución externa cada 6-10 h.

20 Ejemplo 3. Purificación y caracterización química de mutantes de leptina

Se purificaron las fracciones plegadas y dializadas de mutantes de leptina humana del ejemplo 2 en una columna de intercambio aniónico Q-Sepharose (volumen de perlas de 30 ml), a velocidad de flujo máxima (400 - 500 ml/h), equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9, usando un gradiente de NaCl no continuo (50, 100, 150 y 400 mM de NaCl en Tris-HCl 10 mM). Se recogieron fracciones de cincuenta ml y se determinó la concentración de proteína mediante absorbancia a 280 nm.
25

Se reunieron las fracciones eluidas con NaCl 50 mM, que consistían en monómero > 95% puro, se dializaron frente a NaHCO₃, pH 8 a una razón de proteína:sal de 4:1 (p/p) y se liofilizaron. Se purificaron mutantes de leptina ovina de una manera similar usando tampón Tris-HCl, pH 8. Los rendimientos de mutantes de leptina humana y ovina

variaron respectivamente entre 160 y 220 mg, a partir de 2,5 litros de cultivo bacteriano y entre 80 y 120 mg a partir de 1,0 l de cultivo bacteriano.

Se documentó la pureza y homogeneidad de los mutantes purificados mediante tres métodos independientes. La filtración en gel a pH 8 en condiciones nativas produjo un único pico monomérico que consistía en > 95% de los monómeros, que corresponde a una masa molecular de ~16 kDa (figura 1A). En SDS-PAGE en condiciones reductoras, sólo se observó una banda de ~16 kDa (figura 1B) y la cromatografía de fase inversa también ha producido un único pico (figura 1C). La estructura secundaria de leptinas humana y ovina y sus mutantes calculada a partir de los espectros de DC se muestra en la tabla 2. Era claramente característico para todas las proteínas un alto contenido en hélice α del 52-63%, 8-11% de láminas β y un contenido del 14-18% de giros β , lo que indica un repliegamiento apropiado. La única excepción fue el mutante F41A/I42A ovino (SEQ ID NO. 4), en el que se encontró algo de alteración del repliegamiento apropiado. Se usaron los coeficientes de extinción molar calculados según Pace *et al.* (1995) para calcular el coeficiente de extinción específico a 280 nm para una disolución al 0,1% suponiendo alanina adicional en el extremo N-terminal. Los valores respectivos para leptina humana WT y los mutantes L39A/D40A (SEQ ID NO.1), F41A/I42A (SEQ ID NO. 2), L39A/D40A/F41A (SEQ ID NO. 5) y L39A/D40A/F41A/I42A (SEQ ID NO. 7) fueron 0,885, 0,890, 0,892, 0,895 y 0,897 y los valores correspondientes para especies ovinas fueron 0,201, 0,202, 0,202, 0,203 y 0,203. Se sometió a prueba la estabilidad tanto de las leptinas humana y ovina como de sus mutantes en disolución a 4°C y 37°C. Tanto las leptinas de tipo salvaje (WT) como sus mutantes pudieron almacenarse a ambas temperaturas como disoluciones 0,1 mM estériles durante al menos 20 días en pH 6 u 8 sin experimentar ningún cambio en su contenido monomérico y conservando su actividad en el bioensayo de Baf/3.

Ejemplo 4. Detección de complejos chLBD-leptina o mutantes de chLBD-leptina mediante filtración en gel

Para caracterizar la estequiometría de unión entre leptinas humana u ovina o sus mutantes y chLBD, se mezclaron los ligandos respectivos y chLBD en diferentes razones molares y se separaron mediante filtración en gel usando una columna Superdex 75 analítica para determinar la masa molecular del complejo de unión en condiciones no desnaturizantes. Se realizaron los experimentos usando una concentración constante de 5 μ M del ligando respectivo y 2,5, 5 ó 10 μ M de chLBD. Los resultados de la interacción chLBD:leptinas WT se presentan en la figura 2. Los resultados indican que ambas especies de leptinas se unen al chLBD en una razón molar 1:1. Se determinó esta estequiometría o bien mediante la aparición de un único pico mientras los componentes se mezclaban a la misma razón molar y la aparición de un pico adicional cuando había exceso de uno de ellos. El cálculo de la masa molecular del complejo, basándose en el tiempo de retención del pico, fue en todos los casos de ~41 kDa, cercano al valor pronosticado de 40,5 kDa. También se observó un patrón de interacción casi idéntico con los 8 mutantes (no mostrado), lo que indica que las mutaciones no afectaban a la capacidad de los mutantes para formar complejos 1:1 con chLBD.

Ejemplo 5. Determinación mediante resonancia de plasmón superficial (RPS) de la interacción entre chLBD o sus mutantes con leptina

Para caracterizar adicionalmente las capacidades de unión de chLBD con leptinas humana u ovina y sus mutantes, se empleó la técnica de resonancia de plasmón superficial (RPS) usando la respectiva leptina (o mutante de leptina) inmovilizada sobre un chip sensor mediante acoplamiento de amina y unión de chLBD soluble. Los resultados mostraron que las interacciones más aceptables se obtuvieron a partir de la comparación con el modelo teórico 1:1 usando análisis de χ^2 . Los datos calculados (media de 2 experimentos) se presentan en la tabla 3. Aunque se observaron diferencias de hasta 3 veces de las constantes cinéticas, los valores de Kd respectivos variaron en menor grado y las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Ejemplo 6. Experimentos de unión

Leptina humana yodada sirvió como ligando en todos los experimentos competitivos y las respectivas leptinas ovina y humana de tipo salvaje (WT) y sus mutantes de alanina como competidores. Homogeneizados recién preparados de células BAF/3 transfectadas de manera estable con la forma larga del receptor de leptina humana sirvieron como fuente de receptores. Se usó un homogeneizado de $1,75 \times 10^6$ células por tubo dando del 6 al 7% de unión específica. Las curvas de inhibición (promedio de dos experimentos) se presentan en la figura 3 y los valores de CI_{50} respectivos para leptina humana WT y los mutantes L39A/D40A (SEQ ID NO. 1), F41A/I42A (SEQ ID NO. 2), L39A/D40A/F41A (SEQ ID NO. 5) y L39A/D40A/F41A/I42A (SEQ ID NO. 7) calculados a partir de esas curvas fueron 5,33, 4,16, 6,82, 5,21 y 5,43 nM. Los valores de CI_{50} correspondientes para leptina ovina WT y sus respectivos mutantes fueron 1,47, 1,83, 3,44, 2,20 y 1,83 nM. Diferencias menores entre las leptinas y sus respectivos mutantes no fueron significativas ($P > 0,05$) excepto para los mutantes F41A/I42A (SEQ ID NO. 2) que tenían una afinidad ligeramente inferior (en el límite de la significancia estadística).

Ejemplo 7. Actividad biológica *in vitro*

Leptina humana y ovina presentaron una actividad casi idéntica en el bioensayo de Baf/3 con sus valores de CE_{50} respectivos de 22 y 37 pM de manera similar a los resultados publicados anteriormente (Raver *et al.*, 2000; Raver *et*

5 *al.*, 2002). En cambio, los cuatro mutantes de leptina humana u ovina carecían de cualquier actividad agonista. Para determinar la actividad agonista, se estimularon células BAF/3 con leptina humana u ovina 62,5 pM en presencia (1 - 125 nM) o ausencia de los respectivos mutantes. Se repitieron los experimentos 2-7 veces y se calcularon los valores de Cl_{50} promedio (tabla 4). Los 8 mutantes presentaron actividad agonista y no se observaron diferencias significativas entre mutantes de leptina humana y ovina. Los mutantes L39A/D40A/F41A (SEQ ID NO. 5) y L39A/D40A/F41A/I42A (SEQ ID NO. 7) fueron más potentes en comparación con L39A/D40A (SEQ ID NO. 1) y F41A/I42A (SEQ ID NO. 2). Para verificar la especificidad de la inhibición, se estimuló la proliferación de células Baf/3 mediante IL-3 (55 pM) en ausencia o presencia de mutantes de leptina humana y ovina. En los ocho casos no se observó inhibición incluso a una concentración de 125 nM de los mutantes. También se sometieron a prueba 10 varios mutantes de leptina mediante bioensayo de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y mediante transactivación del gen indicador de luciferasa en células CHO transfectadas de manera transitoria con receptor de leptina. Tal como se muestra en la figura 4A, el tratamiento previo con antagonista de leptina humana L39A/D40A/F41A/I42A (SEQ ID NO. 7) bloqueó completamente la posterior activación inducible por leptina de MAPK (figura 4A) y el mutante de leptina humana L39A/D40A/F41A/I42A (SEQ ID NO. 7) ha atenuado progresivamente la 15 activación inducible por leptina de la luciferasa (figura 4B). Se logró una inhibición del cincuenta por ciento a un exceso de antagonista con respecto a agonista de diez veces.

