

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 341**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04797956 .2**

96 Fecha de presentación: **17.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1692181**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Antagonista de la leptina y método para la medida cuantitativa de la leptina**

30 Prioridad:
17.11.2003 DE 10353593

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.05.2012

73 Titular/es:
**KLINIKUM DER UNIVERSITAT MUNCHEN
GROSSHADERN-INNENSTADT,
LINDWURMSTRASSE 2A
80337 MUNCHEN, DE y
UNIVERSITY OF SHEFFIELD**

72 Inventor/es:
**STRASBURGER, Christian, J.;
BIDLINGMAIER, Martin;
WU, Zida;
ROSS, Richard, J., M. y
MATARESE, GiuseppeInst**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 380 341 T3

DESCRIPCIÓN

Antagonista de la leptina y método para la medida cuantitativa de la leptina

Esta invención se refiere a anticuerpos o proteínas de fusión específicos, en particular al anticuerpo monoclonal depositado DSM ACC2618 o a una proteína de fusión dirigida a un receptor de la leptina (leptina-R) o una proteína de unión a la leptina (leptina-BP), así como al uso de este anticuerpo o proteína de fusión para análisis cuantitativo, para propósitos terapéuticos y para la preparación de fármacos terapéuticos. Además, la invención se refiere a un método para la determinación cuantitativa de la leptina en la muestra de proteínas de unión a la leptina solubilizadas o suspendidas usando DSM ACC 2618 o proteínas de fusión según la invención, así como a agentes de diagnóstico y kits (de diagnóstico) que contienen este anticuerpo o proteína de fusión.

La leptina (derivada del término griego leptos = delgado) es una hormona proteica que se segrega principalmente por las células grasas (adipocitos). En 1994, la leptina (Zhang et al. (1994) Nature 372, 425) se descubrió como un producto genético del gen de la obesidad (gen ob) con un peso molecular de aprox. 16 kDa, formado por 146 aminoácidos. Juega un papel importante en el metabolismo energético (Friedman et al., (1998) Nature 395, 763-770). Además de su relevancia para el metabolismo energético, se ha descrito entretanto su contribución en la modulación de las células inmunocompetentes (Lord et al., (1998) Nature 394, 6696) o células hematopoyéticas (Sierra-Honigsmann et al., (1998) Science 281, 1683-1686) así como una función permisiva en la inducción de la pubertad (Quinton et al., (1999) J Clin Endocrinol Metab 84(7), 2336-41). La leptina también se ha asociado fuertemente con la diabetes y el fallo cardíaco crónico (CHF) (véase E.M. El-Bindary y A.Z. Darwish, Volumen 7, Nos. 4/5, julio-septiembre 2001, 697-706).

En ratones (ratón *ob/ob*), la ausencia del gen de la leptina (ratón *ob/ob*) da lugar a un sobrepeso masivo (adipositas). Debido al hecho de que la administración de la leptina a ratones *ob/ob* induce una toma de alimento reducida y finalmente una reducción del peso, se ha atribuido a la leptina alguna importancia como un supresor del apetito. De cualquier forma, la situación es mucho más compleja.

El efecto de la leptina está mediado por el receptor de la leptina (leptina-R) (Tartaglia et al., (1995) Cell 83(7), 1263-71), activando así cascadas de señales intracelulares. El receptor de la leptina pertenece a la denominada clase I de la superfamilia de receptores de citoquinas. En muchos receptores de esta familia, una parte extracelular de los receptores de la leptina circula como una proteína de unión a la leptina en la sangre y éste es también el caso para el receptor de la leptina.

Los defectos del receptor de la leptina se identificaron como una causa de problemas de sobrepeso en los seres humanos (Clement et al., (1998) Nature 392, 398-401). A la inversa, los pacientes que padecen anorexia nerviosa (apetito disminuido) aparentemente tienen niveles incrementados de leptina en relación con su masa grasa reducida. Por lo tanto, la determinación de la concentración de la leptina en muestras de sangre o de suero es una herramienta de diagnóstico importante para la clarificación de la causa subyacente a los trastornos alimentarios u obesidad extrema.

Como se ha mencionado anteriormente, El-Bindary y Darwish (2001) han asociado fuertemente la leptina con la diabetes y el fallo cardíaco crónico (CHF). El-Bindary y Darwish (2001) investigaron la interacción de TNF- α , niveles de leptina e insulina en pacientes que padecen CHF. CHF constituye un síndrome complejo asociado con la alteración de varias funciones metabólicas y endocrinas. Existe una evidencia acumulada de que la pérdida de peso y la caquexia observadas en estadios avanzados de CHF constituyen un pronóstico pobre en pacientes que padecen éstos. En particular, se asume que un nivel incrementado de leptina en plasma está implicado en la debilidad asociada con el estadio tardío de fallo cardíaco. Además, el fallo cardíaco crónico se caracteriza por un estado de hiperinsulinemia (Swan et al., Journal of the American College of Cardiology, 1997, 30: 527-32), en el que existe una pérdida llamativa tanto de tejido muscular como adiposo que da lugar a caquexia cardíaca manifiesta en estos pacientes (véase Cleland y Clark, European heart journal, 1998, 19: 1421-2). Por lo tanto, la atención reciente se ha centrado en la actividad citoquina en CHF. Según El-Bindary y Darwish (2001), existe una elevación significativa de TNF- α en el estadio tardío de CHF. Aparentemente, el nivel de TNF- α circulante está elevado en pacientes con CHF avanzado. Se puede asumir que TNF- α puede contribuir a la progresión de la descompensación cardíaca que ocurre en los casos avanzados de CHF. Los resultados también revelan una correlación entre TNF- α y la concentración de leptina en plasma. TNF- α puede actuar directamente en los adipocitos para incrementar la producción del factor lipostático leptina, en el que el nivel de leptina en suero parecer estar bajo el control de TNF- α . Por lo tanto, existe una elevación significativa del nivel de insulina y una correlación con TNF- α en el estadio tardío de CHF. El-Bindary y Darwish (2001) también encontraron evidencia para una correlación positiva entre la leptina plasmática y el nivel de insulina en la enfermedad de estadio tardío. La leptina plasmática incrementada y el incremento asociado de insulina se consideraron otro factor causante de caquexia. El incremento en los niveles plasmáticos de TNF- α , leptina e insulina y la correlación positiva entre ellos en fallo cardíaco en estadio tardío puede constituir uno de varios círculos viciosos de CHF de estadio avanzado.