Ejemplo 8. Preparación de antagonistas de leptina pegilados

20 La capacidad de cualquier proteína respectiva para provocar un efecto biológico *in vivo* depende de muchos factores incluyendo no sólo la afinidad por su receptor, sino también la tasa a la que se aclara de la circulación. Algunas hormonas, como por ejemplo el péptido natriurético auricular pequeño, se aclaran muy rápidamente ($t_{0,5} = 0,5$ min.) debido a acontecimientos mediados por proteasas, mientras que otras que tienen una masa molecular de 15-25 kDa tales como leptina (observaciones no publicadas), hormona del crecimiento (GH), prolactina y PL se aclaran más lentamente ($t_{0,5} = 8 - 30$ min.), principalmente a través del riñón (Johnson *et al.* 1979; Haffner *et al.* 1994). Puesto que el aclaramiento mediado por el riñón depende principalmente de la masa molecular y las proteínas mayores de 70- 25 80 kDa se aclaran a una tasa notablemente inferior, el esfuerzo debe dirigirse a la prolongación de la semivida hormonal *in vivo* aumentando su tamaño. Esto puede lograrse aumentando el tamaño de la hormona sin afectar a su actividad mediante pegilación. La unión de varias moléculas de polietilenglicol (PEG) aumenta el volumen hidrodinámico de la proteína, ralentizando de ese modo su aclaramiento (Abuchowski *et al.*; 1977). Uno de los resultados más sorprendentes considerando la hormona del crecimiento humana pegilada (hGH) fue el reciente hallazgo de que a pesar de la actividad *in vitro* y la afinidad hasta 500 veces inferior, la potencia *in vivo* de la hGH pegilada aumentaba notablemente debido principalmente a un aumento de hasta 25 veces en su semivida en la 30 circulación. Por tanto, se concluyó que el aumento de la semivida circulante puede compensar los déficits en la afinidad de unión al receptor (Clark *et al.*, 1996).

35 La pegilación se realiza mediante reticulación de los mutantes de leptina purificados con polietilenglicol (PM de 40 kDa) con grupos amino alfa o épsilon mediante procedimientos bien conocidos (Clark *et al.*, 1996) o según las instrucciones del fabricante (Nektar Therapeutics). Los resultados usando leptina ovina indicaron que la pegilación no disminuía la actividad biológica de la leptina (Raver y Gertler, resultados no publicados). Estos resultados inducen a anticipar que la pegilación de mutantes de leptina no afectará tampoco a su capacidad para interactuar con receptores de leptina y posteriormente a su capacidad antagonista. Por tanto, los efectos beneficiosos de los 40 mutantes de leptina pueden prolongarse *in vivo* mediante pegilación o cualquier otra formulación de liberación lenta.

Ejemplo 9. Preparación de leptina humana con etiqueta de SP1

45 Se preparó una proteína quimérica compuesta por mutante de leptina humana-ligador de 29 aminoácidos y la proteína vegetal SP1 (Dgany *et al.*, 2004). Se subclonó el constructo en el vector pET29a y se expresó como una proteína insoluble como cuerpos de inclusión (CI) tras la inducción con IPTG. La banda de proteína principal tenía una masa molecular ~32 kDa cercana al valor teórico de 31402 Da. Se solubilizó la proteína quimérica, se replegó y se purificó hasta la homogeneidad. Estudios de filtración en gel sobre Superdex 75 y Sepharose 6B indicaron una masa molecular de al menos 100 kDa y probablemente mucho más. Para evaluar la capacidad de la proteína quimérica para unirse a chLBD, se incubaron previamente las dos proteínas en diferentes razones molares (la concentración de LBD era constante) y entonces se separaron en una columna Superdex. La desaparición del pico 50 de chLBD sirvió como indicador de la formación del complejo. Los resultados indican la desaparición total de chLBD a una razón de 3:1 y la desaparición casi total a una razón de 2:1, lo que indica que una proteína quimérica se une a 4-6 moléculas de chLBD.

Discusión y resumen de los resultados

55 Las citocinas de clase I interactúan con su receptor a través de sitios de unión conservados (sitios I y II). G-CSF y citocinas de la familia de gp130, incluyendo IL-6, tienen un sitio de unión adicional (sitio III), que en estructuras cristalinas recientes de complejos IL-6-gp130 se mostró que interacciona con el dominio de tipo Ig (IGD) del receptor (Chow *et al.*, 2001; Boulanger *et al.*, 2003) en una disposición 2:2. Se espera un tipo similar de formación de complejos para la interacción leptina/receptor de leptina debido a las similitudes de secuencia y a la arquitectura global que las dos parejas de interacción comparten con la hormona y los receptores de la familia de G-CSF y gp130

de citocinas. (Zabeau *et al.*, 2004; Peelman *et al.*, 2004). Se modeló por tanto el dominio IGD del receptor de leptina basándose en la estructura del IGD de gp130 (código pdb 1i1r; Chow *et al.*, 2001), y se ajustó este modelo sobre el complejo gp130-vIL-6. La estructura experimental de la leptina, tal como se observa aislada (código pdb 1ax8; Zhang *et al.*, 1997), se ajustó sobre la estructura de vIL-6, basándose en cuatro bloques conservados correspondientes a las hélices α .

Tal como se observa en las estructuras de los complejos vIL-6-gp130 (pdb 1i1r; Chow *et al.*, 2001) mostradas en la figura 5, panel superior e IL-6-gp130-IL-6R (pdb 1p9m; Boulanger *et al.*, 2003), el sitio III incluye el extremo N-terminal de la hélice D (azul oscuro), el bucle C-D (azul claro) y el bucle A-B (naranja) y entra en contacto con el IGD del receptor (de color gris en la parte izquierda de la figura). El sitio III parece ser la región más variable entre las citocinas. De manera notable, el bucle A-B (naranja en la figura 5) es de longitud variable y, en la estructura aislada de leptina humana (pdb 1ax8; Zhang *et al.*, 1997) o incluso en el IL-6-gp130-IL-6R (pdb 1p9m Boulanger *et al.*, 2003), parece estar desordenado, sin residuos visibles en el mapa de densidad electrónica. El bucle C-D también es variable (azul claro en la figura 5). De manera notable, en el complejo vIL-6-gp130 (pdb 1i1r; Chow *et al.*, 2001), el bucle A-B incluye una hebra β corta, que forma una estructura de tipo lámina β a través de enlaces de H de la cadena principal con la primera hebra β del dominio D1 del receptor (figura 6, panel superior). Además, también puede observarse una estructura de tipo hebra β extendida entre el extremo C-terminal de la hélice A y su hebra β , conduciendo a una superficie de contacto relativamente plana con una de las dos láminas β del dominio D1 del receptor (figura 6).

Suponiendo que la interacción del sitio III de leptina con IGD de LEPR se parece a la de IL-6, a pesar de una gran divergencia de secuencias, se ha utilizado el análisis de agregados hidrófobos (HCA) para predecir estructuras secundarias regulares, que podrían estar presentes en el bucle AB de la leptina. Este método bidimensional permite la predicción precisa de estructuras secundarias a partir del conocimiento de una única secuencia (Gaboriaud *et al.*, 1987; Callebaut *et al.*, 1997; Hennetin *et al.*, 2003). La figura 6 proporciona las representaciones en 2D de leptina humana e IL-6 viral (1IR1). Los agregados hidrófobos resaltados corresponden principalmente a las estructuras secundarias regulares de las proteínas consideradas. En las dos proteínas, un bucle de longitud variable separa la hélice A de la hélice B. Sin embargo, en la IL-6, este bucle incluye agregados, que son típicos de estructuras extendidas (hebra β). El del medio corresponde a la hebra β , que interacciona con el IGD de gp130. La situación es diferente para la leptina, e incluso más sencilla, ya que el bucle es más corto y contiene sólo un agregado, típico de una estructura de hebra β (VTGLDFI/S; agregado asociado al 77% con hebras β (estadísticas no publicadas)). Pueden alinearse por tanto provisionalmente con la hebra β que interacciona con IGD de IL-6, cuya secuencia es LEPAEIF.

El modelado de la superficie de contacto correspondiente en la leptina, que falta parcialmente en la estructura cristalina de la molécula aislada (línea naranja discontinua en la figura 5, panel inferior), no fue sin embargo posible debido a la falta de un molde apropiado para el bucle AB, así como debido al hecho de que se produce probablemente un cambio conformacional en las cercanías del bucle CD tras el reconocimiento del receptor.

Por otro lado, el núcleo de la superficie de contacto de IL-6 viral con gp130 y que implica el bucle CD está formado por tres aminoácidos aromáticos, Tyr143, Trp144 y Phe148 (Chow *et al.*, 2001, figura 5, panel superior, resaltado en violeta). Aunque no está presente ningún residuo aromático en posiciones estrictamente equivalentes en la leptina, un residuo de tirosina (Tyr119, color rosa en la figura 6, panel inferior) podría desempeñar un papel similar en la interacción con el receptor de leptina. Para someter a prueba esta suposición, se ha mutado este residuo a Ala y se ha preparado el mutante recombinante Y119A. A pesar del correcto replegamiento tal como se indica mediante el espectro de DC, este mutante presentaba una actividad agonista sustancialmente inferior y carecía totalmente de cualquier efecto antagonista (datos no publicados).

Por tanto, se considera la hebra β conservada del bucle AB de la leptina, que se piensa que forma una asociación intermolecular con una de las láminas β del IGD del receptor como una diana y que mutaba el fragmento LDFI/S (aa 39-42). Puesto que al preparar el mutante de leptina R128Q se ha observado anteriormente que el efecto de la mutación puede ser dependiente de la especie (Raver *et al.*, 2002), todas las presentes mutaciones se llevaron a cabo simultáneamente en leptinas humana y ovina. Se prepararon ocho mutantes (cuatro humanos y cuatro ovinos) con un buen rendimiento. Se purificaron todos los mutantes hasta la homogeneidad tal como se demostró mediante filtración en gel, SDS-PAGE y cromatografía de fase inversa (figura 1) y consistían en > 95% de monómeros. El análisis estructural de la estructura secundaria reveló el replegamiento apropiado excepto para el mutante L39A/D40A ovino (SEQ ID NO. 3) (tabla 2). Los ocho mutantes actuaban como antagonistas verdaderos, concretamente interaccionaban con LEPR con la afinidad similar a la hormona de tipo salvaje tal como se demuestra mediante SPR y RRA (tabla 3, figura 3), formaban un complejo 1:1 con chLBD de manera similar a las leptinas de WT, carecían de actividad biológica en el bioensayo de Baf/3 sensible a leptina e inhibían específicamente la acción de la leptina (tabla 4). El mutante L39A/D40A/F41A/I42A humano (SEQ ID NO. 7) también había inhibido la actividad inducible por leptina en otros bioensayos *in vitro* (figura 4).

Tabla 2. Estructura secundaria de leptinas humana y ovina y sus mutantes de alanina a pH neutro

Proteína sometida a prueba ¹	$[\theta]_{222}$ ²	Hélice α , %	Láminas β , %	Giros β , %	Aleatorio, %
Mutantes humanos					
Tipo salvaje	-21,0±0,8	63±0,6	8±1,1	17±0,6	12±1,5
L39A/D40A	-21,2±0,8	63±0,6	8±1,0	16±0,5	13±1,2
F41A/I42A	-20,3±0,7	60±0,6	8±1,0	16±0,6	15±1,4
L39A/D40A/F41A	-18,8±0,8	53±0,5	11±0,8	18±0,4	24±0,7
L39A/D40A/F41A/I42A	-20,4±0,7	59±0,6	7±1,0	16±0,5	18±1,3
Mutantes ovinos					
Tipo salvaje	-21,1±0,8	60±0,5	4±0,9	15±0,5	22±1,1
L39A/D40A	-18,4±1,1	52±0,4	8±0,7	14±0,4	26±0,8
F41A/I42A	-12,7±0,4	37±0,4	19±0,7	20±0,4	24±0,7
L39A/D40A/F41A	-21,9±0,8	62±0,5	5±0,8	14±0,4	18±1,0
L39A/D40A/F41A/I42A	-20,9±0,6	57±0,4	5±0,8	14±0,4	24±0,9

¹Los resultados se proporcionan como medias \pm DE. Los errores surgen sólo de una incertidumbre del ajuste del espectro de DC experimental mediante el conjunto de espectros de DC de proteínas patrón en el programa CONTIN. Los errores tanto de las mediciones de DC como de la determinación de la concentración de proteína no se incluyeron.

² $[\theta]_{222}$ es la elipticidad molar por mol de residuo y en kgrado $\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$.

Tabla 3. Cálculo de las constantes cinéticas y termodinámicas para la interacción de leptinas WT y sus mutantes con chLBD inmovilizado medidas mediante resonancia de plasmón superficial (RPS)

Mutante	k_{on} ($\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10^5$)	k_{off} ($\text{s}^{-1} \times 10^{-3}$)	K_d ($\text{M} \times 10^{-8}$)	Chi cuadrado ²
Mutantes de leptina humana¹				
Leptina WT	1,49±0,34	4,3±0,1	2,88±0,53	1,71 - 1,87
L39A/D40A	5,45±0,55	12,5±1,5	2,29±0,09	3,15 - 3,83
F41A/I42A	3,62±0,15	11,5±0,4	3,18±0,21	1,73 - 4,29
L39A/D40A/F41A	3,58±0,54	10,2±0,8	2,85±0,48	2,53-4,73
L39A/D40A/F41A/I42A	1,35±0,47	6,8±1,0	5,03±3,96	0,43-0,54
Mutantes de leptina ovina				
Leptina WT	1,62±0,94	3,7±0,8	2,28±2,15	0,58 - 1,57
L39A/D40A	2,37±0,03	5,7±0,1	2,40±0,06	2,31 - 5,18
F41A/I42A	2,50±0,15	3,2±0,2	1,28±0,03	1,80 - 3,54
L39A/D40A/F41A	1,81±0,06	2,5±0,2	1,38±0,13	1,74 - 4,57
L39A/D40A/F41A/I42A	1,09±0,18	3,2±0,1	2,93 ±0,56	1,24 - 3,18

¹media de 2 experimentos \pm DE

²valores inferiores indican un mejor ajuste

Tabla 4. Actividad antagonista de mutantes de leptina humana y ovina en células BAF/3 transfectadas de manera estable con la forma larga de LEPR

Mutante de leptina ¹	CI_{50} (nM); media \pm EEM ²	
	leptina h	leptina o
L39A/D40A	17,7 \pm 3,76 (4)	41,8 \pm 14,1 (7)
F41A/I42A	15,6 \pm 3,87 (4)	31,0 \pm 19,9(3)
L39A/D40A/F41A	10,0 \pm 0,903 (2)	17,1 \pm 4,4 (3)
L39A/D40A/F41A/I42A	9,3 \pm 1,60 (5)	9,5 \pm 4,6 (3)

¹Se estimularon las células con leptina 0,0625 nM, ²los números entre paréntesis indican el número de experimentos realizados.

³Media \pm DE.

Con el fin de comparar la actividad de estos mutantes con el mutante de leptina humana S120A/T121A recientemente notificado que presentaba actividad antagonista (Peelman *et al* 2004), se han preparado y purificado hasta la homogeneidad dos mutantes de leptina humana adicionales: S120A/T121A y L39A/D40A/F41A/I42A/S120A/T121A. Ambos mutantes se unen a chLBD con la afinidad respectiva de $2,95 \times 10^{-8}$ M y $2,69 \times 10^{-8}$ M similar a la de leptina humana WT ($2,88 \times 10^{-8}$ M). Sin embargo, en el bioensayo de Baf/3, el mutante

S120A/T121A presentaba una baja actividad agonista y la CI_{50} para la inhibición era más de 150 veces superior en comparación con o bien L39A/D40A/F41A o bien L39A/D40A/F41A/I42A (165 ± 81 nM, media \pm EEM de 5 experimentos, frente a 10,0 y 9,3 nM tal como se muestra en la tabla 4), lo que indica una actividad antagonista inferior. En cambio, el valor de CI_{50} para el L39A/D40A/F41A/I42A/S120A/T121A ($14,3 \pm 1,34$, media \pm DE de 2 experimentos) era comparable a los mutantes L39A/D40A/F41A o L39A/D40A/F41A/I42A. Por tanto, se concluye que los mutantes de la presente invención son superiores al mutante S120A/T121A y que la combinación de ambas mutaciones no tiene ninguna ventaja.