Como los trastornos del metabolismo energético, en particular los trastornos alimentarios, tales como anorexia nerviosa (apetito disminuido), se observan más frecuentemente, la identificación de antagonistas de leptina eficaces

que puedan reducir, inhibir o incluso bloquear la función de la leptina, tiene un interés y una significancia económica importantes.

Por lo tanto, es un primer objeto de la presente invención proporcionar un antagonista de leptina-R y leptina-BP. Dicho antagonista puede ser adecuado en el tratamiento de enfermedades y/o síntomas asociados con niveles excesivos de leptina, tales como diabetes, caquexia, obesidad, fallo cardíaco crónico (CHF), etc., así como en el desarrollo y suministro de un medicamento y/o terapias para dichas enfermedades.

Mediante el uso de antagonistas de leptina adecuados (como se ha mencionado anteriormente), es posible examinar *in vitro* los mecanismos reguladores y efectos específicos de la leptina por la inhibición selectiva del receptor de la leptina y/o el desplazamiento de la leptina de las proteínas de unión a la leptina.

A la vista de lo anterior, la determinación cuantitativa de la leptina en una muestra y en particular en líquidos corporales fisiológicos - tales como por ejemplo sangre - es un prerrequisito para el tratamiento terapéutico y una herramienta de diagnóstico importante. Muchas, por ejemplo, hormonas u otras sustancias mensajeras (ligandos), se unen específicamente a sus receptores de membrana, cuyo dominio o dominios extracelulares están frecuentemente solubilizados o suspendidos en el líquido. De esta manera, se forma un complejo compuesto por los ligandos a determinar, por ejemplo, leptina (ligando) y la proteína de unión a leptina, que influye (reduce) en el nivel del ligando libre en la muestra. Con el fin de evitar este problema, se usa un ligando marcado y añadido a la muestra. Sin embargo, la proteína de unión puede unirse al ligando marcado en la disolución y así el ligando no es detectable en la muestra. Por lo tanto, la proteína de unión interfiere con la medida cuantitativa del ligando y el diagnóstico.

Generalmente, los denominados inmunoensayos se usan para el análisis de la concentración de leptina. Se basan en el principio de una interacción de anticuerpos específicos con un analito. Alternativamente, se usan ensayos competitivos (tales como el radioinmunoensayo, RIA), en los que la leptina marcada compite con la leptina presente en la muestra por el sitio de unión en un anticuerpo, generando así una señal que es inversamente proporcional a la concentración del analito que se va a determinar. Sin embargo, actualmente, se usan lo más frecuentemente los inmunoensayos en sandwich, en los que un anticuerpo específico inmovilizado se une al analito ("anticuerpo de captura") y posteriormente, un segundo anticuerpo marcado, dirigido a un epítipo diferente del analito, se une al analito, que queda inmovilizado. Esto genera una señal, que es proporcional a la cantidad de analito unido. El ejemplo mejor conocido de este método de medida es el "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima" (ELISA) con un punto final colorimétrico. Otras posibilidades para la generación de una señal son radiactividad, quimioluminiscencia o fluorescencia (en tiempo resuelto).

Todos los métodos de ensayo mencionados anteriormente se basan en el principio de la unión de alta afinidad, específica entre un anticuerpo dirigido a, por ejemplo, un ligando hormonal - leptina en este caso - y el ligando hormonal en la muestra que se va a analizar.

La fuente principal de interferencia en la medida de la leptina en suero o sangre es la presencia de una proteína de unión a la leptina de alta afinidad, concretamente la parte extracelular soluble del receptor de la leptina en suero humano. El efecto de esta proteína de unión a la leptina en el resultado de la medida puede causar valores erróneamente altos o erróneamente bajos, siempre dependiendo del tipo de ensayo usado (ensayo competitivo o ensayo en sandwich). En el ensayo competitivo, por una parte, la leptina marcada (también denominada "trazador") puede unirse a la proteína de unión a la leptina, eliminándose así de la disolución, lo que resulta en concentraciones erróneamente altas. Por otra parte, la proteína de unión a la leptina también puede bloquear estéricamente la interacción del anticuerpo específico con las moléculas de leptina de una muestra de suero y también puede causar así concentraciones erróneamente bajas en el ensayo competitivo. Por el contrario, esta obstrucción estérica de la interacción entre el anticuerpo y la hormona provoca generalmente resultados erróneamente bajos en el inmunoensayo en sandwich, ya que se unirá menos hormona o menos anticuerpo de detección. El error en los resultados de la medida causados por esta interferencia se vuelven particularmente relevantes en presencia de determinadas afecciones fisiológicas o patológicas que están asociadas con un cambio en la concentración de leptina en la sangre.

Como la leptina-BP se une a la leptina en una muestra y reduce así la cantidad de leptina libre en la muestra, puede obtenerse una determinación no inequívoca de las concentraciones fisiológicas de leptina. Así, debido a la presencia de proteínas de unión a la leptina solubles, todos los datos experimentales para los niveles de leptina en los fluidos corporales están sesgados por las interferencias entre la leptina y la proteína de unión a la leptina.