En conclusión, los mutantes de la presente invención actúan como antagonistas competitivos para la leptina. Esos mutantes pueden prepararse fácilmente en cantidades de gramos y por tanto sirven como herramienta novedosa de estudio de la función de la leptina *in vitro* e *in vivo*. Además, se ha sugerido el antagonismo de la leptina como una posible terapia en enfermedades autoinmunitarias y también podría tener efectos beneficiosos sobre la aterosclerosis. Por tanto, los antagonistas de leptina ofrecen una herramienta novedosa para dilucidar el papel de la leptina en la fisiología y patología de mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

- 15 Abuchowski, A., McCoy, J.R., Palczuk, N.C., Van Es, T. y Davis, F.F. (1977) Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J. Biol. Chem.* 252, 3582-3586.
- Aritomi, M., Kunishima, N., Okamoto, T., Kuroki, R., Ota, Y., y Morikawa, K. (1999) Atomic structure of the GCSF receptor complex showing a new cytokine- receptor recognition scheme. *Nature* 401, 713-7.
- 20 Bignon, C., Daniel, N., and Djiane, J. (1993) Beta-galactosidase and chloramphenicol acetyltransferase assays in 96-well plates. *BioTechniques* 15, 243-246.
- Boulanger, M.J., Chow, D.C., Brevnova, E.E., y Garcia, K.C. (2003) Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 α -receptor/gp130 complex. *Science* 300, 2101-104.
- Briscoe, C.P., Hanif, S., Arch, J.R., y Tadayyon, M. (2001) Leptin receptor long-form signalling in a human liver cell line. *Cytokine* 14, 225-9.
- 25 Callebaut, I., Labesse, G., Durand, P., Poupon, A., Canard, L., Chomilier, J., Henrissat, B., Momon, J.P. (1997) Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci* 53, 621-645.
- Choi JH, Park SH, Leung PC, Choi KC. (2004) Expression of Leptin Receptors and Potential Effects of Leptin on the Cell Growth and Activation of Mitogen-activated Protein Kinases in Ovarian Cancer Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Nov 2; [Epub ahead of print].
- 30 Chow, D., He, X., Snow, A.L., Rose-John, S., y Garcia, K.C. (2001) Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science* 291, 2150-2155.
- Cioffi, J.A., Shafer, A.W., Zupancic, T.J., Smith-Gbur, J., Mikhail, A., Platika, D., y Snodgrass, H.R. (1996) Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med.* 2, 585-9.
- 35 Clark, R., Olson, K., Fuh, G., Mariuan, M., Mortensen, D., Teshima, G., Chang., S., Chu, H., Mukku, V., Canova-Davis, E., Sommers, T., Cronin, M., Winkler, M. y Wells, J.A. (1996). Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol. *J Biol. Chem.* 271:21969-21977.
- Dagogo-Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers J, y Landt M. (1996) Plasma leptin and insulin relationships in obese and nonobese humans. *Diabetes.* 45(5):695-698.
- 40 De Vos, A.M., Ultsch, M., y Kossiakoff, A.A. (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255, 306-312.
- Dgany O, Gonzalez A, Sofer O, Wang W, Zolotnitsky G, Wolf A, Shoham Y, Altman A, Wolf SG, Shoseyov O, Almog O. The structural basis of the thermostability of SP 1, a novel plant (*Populus tremula*) boiling stable protein. *J Biol Chem.* (2004); 279:51516-23.
- 45 Emilsson, V., Liu, Y.L., Cawthorne, M.A., Morton, N.M., y Davenport, M. (1997) Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46, 313-6.
- Frankenberry KA, Somasundar P, McFadden DW, Vona-Davis LC. (2004) Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells. *Am J Surg.* 188(5):560-5.
- Friedman, J.M, y Halaas, J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-70.
- 50 Fong, T.M., Huang, R.R., Tota, M.R., Mao, C., Smith, T., Varnerin, J., Karpitskiy, V.V., Krause, J.E., y Van der Ploeg,

- L.H. (1998) Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol. Pharmacol.* 53, 234-40.
- Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T, Momon, J.-P. (1987) Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* 224, 149-155.
- 5 Gertler, A., Ashkenazi, A., y Madar, Z. (1984) Binding sites of human growth hormone and ovine and bovine prolactins in the mammary gland and the liver of lactating dairy cow. *Mol. Cell. Endocrinol.* 34, 51-7.
- Gertler, A., Simmons, J., y Keisler, D.H. (1998) Large-scale preparation of biologically active recombinant ovine obese protein (leptin). *FEBS Lett.* 422, 137-40.
- 10 Glasgow, A., Haidan, A., Hilbers, U., Breidert, M., Gillespie, J., Scherbaum, W.A., Chrousos, G.P., y Bornstein, S.R. (1998) Expression of Ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 4459-66.
- Haffner, D., Schaefer, F., Girard, F., Ritz, E. y Mehls, (1994) Metabolic clearance of recombinant human growth hormone in health and chronic renal failure. *J. Clin. Invest.* 93, 1163-1171.
- 15 Hennesin, J., LeTuan, K., Canard, L., Colloc'h, N., Momon, J.-P., Callebaut, I. (2003) Non-intertwined binary patterns of hydrophobic/nonhydrophobic amino acids are considerably better markers of regular secondary structures than nonconstrained patterns. *Proteins* 51, 236-244.
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J.S., Williams, L.M., Trayhum, P., y Mercer, J.G. (1997) Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94, 11073-8.
- Johnsson, B, Lofas, S., y Lindquist, G. (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* 198, 268-77.
- 20 Johnson, V. y Maack. (1979) Renal extraction, filtration, absorption, and catabolism of growth hormone. *Am. J. Physiol.* 233:185-19
- La Cava A., Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* (2004); 4: 371-379.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- 25 Livnah. O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K., and Wilson, I.A. (1999) Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 283, 987-90.
- Matarese G., Moschos S., Mantzoros CS. Leptin in Immunology. *J. Immunol.* (2005) 173:3137-3142.
- Muller-Newen, G. (2003), The cytokine receptor gp130: faithfully promiscuous. *Science STKE.* (201) PE40.
- 30 Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., y Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411-23.
- Peelman, F., Van Beneden, K., Zabeau, L., Iserentant, H., Ulrichs, P., Defeau. D., Verhee, A., Catteeuw, D., Elewaut, D., y Tavernier, J. (2004) Mapping of the leptin binding sites and design of a leptin antagonist. *J. Biol. Chem.* 279, 41038-46.
- 35 Peelman, F., Waelpuut W., Iserentant, H., Lavens D., Eyckerman S., Zabeau, L., y Tavernier, J. Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Prog Lipid Res.* Julio de 2004; 43(4):283-301. Revisión.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, y Collins F. (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540-543.
- Prisma (2003) GraphPad Prism TM versión 4.0 GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA.
- 40 Provencher, S.W. y Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-7.
- Raver, N., Gussakovsky, E.E., Keisler, D.H., Krishna, R., Mistry, J., y Gertler, A. (2000) Preparation of recombinant bovine, porcine, and porcine W4R/R5K leptins and comparison of their activity and immunoreactivity with ovine, chicken, and human leptins. *Protein Expr. Purif.* 19, 30-40.
- 45 Raver, N., Vardy, E., Livnah, O., Devos, R., y Gertler, A. (2002) Comparison of R128Q mutations in human, ovine, and chicken leptins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 52-8.