Con el fin de desarrollar un método de diagnóstico estandarizable o un tratamiento terapéutico para enfermedades tales como obesidad, diabetes y/o fallo cardíaco crónico (CHF), etc., existe una necesidad de sustancias o moléculas selectivas, específicas y eficaces que se unan a un receptor de la leptina y/o a una proteína de unión a la leptina. Hasta la fecha, sólo se conocen unas pocas sustancias o moléculas que se unan selectivamente, específicamente y eficazmente a un receptor de la leptina y/o una proteína de unión a la leptina. La selectividad y especificidad son prerrequisitos para la determinación cuantitativa y cualitativa. Gonzales et al. (Gonzales et al., (2003) Mol Hum Reprod 9(3), 151-8) por ejemplo informan sobre anticuerpos policlonales que parece que inhiben los efectos de la leptina en un cierto grado. Sin embargo, dichos anticuerpos policlonales no pueden reproducirse, no pueden humanizarse y sólo están disponibles en cantidades limitadas.

Por otra parte, las soluciones alternativas para evitar las inexactitudes en la medida se refieren a métodos de extracción metódicos, que se realizan antes del método de medida real en sí mismo, con el fin de eliminar, por ejemplo, las proteínas de unión a la leptina. De cualquier forma, esto implica unos esfuerzos significativamente incrementados respecto a los métodos usados y puede dar lugar simultáneamente a resultados equívocos.

5 Conjuntamente, hasta la fecha no hay una solución satisfactoria en la técnica para las dificultades de eliminar las proteínas de unión a la leptina solubles en muestras que se van a analizar.

Por lo tanto, es un segundo objeto de la invención proporcionar un método para obtener resultados fiables del nivel de ligando, por ejemplo leptina, de una muestra que contiene proteína o proteínas de unión a la leptina o receptores de la leptina con su o sus ligandos.

10 Este objeto se resuelve por la presente invención, que puede rendir métodos de ensayo, en particular ensayos para la determinación de la leptina (líquido corporal), menos susceptibles de interferencia falsificadora por la proteína de unión a la leptina. Dicho método puede ser adecuado para el diagnóstico de enfermedades y/o síntomas asociados con niveles excesivos de leptina, tales como diabetes, caquexia, obesidad, fallo cardíaco crónico (CHF), etc.

15 Los inventores de la presente invención han tenido éxito en identificar y proporcionar una molécula - en la forma de un anticuerpo - que en esencia evita específicamente la unión de la leptina a un receptor de la leptina (leptina-R) y desplaza la leptina, que está unida a una proteína de unión a la leptina, de esta proteína de unión a la leptina (leptina-BP).

20 Por lo tanto, la invención proporciona el anticuerpo descrito DSM ACC 2618 frente a un receptor de la leptina (leptina-R) y/o una proteína de unión a la leptina (leptina-BP), caracterizado porque fundamentalmente reduce y, preferiblemente, evita la interacción del receptor de la leptina y/o la proteína de unión a la leptina con su ligando, es decir, la leptina. La invención también proporciona un fragmento de anticuerpo de cadena única caracterizado por SEQ ID NO:6.

25 Una "proteína de unión a la leptina" o "proteína de unión" (ambas denominadas leptina-BP) o "receptor de la leptina" (leptina-R) en el significado de esta invención comprende todas las proteínas, que pueden unirse con alta afinidad (específicamente) a la leptina que se va a determinar en una muestra. La proteína de unión a la leptina es habitualmente soluble o está presente en la muestra como una suspensión. La proteína de unión a la leptina se encuentra habitualmente en muestras de líquido corporal, por ejemplo, suero, como la parte extracelular del receptor de la leptina. De cualquier forma, también puede estar localizada cerca de la membrana celular. Los ejemplos se

30 secuencias humanas de dichas proteínas de unión a la leptina o proteína de unión o receptores de la leptina son las secuencias O95274, P48357 y O15243 (fuente: Swiss-Prot/TrEMBL). Preferiblemente, son proteínas de unión a la leptina o proteínas de unión o receptores de la leptina de origen humano, sin embargo, esta invención también comprende proteínas correspondientes de todos los demás vertebrados, en particular mamíferos, tales como rata, ratón, cerdo, caballo, ganado. Los ejemplos de dichas secuencias son O02671, Q9MYLO, P48356, Q62959, O89013, Q9JLS8 (fuente: Swiss-Prot/TrEMBL). Preferiblemente, la proteína de unión a la leptina es una proteína de

35 unión a la leptina fisiológica, solubilizada o suspendida en líquido, preferiblemente líquido corporal.

Según la presente solicitud, el término "anticuerpo" comprende DCM ACC 2618. Los fragmentos de DSM ACC 2618 según la presente invención se definen adicionalmente más adelante y están representados por el fragmento de anticuerpo de cadena única cuya SEQ es NO:6.

40 DSM ACC 2148 está dirigido al dominio extracelular de un receptor de la leptina, en particular a una proteína de unión a la leptina. En una realización más preferida, DSM ACC 2618 está dirigido al sitio de unión de la leptina en una proteína de unión a la leptina, a la que se une el ligando (por ejemplo leptina). Además, el ligando es preferiblemente leptina. En este contexto, el término "anticuerpo dirigido al sitio de unión de la leptina en una proteína de unión a la leptina" significa que el anticuerpo como un epítopo de unión se une específicamente y con alta afinidad al sitio de unión del ligando (por ejemplo, leptina) en la proteína de unión a la leptina.

45 Los "fragmentos" de un anticuerpo según la presente solicitud también están englobados por la presente invención representados por SEQ ID NO:6.

El fragmento de anticuerpo de cadena única de la presente invención comprende o consiste en preferiblemente una secuencia de aminoácidos, estando codificada por SEQ ID NO:5 o comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.

50 En una realización más preferida, un fragmento de un anticuerpo de la presente invención comprende o consiste en una secuencia de proteína codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO:5. Alternativamente, dicho fragmento comprende o consiste en una secuencia de proteína seleccionada de SEQ ID NO:6 o

55 En una realización específica, el anticuerpo según la presente invención es el anticuerpo ZMC2. ZMC2 es un anticuerpo monoclonal, dirigido al sitio de unión de la leptina humana en la proteína de unión a la leptina humana y en el marco de la invención se ha optimizado para la solución de este problema. El anticuerpo monoclonal ZMC2 se ha depositado en forma viable por el solicitante con el registro fechado el 25 de septiembre, 2003 con el número de

depósito DSM ACC2618 junto con la referencia "ZMC2", asignada por el depositante, según las estipulaciones del Tratado de Budapest en DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) en Braunschweig.

La presente invención también proporciona "proteínas de fusión". Una "proteína de fusión" según la presente invención comprende típicamente una parte I y una parte II, en la que la parte I puede ser cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la presente invención fusionado con otros constituyentes-(proteína) como parte II. Típicamente, la parte I de dicha proteína de fusión representa un anticuerpo de longitud completa. Alternativamente, la parte I de dicha proteína de fusión puede comprender cualquiera de los fragmentos mencionados anteriormente de un anticuerpo de la invención, preferiblemente V_H o V_L . (Los constituyentes de proteína como parte II de una proteína de fusión de la presente invención comprenden típicamente cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la presente invención, o cualquier péptido o proteína, que forma interacciones con otras proteínas, por ejemplo, ligandos de leptina-R y/o leptina-BP, preferiblemente leptina o fragmentos o variantes de la leptina. Se prefiere usar componentes como parte II, que reconozcan específicamente células que se van a tomar como diana por la proteína de fusión de la invención. Las células que se van a tomar como diana son típicamente adipocitos, células de tejido conectivo y otras células que unen leptina. Un fragmentos de una leptina como se usa en la proteína de fusión de la invención es preferiblemente una molécula acortada de leptina, todavía capaz de unirse al sitio de unión de la leptina de leptina-R o leptina-BP. Una variante de una leptina- como se usa en la proteína de fusión de la invención es preferiblemente una molécula de leptina de longitud completa, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos, pero que todavía es capaz de unirse al sitio de unión de la leptina de leptina-R o leptina-BP: Por lo tanto, la proteína de fusión de la invención es preferiblemente "bienespecífica", es decir, es capaz de unirse a dos moléculas diana, en la que la parte I es específica para la molécula diana I y la parte II es específica para la molécula diana II. Si la proteína de fusión de la invención comprende por ejemplo leptina como parte II de la proteína de fusión, puede actuar como un denominado "super-antagonista". Esto es debido al hecho de que la leptina se une como un dímero a. Consecuentemente, una proteína de fusión que consiste en un anticuerpo de la invención (o un fragmento de éste, ambos actuando como un antagonista) como parte I y leptina (o un fragmento de ésta, o una molécula de leptina de alta afinidad) como parte II permite a una proteína de fusión unirse con una mayor fuerza y una mejor especificidad a leptina-R o leptina-BP y desplazar a la leptina de su unión a leptina-R o leptina-BP incluso más eficazmente que un anticuerpo de la invención como tal.

Los constituyentes DSM ACC 2618 de las proteínas de fusión (como parte I o II) se proporcionan típicamente usando los métodos de escisión enzimática, síntesis de proteínas o usando métodos recombinantes, como conoce un experto en bioquímica o biología molecular.

La proteína de fusión de la invención puede comprender DSM ACC 2618 (o un fragmento de éste, ambos actuando como un antagonista) como parte I y un segundo anticuerpo como parte II. Alternativamente, la proteína de fusión de la invención puede comprender un anticuerpo de la invención (o un fragmento de éste, ambos actuando como un antagonista) como parte I y un fragmento scFv del anticuerpo de la invención como parte II. Dicha proteína de fusión permite dirigir potencialmente el anticuerpo a un tipo celular específico, por ejemplo, para obtener proteínas de fusión bienespecíficas de esta manera. Preferiblemente, la proteína de fusión bienespecífica está dirigida a un receptor de la leptina y/o una proteína de unión a la leptina como primera especificidad y a una proteína de la superficie celular como segunda especificidad de la parte II. El anticuerpo de la invención, tal como ZMC2, puede estar unido a un anticuerpo, tal como CD4- F_{ab} dirigido, por ejemplo, a CD4 (o CD1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, CD 25, CD44, etc.). Por ejemplo, los anticuerpos que reconocen proteínas de la superficie celular de células inmunes específicas permiten a una proteína de fusión de la invención unirse específicamente a células inmunes. En este caso, la afinidad de ambos F_{ab} podría alterarse para obtener un efecto preferencial. Por ejemplo, un CD4- F_{ab} de alta afinidad como anticuerpo bienespecífico podría estar dirigido a células CD4.

Las partes I y II de la proteína de fusión de la invención pueden estar unidas opcionalmente por una secuencia conectora. Preferiblemente, el conector comprende una longitud de aproximadamente 5 a 40 aminoácidos, más preferiblemente entre 5 y 30 aminoácidos y lo más preferiblemente entre 5 y 20 aminoácidos. También preferiblemente, el conector comprende una secuencia que contiene al menos 50% de residuos de glicina, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% y lo más preferiblemente al menos 80%.

En una realización específicamente preferida, la proteína de fusión de la presente invención comprende o consiste en una secuencia de proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:7 o la secuencia de proteína SEQ ID NO:8.

Además, DSM ACC 2618, un fragmento de éste o una proteína de fusión según la presente invención, puede tener adicionalmente acopladas covalentemente (o no covalentemente) moléculas o grupos, por ejemplo, un marcador de fluorescencia u otros marcadores, por ejemplo, un marcaje de oro, o epítomos específicos, que pueden ser reconocidos por terceras moléculas.