- Raver, N., Sandowski, Y., Sakal, E., Shochat, S., Livnah, O., Einat, M., y Gertler, A. (2003) Recombinant human and chicken leptin-binding domains derived from respective leptin receptors, Experimental Biology Meeting, 11-15 de abril de 2003. San Diego, California, resumen n.º 1209.
- 5 Sandowski, Y., Raver, N., Gussakovsky, E.E., Shochat, S., Dym, O., Livnah, O., Rubinstein, M., Krishna, R., y Gertler, A. (2002) Subcloning, expression, purification, and characterization of recombinant human leptin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 277, 46304-9.
- Sreerama, S., y Woody, R.W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 209, 32-44.
- 10 Somasundar P, Frankenberry KA, Skinner H, Vedula G, McFadden DW, Riggs D, Jackson B, Vangilder R, Hileman SM, Vona-Davis LC. (2004) Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *J Surg Res.* 118(1):71-82.
- Sotiropoulos, A., Moutoussamy, S., Renaudie, F., Clauss, M., Kayser, C., Gouilleux, F., Kelly, P.A., y Finidori, J. (1996) Differential activation of Stat3 and Stat5 by distinct regions of the growth hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 10, 998-1009.
- 15 Venyaminov, S.Yu., y Yang, J.T. (1996) Determination of secondary structure. En: *Circular Dichroism and the Conformational analysis of Biomolecules* (Fasman, G.D., Ed.) págs. 69-107, Plenum Press, Nueva York.
- Wells, J.A., y De Vos, A.M. (1996) Hematopoietic receptor complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 609-34.
- Zabeau, L., Defeau, D., Van der Heyden, J., Iserentant, H., Vandekerckhove, J., y Tavernier, J. (2004) *Mol. Endocrinol.* 18, 150-61.
- 20 Zhang, F., Basinski, M.B., Beals, J.M., Briggs, S.L., Churgay, L.M., Clawson, D.K., DiMarchi, R.D., Furman. T.C., Hale, J.E., Hsiung, H.M., Schoner, B.E., Smith, D.P., Zhang, X.Y., Wery, J-P., y Schweitz, R.W. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature (Londres)* 387, 206-209

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> YISSUM Research Development Company of the Hebrew
University of Jerusalem
UNIVERSITES PARIS 6 ET PARIS 7
INSTITUT NATIONALE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)
- 5 Gertler, Arieh
Callebaut, Isabelle
Djiane, Jean
- <120> ANTAGONISTAS DE LEPTINA
- <130> YIS-006 PCT
- 10 <150> US 10/996.607
<151> 2004-11-26
<160> 32
<170> PatentIn versión 3.2
<210> 1
- 15 <211> 146
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sintética
- 20 <400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Cys
 145

<210> 2

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 2

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

<210> 3

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 3

Val Pro Ile Arg Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Pro Leu Pro Gln Val Arg Ala Leu Glu Ser Leu Glu Ser Leu Gly Val
 100 105 110

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

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

Gly Cys
 145

<210> 4

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 4

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

<210> 5

<211> 146

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 5

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

<210> 6

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 6

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

<210> 7

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Cys
 145

<210> 8

<211> 146

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Pro Leu Pro Gln Val Arg Ala Leu Glu Ser Leu Glu Ser Leu Gly Val
 100 105 110

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

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Leu Ser Pro

130

135

140

Gly Cys
 145

<210> 9

<211> 438

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 9

gtgcccattcc aaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgtcaccagg 60
 atcaatgaca ttccacacac gcagtcagtc tcctccaaac agaaagtcac tgggtcggct 120
 ttcatctctg ggctccaccc catcctgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
 taccaacaga tcctcaccag tatgccttcc agaaacgtga tccaaatata caacgacctg 240
 gagaacctcc gggatcttct tcacgtgctg gccttctcta agagctgcca cttgccctgg 300
 gccagtggcc tggagacctt ggacagcctg ggggggtgtcc tggagcttc aggctactcc 360
 acagaggtgg tggccctgag caggctgcag gggctctctgc aggacatgct gtggcagctg 420
 gacctcagcc ctgggtgc 438

<210> 10

<211> 438

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 10

gtgcccattcc aaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgtcaccagg 60
 atcaatgaca ttccacacac gcagtcagtc tcctccaaac agaaagtcac tggtttggac 120
 gccgctcctg ggctccaccc catcctgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
 taccaacaga tcctcaccag tatgccttcc agaaacgtga tccaaatata caacgacctg 240
 gagaacctcc gggatcttct tcacgtgctg gccttctcta agagctgcca cttgccctgg 300
 gccagtggcc tggagacctt ggacagcctg ggggggtgtcc tggagcttc aggctactcc 360
 acagaggtgg tggccctgag caggctgcag gggctctctgc aggacatgct gtggcagctg 420
 gacctcagcc ctgggtgc 438

10 <210> 11

<211> 438

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintética

<400> 11

gtgcccattcc gcaaggtcca ggatgacacc aaaaccctca tcaagacgat tgtcaccagg 60

atcaatgaca tctcacacac gcagtcgctc tcttccaaac agaggggtcac cggtgctgct 120
ttcatccctg ggctccaccc tctcctgagt ttgtccaaga tggaccagac attggcaatc 180
taccaacaga tcctcgccag tctgccttcc agaaatgtga tccaaatatac taatgacctg 240
gagaacctcc gggaccttct ccacctgctg gccgcctcca agagctgccc cttgccgcag 300
gtcagggccc tagagagctt ggagagcctg ggcgtcgtcc tggaaagcctc cctctactcc 360
accgaggtgg tggccctgag ccggctacag gggctctctac aggacatggt gcggcagctg 420
gacctgagtc ccggctgc 438

<210> 12

<211> 438

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 12

gtgcccattcc gcaaggtcca ggatgacacc aaaaccctca tcaagacgat tgtcaccagg 60
atcaatgaca tctcacacac gcagtcgctc tcttccaaac agaggggtcac cggtttggac 120
gctgctcctg ggctccaccc tctcctgagt ttgtccaaga tggaccagac attggcaatc 180
taccaacaga tcctcgccag tctgccttcc agaaatgtga tccaaatatac taatgacctg 240
gagaacctcc gggaccttct ccacctgctg gccgcctcca agagctgccc cttgccgcag 300
gtcagggccc tagagagctt ggagagcctg ggcgtcgtcc tggaaagcctc cctctactcc 360
accgaggtgg tggccctgag ccggctacag gggctctctac aggacatggt gcggcagctg 420
gacctgagtc ccggctgc 438

10 <210> 13

<211> 438

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintética

<400> 13

gtgcccattcc aaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgtcaccagg 60
 atcaatgaca tttcacacac gcagtcagtc tcctccaaac agaaagtcac tgggtcggct 120
 gccattcctg ggctccaccc catcctgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
 taccaacaga tcctcaccag tatgccttcc agaaacgtga tccaaatata caacgacctg 240
 gagaacctcc gggatcttct tcacgtgctg gccttctcta agagctgcca cttgccctgg 300
 gccagtggcc tggagacctt ggacagcctg ggggggtgtcc tggaaagctc aggctactcc 360
 acagaggtgg tggccctgag caggctgcag gggctctctgc aggacatgct gtggcagctg 420
 gacctcagcc ctgggtgc 438

<210> 14

<211> 438

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 14

gtgcccattcc gcaagggtcca ggatgacacc aaaaccctca tcaagacgat tgtcaccagg 60
 atcaatgaca tctcacacac gcagtcctgc tcctccaaac agaggggtcac cgggtgctgca 120
 gctatccctg ggctccaccc tctcctgagt ttgtccaaga tggaccagac attggcaatc 180
 taccaacaga tcctcgccag tctgccttcc agaaatgtga tccaaatata taatgacctg 240
 gagaacctcc gggaccttct ccacctgctg gccgcctcca agagctgccc cttgcccgag 300
 gtcagggccc tagagagctt ggagagcctg ggcgtcgtcc tggaaagctc cctctactcc 360
 accgaggtgg tggccctgag ccggctacag gggctctctac aggacatggt gcggcagctg 420
 gacctgagtc ccggctgc 438

10 <210> 15

<211> 438

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintética

<400> 15

gtgcccattcc aaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgtcaccagg 60
 atcaatgaca tttcacacac gcagtcagtc tcttccaaac agaaagtcac tgggtgcggct 120
 gccgctcctg ggctccaccc catcctgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 180
 taccaacaga tcttcaccag tatgccttcc agaaacgtga tccaaatata caacgacctg 240
 gagaacctcc gggatcttct tcacgtgctg gccttctcta agagctgcca cttgccctgg 300
 gccagtggcc tggagacctt ggacagcctg ggggggtgtcc tggaaagcttc aggctactcc 360
 acagaggtgg tggccctgag caggctgcag gggctctctgc aggacatgct gtggcagctg 420
 gacctcagcc ctgggtgc 438

<210> 16

<211> 438

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 16

gtgcccattcc gcaaggtcca ggatgacacc aaaaccctca tcaagacgat tgtcaccagg 60
 atcaatgaca tctcacacac gcagtcagtc tcttccaaac agagggtcac cgggtgctgct 120
 gctgctcctg ggctccaccc tctcctgagt ttgtccaaga tggaccagac attggcaatc 180
 taccaacaga tcttcgccag tctgccttcc agaaatgtga tccaaatata taatgacctg 240
 gagaacctcc gggaccttct ccacctgctg gccgcctcca agagctgccc cttgccgcag 300

 gtcagggccc tagagagctt ggagagcctg ggcgtcgtcc tggaaagcttc cctctactcc 360
 accgaggtgg tggccctgag ccggctacag gggctctctac aggacatggt gcggcagctg 420
 gacctgagtc ccggctgc 438