La materia de la invención descrita en la presente memoria son también mezclas (composiciones) de DSM ACC 2618 en el sentido anterior, por ejemplo mezclas de anticuerpos monoclonales o mezclas de anticuerpos monoclonales con fragmentos de anticuerpo, mezclas de anticuerpos anti-idiotípicos etc.

Otra realización de la presente invención es un método para determinar preferiblemente cuantitativamente un ligando en una muestra que contiene el ligando de una proteína de unión, por ejemplo, en forma solubilizada o suspendida, en el que al menos DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención según la presente invención se añade a la muestra que se va a determinar (etapa a). Este método de la invención (etapa a) puede seguirse de una segunda etapa (etapa b) que determina la concentración de ligando en la muestra.

Según el presente método de la invención, DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención puede añadirse a la muestra antes o durante, preferiblemente antes, de la determinación cuantitativa de la concentración de ligando, por ejemplo leptina, en la muestra y/o puede incubarse junto con la muestra.

DSM ACC 2618 según la presente invención, que se une exactamente y con alta afinidad al sitio de las proteínas de unión a la leptina, al que se une el ligando, se prefiere especialmente. Debido a la unión de la molécula de la invención, por ejemplo, DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención, se produce un desplazamiento del ligando (leptina) de la proteína de unión a la leptina, evitando la unión simultánea del ligando. Este desplazamiento dependerá obviamente del incremento de la cantidad de DSM ACC 2618 o proteína de fusión de la invención añadida. Así, un gran exceso de DSM ACC 2618 o de la proteína de fusión de la invención respecto a la concentración molar de la proteína de unión a la leptina es lo más favorable para llevar a cabo el método de la invención.

El ligando (por ejemplo leptina) se "libera" mediante el desplazamiento y puede medirse posteriormente cuantitativamente sin la inhibición estérica debida a la actividad de unión de la proteína de unión a la leptina.

Un "ligando" tal y como se usa en un método de la invención comprende típicamente todos los compuestos que se unen con alta afinidad a un receptor de leptina y/o a una proteína de unión a la leptina y permite una medida de su concentración en ensayos específicos, y todos los compuestos que también se determinan, por ejemplo para propósitos médicos. Por ejemplo, las sustancias mensajeras, tales como hormonas, transmisores, por ejemplo, neurotransmisores, péptidos señal extracelulares o proteínas, citoquinas, quimioquinas, linfoquinas, etc, son compuestos en el significado de la presente invención. La leptina es un ligando preferible de la invención. Un ligando en el significado de la presente invención también puede ser un "ligando fisiológico". Dicho "ligando fisiológico" es típicamente un ligando en el sentido anterior, que se encuentra en el cuerpo de un vertebrado, en particular en un líquido corporal, sin ser añadido exógenamente. De manera correspondiente, también es aplicable a la proteína de unión a la leptina fisiológica, en la que es también la proteína de unión a la leptina del ligando fisiológico, que se encuentra naturalmente en condiciones fisiológicas.

Una "muestra" en el sentido de esta invención debe entenderse típicamente como cualquier tipo de disolución que se va a ensayar, en particular disoluciones de sustancias médicamente relevantes, tales como por ejemplo sangre, linfa, suero, orina, licor, también en una forma procesada, preparada para el manejo de la muestra. Asimismo, es preferible, si la muestra que se va a determinar en el método de la invención contiene líquido, preferiblemente líquido corporal, más preferiblemente líquido corporal humano, en particular sangre o sangre humana.

Un "líquido corporal" debe entenderse como cada líquido obtenido del cuerpo de un vertebrado, en particular un mamífero, en particular de un ser humano en el caso de los seres humanos, éste sería por ejemplo sangre, orina o linfa, pero también preparaciones citosólicas de células humanas.

El término "en forma solubilizada o suspendida" en el significado de la presente invención debe entenderse como cualquier forma de disolución de las proteínas de unión a la leptina o del ligando en el sentido más amplio en el medio de disolución. Esto también incluye situaciones en las que por ejemplo la proteína de unión a la leptina está cerca de precipitar o ya ha precipitado, siempre que todavía sea un constituyente de la disolución.

La "determinación cuantitativa" en el contexto del método de la invención debe entenderse como cualquier método conocido por un experto en la técnica para determinar la cantidad de un analito disuelto en una muestra. Esto incluye explícitamente, por ejemplo, la cuantificación usando métodos cromatográficos con un estándar concurrente, en particular una cuantificación usando la interacción de alta afinidad entre el anticuerpo y el ligando (antígeno) mediante ensayos competitivos o ensayos de unión, tales como por ejemplo ensayo en sandwich, también en el formato ELISA. Una ventaja específica de esta invención es el hecho de que la adición de un anticuerpo antagonista específico o una proteína de fusión de la invención a una muestra como se describe en la presente memoria puede combinarse con prácticamente todos los kits de ensayo o sistemas de ensayo conocidos - en particular disponibles comercialmente - para el análisis cuantitativo del analito respectivo (ligando) sin ningún esfuerzo.

En el método de la invención, preferiblemente DSM ACC o una proteína de fusión de la invención se añade antes o durante, preferiblemente antes de la determinación cuantitativa y/o se incuba con la muestra.

La muestra que se va a ensayar se incuba típicamente junto con DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención. El término "incubación" tal y como se usa en la presente memoria debe entenderse como una condición de reacción, en la que los integrantes de la reacción, en otras palabras DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención y la proteína de unión a la leptina se permite que reaccionen entre sí. Típicamente, DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención se añade a una muestra que contiene proteína de unión a la leptina y leptina. La incubación se realiza generalmente durante un periodo limitado de tiempo, en este caso por ejemplo 6, 12, 18 ó

24 horas. El término incubación tiene que entenderse principalmente como etapa anterior - por ejemplo durante un periodo de 6, 12, 18 ó 24 horas - antes del inicio de la medida cuantitativa (por ejemplo con un kit de ensayo disponible comercialmente) usando anticuerpo B para la detección del ligando (leptina).