10

<210> 17

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Sintética

<400> 17

ccaaacagaa agtactggt gcggcttca ttctgggct c

41

<210> 18

20 <211> 41

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
5	<400> 18	
	gagcccagga atgaaagccg caccagtgac ttctgttg g	41
	<210> 19	
	<211> 45	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 19	
	ccaaacagaa agtcaactggt ttggacgccg ctctgggct ccacc	45
15	<210> 20	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Sintética	
	<400> 20	
	ggtggagccc aggagcggcg tccaaaccag tgactttctg ttgg	45
	<210> 21	
	<211> 41	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 21	
30	ccaaacagaa agtcaactggt gcggccgcca ttctgggct c	41
	<210> 22	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sintética	

	<400> 22	
	gagcccagga atggcggccg caccagtgcac ttctgtttg g	41
	<210> 23	
	<211> 45	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 23	
10	ccaacagaa agtcactggt gcggccgccg ctctgggct ccacc	45
	<210> 24	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 24	
	ggtggagccc aggagcggcg gccgcaccag tgactttctg tttgg	45
	<210> 25	
20	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
25	<400> 25	
	cagagggta ccggtgctgc ttcatccct gggctccacc c	41
	<210> 26	
	<211> 41	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 26	
	gggtggagcc cagggatgaa agcagcaccg gtgaccctct g	41
35	<210> 27	
	<211> 44	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
5	<400> 27	
	cctccaaca gaggtcacc ggttggacg ctgctcctgg gctc	44
	<210> 28	
	<211> 44	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 28	
	gagcccagga gcagcgtcca aaccggtgac cctctgttg gagg	44
15	<210> 29	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Sintética	
	<400> 29	
	tccaacaga ggtcaccgg tgctgcagct atccctgggc tccaccc	47
	<210> 30	
	<211> 47	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
30	<400> 30	
	gggtggagcc caggatagc tgcagcaccg gtgacctct gtttga	47
	<210> 31	
	<211> 41	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

<223> Sintética
<400> 31
cagagggtca ccggtgctgc tgctgctccc gggctccacc c 41
<210> 32
5 <211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sintética
10 <400> 32
gggtggagcc cgggagcagc agcagaccg gtgaccctct g 41

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de leptina sintético que consiste en:
 - (a) un polipéptido de leptina de mamífero en el que el sitio de unión hidrófobo LDFI en las posiciones correspondientes a las posiciones 39-42 de la secuencia de leptina humana de tipo salvaje, está modificado de manera que de desde dos hasta cuatro residuos de aminoácido de dicho sitio de unión hidrófobo están sustituidos por diferentes residuos de aminoácido de manera que el sitio se vuelve menos hidrófobo, siendo dicho polipéptido un antagonista de leptina; o
 - (b) un fragmento de dicho polipéptido de leptina de mamífero modificado de (a) que comprende dicho sitio de unión hidrófobo alterado, en el que dicho fragmento es por sí mismo un antagonista de leptina.
2. Antagonista de leptina según la reivindicación 1, en el que dichos dos a cuatro residuos de aminoácido están sustituidos por aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina y serina.
3. Antagonista de leptina según la reivindicación 2, en el que dicho aminoácido es alanina.
4. Antagonista de leptina según la reivindicación 1, en el que dos de los cuatro residuos de aminoácido están sustituidos por alanina.
5. Antagonista de leptina según la reivindicación 4, en el que dicha leptina de mamífero nativa es leptina humana.
6. Antagonista de leptina según la reivindicación 5, en el que dicho antagonista de leptina humana es de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
7. Antagonista de leptina según la reivindicación 4, en el que dicha leptina de mamífero nativa es leptina ovina.
8. Antagonista de leptina según la reivindicación 7, en el que dicho antagonista de leptina ovina es de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
9. Antagonista de leptina según la reivindicación 1, en el que tres de los residuos de aminoácido en cualquiera de las posiciones 39-42 de una secuencia de polipéptido de leptina de mamífero nativa están sustituidos por alanina.
10. Antagonista de leptina según la reivindicación 9, en el que dicha leptina de mamífero nativa es leptina humana.
11. Antagonista de leptina según la reivindicación 10, que consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 5.
12. Antagonista de leptina según la reivindicación 9, en el que dicha leptina de mamífero nativa es leptina ovina.
13. Antagonista de leptina según la reivindicación 12, que consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 6.
14. Antagonista de leptina según la reivindicación 1, en el que los cuatro residuos de aminoácido en las posiciones 39-42 de la secuencia de polipéptido de leptina humana nativa están sustituidos por alanina, consistiendo dicho antagonista de leptina en el polipéptido de SEQ ID NO: 7.
15. Antagonista de leptina según la reivindicación 1, en el que los cuatro residuos de aminoácido en las posiciones 39-42 de la secuencia de polipéptido de leptina ovina nativa están sustituidos por alanina, consistiendo dicho antagonista de leptina en el polipéptido de SEQ ID NO: 8.
16. Una molécula de ADN aislada que codifica un antagonista de leptina según la reivindicación 1.
17. Molécula de ADN según la reivindicación 16, seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de ADN de SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16.
18. Fragmento de leptina sintético según la reivindicación 1, en el que de dos a cuatro residuos de aminoácido de la secuencia LDFI del sitio de unión hidrófobo en las posiciones 39-42 de un polipéptido de leptina de mamífero nativa están sustituidos por diferentes residuos de aminoácido de manera que el sitio se vuelve menos hidrófobo, siendo dicho fragmento un antagonista de leptina.
19. Antagonista de leptina sintético según la reivindicación 1, en forma pegilada.
20. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de leptina sintético o un fragmento del

mismo según la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20, que comprende el antagonista de leptina sintético en forma pegilada.