5 En otra realización preferida del método según la presente invención, la proteína de unión a la leptina es una pareja fisiológica del ligando.

El método según la presente invención también es útil cuando el ligando y/o la proteína de unión a la leptina se han añadido externamente (exógenamente), por ejemplo, después de una inyección u otra captación de, por ejemplo, la leptina como un ligando en pacientes o personas de ensayo.

10 El presente método de la invención puede usarse para medir cualquier ligando de "proteínas de unión". Las proteínas de unión son proteínas que interaccionan con otras proteínas. Un ejemplo de una proteína de unión es la proteína de unión a la leptina o el receptor de leptina, que interacciona con la leptina. La proteína de unión, tal y como se usa en un método según la presente invención, es preferiblemente soluble, más preferiblemente un receptor soluble (de leptina).

15 En una realización preferida del método según la presente invención, el ligando que se une por una "proteína de unión" es un compuesto peptídico y/o una hormona, preferiblemente una hormona peptídica, en particular leptina, o una proteína de unión a hormona. El término "peptídico" debe entenderse aquí que comprende cualquier compuesto, cuyos constituyentes están unidos predominantemente entre sí por un enlace peptídico (tal como R1-NH-C(O)-R2).

20 Las proteínas de unión a hormonas, si se usan como ligandos en el método de la invención, son preferiblemente proteínas de unión (véase más adelante), que se unen a hormonas afines. Una "hormona" en la presente memoria debe entenderse como un sustancia mensajera química, que actúa a una distancia de su sitio de síntesis y liberación. Las hormonas se producen preferiblemente por glándulas endocrinas, por ejemplo, la hipófisis, gónadas o epífisis. Los ejemplos son la hormona del crecimiento o la hormona luteinizante LTH, insulina, melatonina, glucagón, gastrina, angiotensina, sustancia P, interleuquinas, vasopresina, endorfinas, enkefalinas, relaxina, el factor atrionatriurético o también leptina.

25 En una realización específicamente preferida del método según la presente invención, el ligando usado en dicho método es leptina humana y la proteína de unión a la leptina es proteína de unión a la leptina humana. Además, DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención está dirigida preferiblemente al sitio de unión de la leptina en la proteína de unión a la leptina.

30 Además, se prefiere añadir un anticuerpo B adicional, preferiblemente un anticuerpo monoclonal B, si un ligando de la proteína de unión según el método de la invención se determina cuantitativamente. Dicho "anticuerpo B", preferiblemente un "anticuerpo monoclonal B", es típicamente un anticuerpo anti-ligando, es decir, un anticuerpo que está dirigido a cualquier ligando según la presente invención pero no a leptina-R o leptina-BP. Es ventajoso, si la determinación cuantitativa en el método de la invención se realiza usando un ensayo de unión competitivo, preferiblemente un "radioinmunoensayo" (RIA). Asimismo, es típicamente favorable determinar cuantitativamente la
35 concentración de ligando leyendo una señal, que depende de la concentración de ligando que se va a determinar, preferiblemente usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y/o un ensayo en sandwich.

En otra realización preferida del método según la presente invención, no se efectúa una separación de las proteínas de unión a la leptina de la muestra que se va a determinar antes de la determinación cuantitativa. En particular, esto significa, que no se requiere para la invención descrita extraer la proteína de unión a la leptina de la muestra antes
40 de su análisis cuantitativo, a diferencia de los métodos de la técnica para la determinación de concentraciones de ligando. En la técnica, se realiza prácticamente cada forma de extracción, en la que el ligando que se va a determinar - tal como por ejemplo la hormona - permanece en la muestra, mientras que la proteína de unión se separa de la muestra, por ejemplo, por precipitación y/o filtración con límites de exclusión por peso molecular determinados, métodos cromatográficos, tales como por ejemplo cromatografía de afinidad o HPLC, diálisis en
45 tamaños de ligando determinados, etc. Precisamente esta etapa puede evitarse, preferiblemente mientras se usa el método según la presente invención. Debido a la selección de DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención, ni DSM ACC 2618 ni la proteína de fusión de la invención ni el complejo formado por DSM ACC 2618 la proteína de fusión de la invención y la proteína de unión a la leptina es capaz de unirse al ligando que se va a determinar. Por lo tanto, en la muestra la determinación no presenta ya interferencia o falsificación por la interacción
50 ligando/proteína de unión, incluso si la proteína de unión a la leptina formando un complejo permanece en la muestra. Sin embargo, el uso de los anticuerpos B altamente afines para la medida cuantitativa no interfiere, ya que no se unen a DSM ACC 2618 la proteína de fusión de la invención, a la proteína de unión a la leptina o al complejo formado por ambos, sino exclusivamente al ligando en sí mismo.

55 Esta ventaja se observa en particular en un método especialmente favorable y preferente según la presente invención, en el que dsm acc 2618 la proteína de fusión de la invención se añade de tal manera que posteriormente a la adición la concentración molar de DSM ACC es igual o preferiblemente mayor que la concentración molar de la proteína de unión a la leptina, preferiblemente al menos 50% mayor, más preferiblemente al menos dos veces

mayor, más preferiblemente al menos tres veces mayor y en particular al menos cuatro veces mayor que la concentración de la proteína de unión a la leptina.

Precisamente, esta adición de DSM ACC 2618 la proteína de fusión de la invención en cantidades excesivas respecto a la proteína de unión a la leptina es especialmente favorable, ya que en presencia de un exceso suficiente de DSM ACC 2618 la proteína de fusión de la invención, todos los ligandos se desplazan completamente de la proteína de unión a la leptina y por lo tanto se vuelven mensurables. Como la proteína de unión a la leptina está en complejo cuantitativamente, no interfiere más con la concentración de ligando.