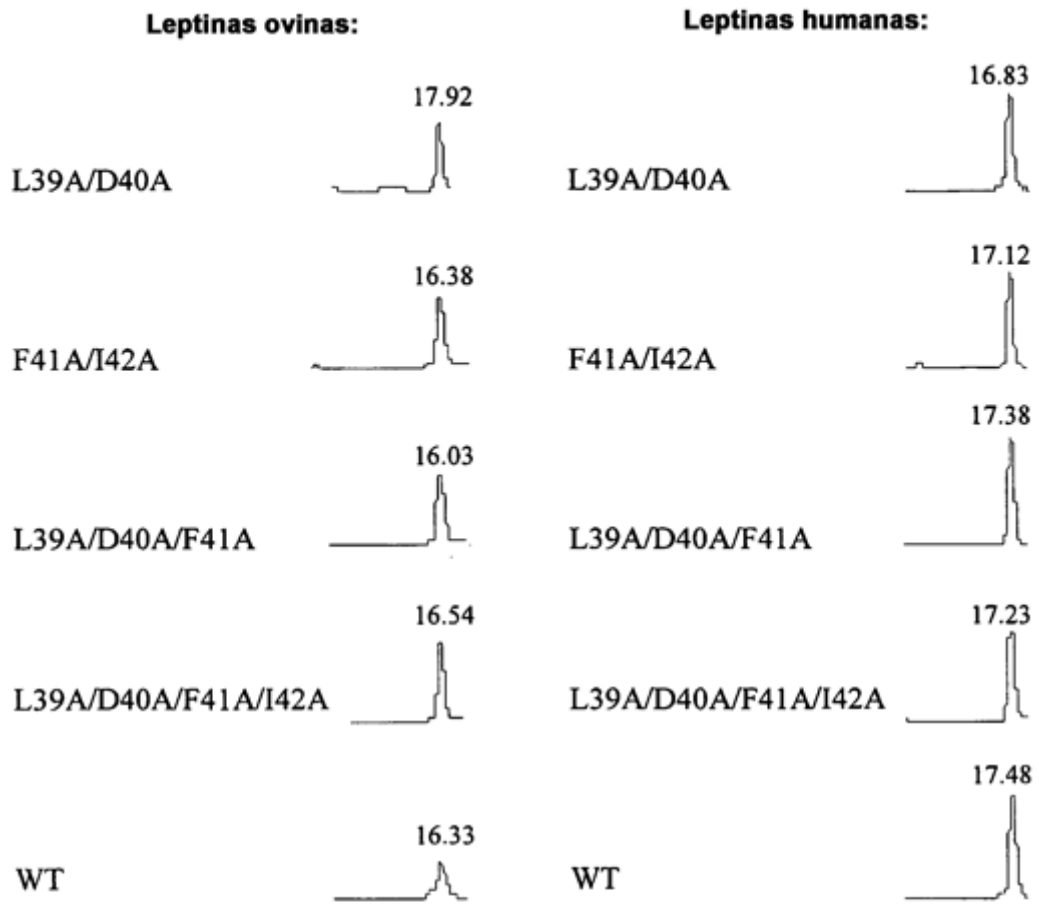


Fig. 1A

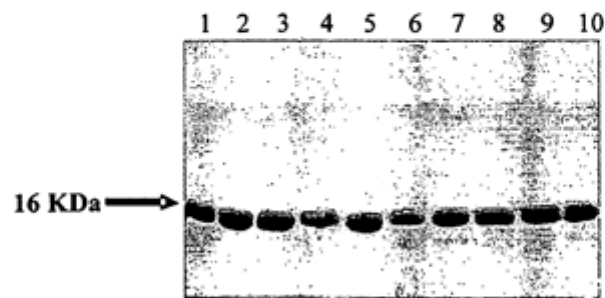


Fig. 1B

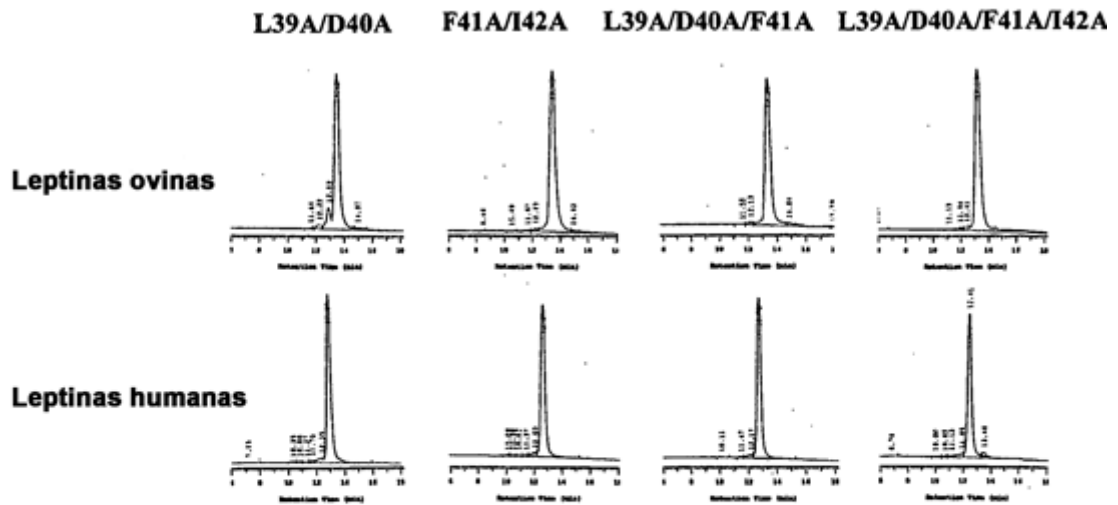


Fig. 1C

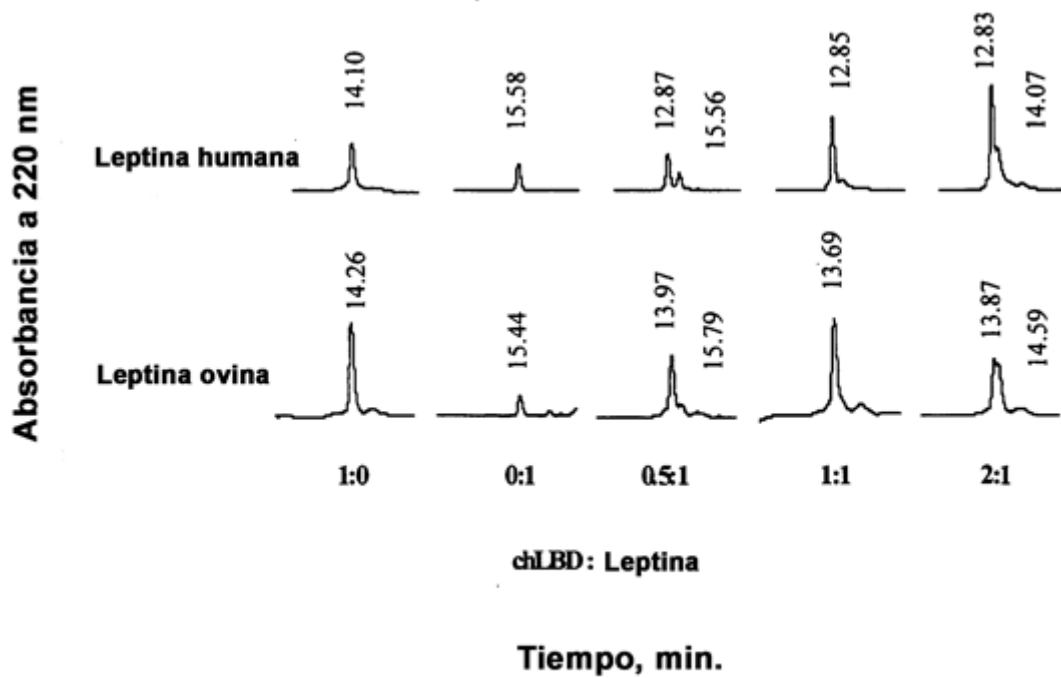


Fig. 2

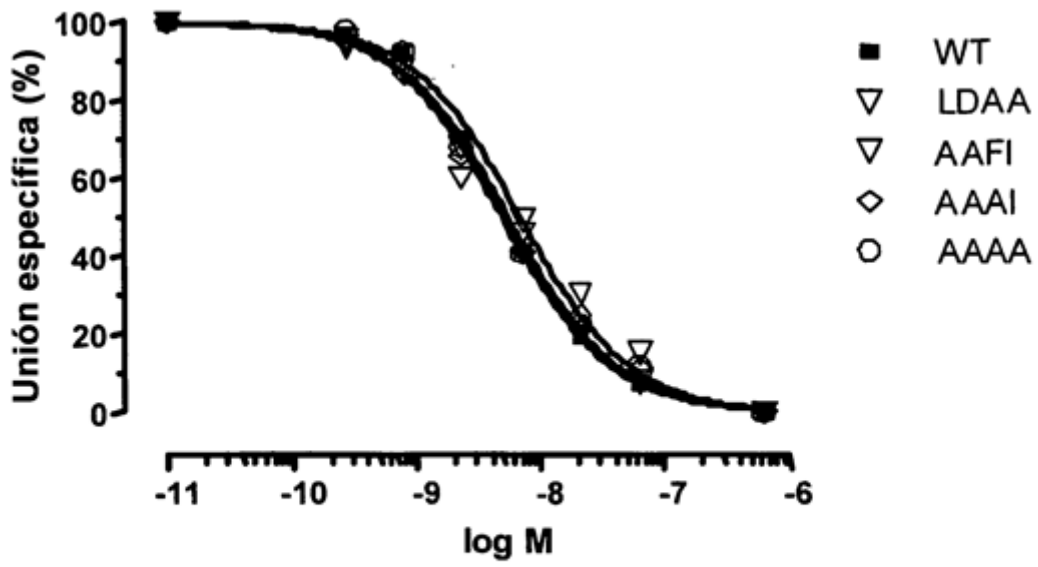