La cantidad correcta y suficiente de DSM ACC 2618 o de la proteína de fusión de la invención que se añade a la muestra con el fin de proporcionar una medida cuantitativa del ligando sin fenómenos de interferencia, puede determinarla el experto por ensayos preliminares simples. La adición óptima depende de la cantidad de una proteína de unión a la leptina en la muestra y eventualmente del sistema de ensayo cuantitativo usado o de la cantidad de ligando que se va a determinar.

En una realización preferida de la presente invención, un ligando se determina cuantitativamente usando el anticuerpo B, dirigido al ligando, preferiblemente un anticuerpo monoclonal B, en una muestra que contiene sangre humana. A este respecto, el ligando y una proteína de unión a la leptina están preferiblemente contenidos en forma solubilizada o suspendida, y DSM ACC 2618 A/una proteína de fusión de la invención está dirigido al sitio de unión del ligando en la proteína de unión a la leptina. Preferiblemente, DSM ACC 2618, se añade a la muestra que se va a determinar en cantidades excesivas significativas comparadas con la cantidad de proteína de unión a la leptina, antes o durante la determinación cuantitativa del ligando, preferiblemente antes de la etapa b (determinación cuantitativa, añadiendo e incubando el anticuerpo B).

Preferiblemente, el ligando como se usa en un método según la presente invención es leptina.

El presente método de la invención típicamente evita la interferencia de la proteína de unión a la leptina con la leptina añadiendo cantidades altamente excesivas de DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención a la muestra que se va a determinar. DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención están dirigidos a la proteína de unión a la leptina. DSM ACC 2618 se usa en el método de la invención. Se ha seleccionado debido a su propiedad particularmente preferida para unirse a la molécula de la proteína de unión a la leptina exactamente en el mismo sitio de unión que la molécula de leptina. Si se añaden cantidades excesivas de DSM ACC 2618 A, da lugar a un desplazamiento de las moléculas de leptina de su unión a la proteína de unión a la leptina. La leptina se "libera" y puede medirse por cualquier inmunoensayo para leptina sin el bloqueo estéricamente inducido por la proteína de unión a la leptina. Como DSM ACC 2618 en si mismo o la proteína de fusión de la invención en si misma no interfieren con los "anticuerpos anti-leptina" (anticuerpo B) usados para la medida de la leptina (ligando), la eliminación de los complejos que consisten en DSM ACC 2618 proteína de fusión de la invención y proteína de unión a la leptina de la muestra es irrelevante. Prácticamente, por ejemplo se añade un anticuerpo especial anti-proteína de unión a la leptina ZMC2 con su propiedad de desplazamiento de la leptina o una proteína de fusión de la invención a la muestra antes del análisis. Después de la incubación con ZMC2, la determinación del ligando sigue las directrices del fabricante respectivas.

Otra realización de la invención se refiere a un medicamento o una vacuna que contiene DSM ACC 2618 y/o al menos una proteína de fusión de la invención. Preferiblemente, se describe un medicamento o una vacuna que contiene al menos DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención según la presente invención y opcionalmente aditivos y/o adyuvantes. Eventualmente, pueden estar presentes sustancias activas adicionales en el medicamento o vacuna según la presente invención.

El medicamento o vacuna que contiene al menos DSM ACC 2618 y/o una proteína de fusión de la invención según la presente invención es adecuado, por ejemplo, para el tratamiento de niveles excesivos de leptina. El anticuerpo de la invención puede inhibir - preferiblemente completamente - todos los sitios de unión del receptor de la leptina. Como consecuencia, la leptina no puede unirse a su receptor de leptina y/o el DSM ACC 2618 terapéutico la proteína de fusión de la invención desplaza la leptina, que está unida a una proteína de unión a la leptina, de su sitio de unión.

Según una realización adicional, DSM ACC 2618 la proteína de fusión de la invención según la presente invención o un medicamento o vacuna que contiene al menos DSM ACC 2618 la proteína de fusión de la invención puede usarse terapéuticamente como un antagonista de la leptina o puede usarse para la preparación de un medicamento, que inhibe el efecto fisiológico de la leptina humana. El efecto fisiológico se bloquea por DSM ACC 2618 la proteína de fusión de la invención según la presente invención debido a su unión al sitio de unión de la leptina del receptor de unión de la leptina.

Un medicamento o vacuna que contiene DSM ACC 2618 según la presente invención (y, si es aplicable, adyuvantes o aditivos adicionales) y/o proteína de fusión de la invención, puede usarse por lo tanto para propósitos terapéuticos también en cualquiera de aquellas enfermedades, trastornos o afecciones que muestren unos niveles no fisiológicamente incrementados de leptina. Esto también implica, según la presente invención, el uso de DSM ACC 2618 proteínas de fusión, medicamentos o vacunas que contienen al menos DSM ACC 2618 para el tratamiento (o

para la preparación de un medicamento para el tratamiento) de todos aquellos trastornos, enfermedades o patofisiologías, para las que unos niveles excesivos de leptina son etiológicos, por ejemplo, enfermedades del metabolismo energético, trastornos alimentarios patológicos, tales como anorexia o caquexia. DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención, medicamentos o vacunas, que contienen DSM ACC 2618, también pueden usarse en el tratamiento de enfermedades mediadas por TH1 incluyendo esclerosis múltiple, diabetes, diabetes tipo 1, fallo cardíaco crónico (CHF), enfermedades mediadas por TNF, colitis autoinmune, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y rechazo de trasplantes, para la regulación de la proliferación incrementada de células T naturales reguladoras/supresoras y tratamiento de enfermedades asociadas con éstas y enfermedades asociadas con las rutas de señalización MAPK/ERK1-2, AKT, p-27-kip1.

- 10 Además, existen resultados experimentales que documentan una correlación de los valores de leptina y la disposición a trastorno autoinmune.