Fig. 3A

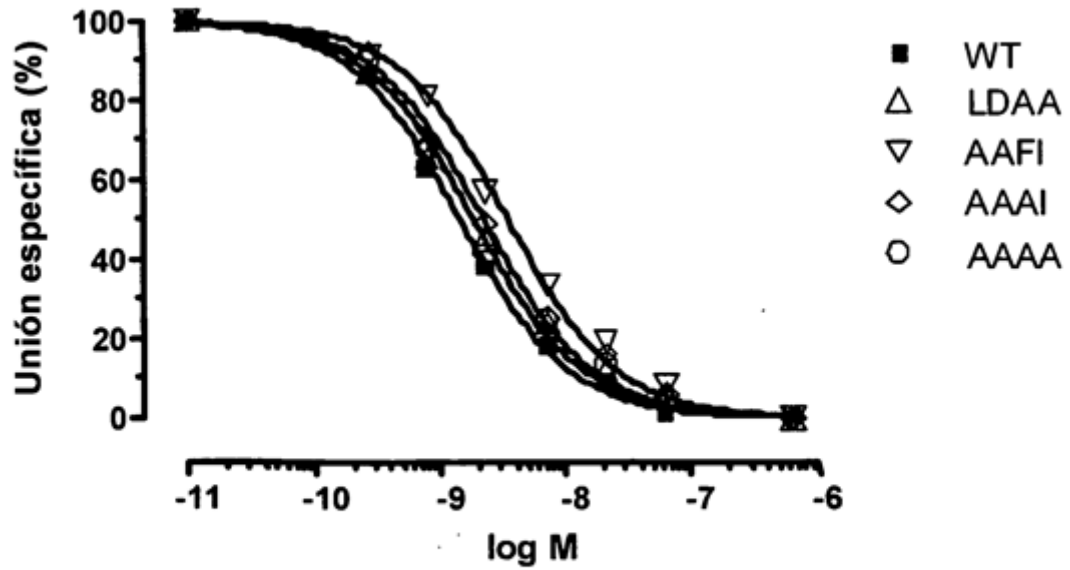


Fig. 3B

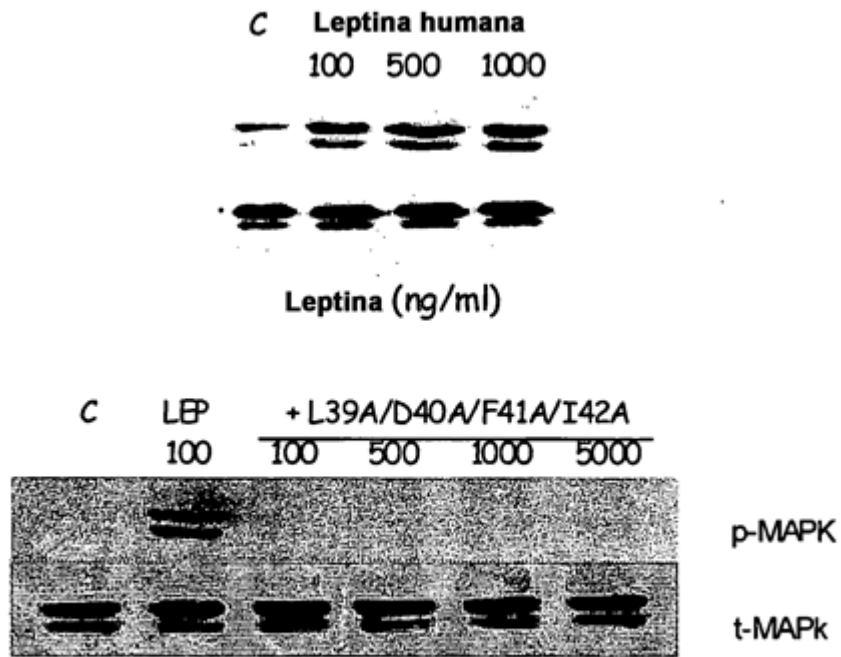


Fig. 4A

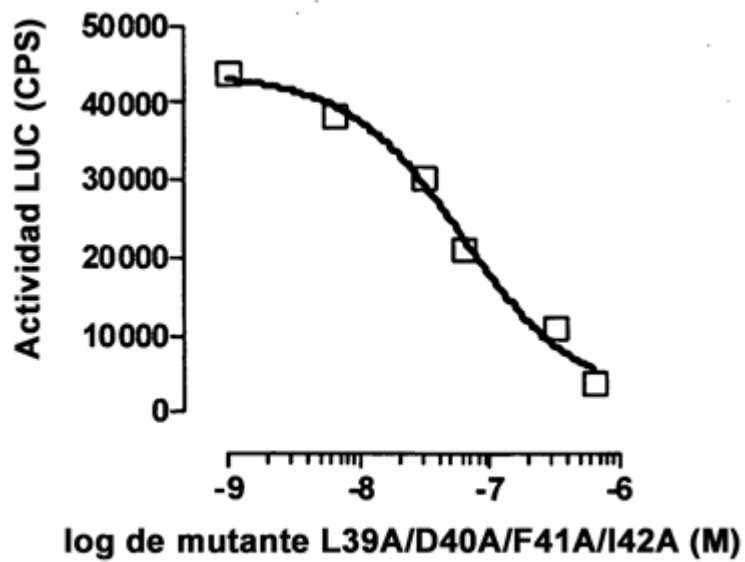


Fig. 4B

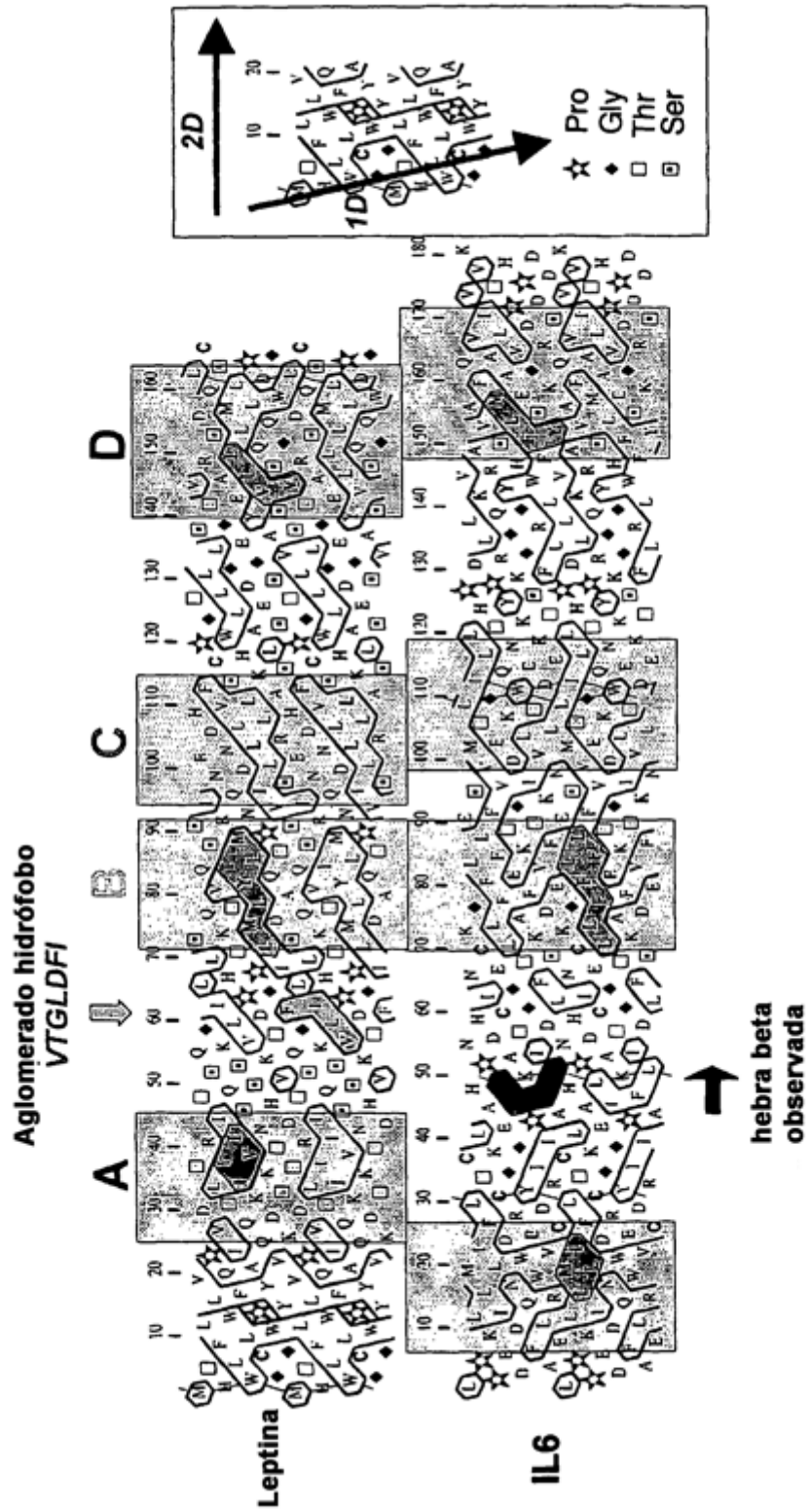




Fig. 6