DSM ACC 2618, medicamentos o vacunas, que contienen o una proteína de fusión de la invención, también pueden usarse para bloquear los efectos inmunes de la leptina. DSM ACC 2618, proteínas de fusión, medicamentos o vacunas que contienen DSM ACC 2618 o una proteína de fusión, pueden usarse por lo tanto para terapia inmune.

- 15 Mediante la administración de DSM ACC 2618 según la presente invención, o una proteína de fusión de la invención o los medicamentos o vacunas de la invención respectivas, los efectos de la concentración patofisiológicamente incrementada de leptina extracelular pueden bloquearse sin disminuir su concentración sérica. Por lo tanto, es altamente útil y prometedor, usar el medicamento o la vacuna de la invención también para el tratamiento de enfermedades tales como la anorexia nerviosa y en los diferentes estadios de caquexia. La hipersecreción de leptina en el caso de diabetes mellitus dependiente de insulina, que se ha hecho responsable de una variedad de secuelas, también puede tratarse con un antagonista de la leptina según la presente invención o un medicamento o vacuna que contiene al menos DSM ACC 2618.

- 20 Cuando sea apropiado, puede llevarse a cabo un tratamiento terapéutico de pacientes afectados por niveles excesivos de leptina en combinación con dichos medicamentos o sustancias activas, que disminuyen la secreción de leptina.

- 25 Un medicamento o vacuna según la presente invención, DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención se prefiere particularmente o puede servir para la preparación de un medicamento, para el tratamiento de afecciones que están asociadas con una activación no deseada del sistema inmune así como con enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes pueden seleccionarse, por ejemplo, de esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, diabetes, diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico (SLE), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, formas autoinmunes de hepatitis crónica, colitis ulcerosa, enfermedades de alergia tipo I, enfermedades de alergia tipo II, enfermedades de alergia tipo III, enfermedades de alergia tipo IV, fibromialgia, alopecia, Enfermedad de Bechterew, Enfermedad de Crohn, Miastenia grave, neurodermitis, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (PSS), psoriasis, síndrome de Reiter, artritis reumática, vasculitis, etc.

- 30 En una realización específica, un medicamento según la presente invención, DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención puede usarse o puede servir para bloquear los efectos periféricos de la leptina. Los efectos "periféricos" se provocan por la inhibición de los efectos de la leptina indirectamente mediante el bloqueo del receptor de la leptina. Por el contrario, la inhibición "central" de la leptina se debe a la interacción directa de un compuesto terapéutico con la leptina.

- 35 La leptina actúa periféricamente, por ejemplo, en el sistema inmune, mientras que los efectos centrales se basan en su unión a órganos de control centrales, por ejemplo, el hipotálamo. La unión de la leptina al hipotálamo da lugar a efectos en el control del peso. Para el tratamiento de determinados trastornos inmunes, la interacción de la leptina con su receptor debe inhibirse, mientras que el nivel de leptina en otras partes del cuerpo (por ejemplo el hipotálamo) deben permanecer inalterados con el fin de evitar una pérdida de peso/ganancia de peso considerable.

- 40 El tratamiento de la técnica del exceso de leptina, por ejemplo, por administración de anticuerpos anti-leptina, disminuye el nivel de leptina en el cuerpo. Después de la administración pueden conseguirse efectos positivos de los anticuerpos anti-leptina en el trastorno inmune del paciente. Sin embargo, pueden aparecer efectos secundarios simultáneos, tales como ganancia de peso debido a niveles disminuidos de leptina libre, por ejemplo en el hipotálamo. El antagonista de la invención permite evitar los efectos secundarios inducidos por los anticuerpos anti-leptina de la técnica. La terapia con anticuerpo anti-receptor de la leptina según la presente invención como se describe en la presente memoria no reduce el nivel de leptina del paciente por el bloqueo selectivo de los receptores de leptina de determinados tejidos sin modificar la capacidad de respuesta a la leptina de otros tejidos (efecto "central" en el hipotálamo). Como ejemplo, mientras se usa un anticuerpo A de la invención, tal como ZMC2, se puede evitar una respuesta inmune sin tener un efecto en el peso, es decir, no hay un cambio significativo en el peso durante el tratamiento con el anticuerpo A de la invención, por ejemplo ZMC2 o la proteína de fusión de la invención.

Típicamente, DSM ACC 2618 o una proteína de fusión de la invención como se usa en un medicamento o una vacuna según la presente invención estará disponible como polvo liofilizado, que contiene entre 0,5 mg y 100 mg del anticuerpo A de la invención, y aditivos adicionales, como por ejemplo glicina, manitol y/o fosfato de sodio

monohidrato. Este polvo liofilizado se proporciona en una disolución acuosa adecuada y se administra posteriormente, por ejemplo subcutáneamente una vez o varias veces al día.

En principio, los medicamentos según la presente invención también pueden administrarse como forma de dosificación líquida, en particular en forma de disoluciones de inyección. Los aditivos y/o adyuvantes adecuados son, por ejemplo, disoluciones o diluyentes, estabilizadores, mediadores de la suspensión, sustancias tamponadoras, conservantes, así como colorantes, expansores y/o aglutinantes. La selección de los adyuvantes así como de las cantidades que se van a administrar depende de si el medicamento debe administrarse por ruta parenteral, intravascular, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. Las preparaciones en forma de suspensiones y disoluciones así como preparaciones secas, que permiten una fácil reconstitución, son adecuadas para todas las aplicaciones parenterales.

Otra realización de la invención es un agente de diagnóstico que contiene al menos un anticuerpo o proteína de fusión según la presente invención así como, cuando sea apropiado, aditivos y/o adyuvantes. Un "agente de diagnóstico" debe entenderse como una preparación o un adyuvante que puede ser útil, por ejemplo, para el diagnóstico de una determinada enfermedad.

Una realización adicional de la invención es un kit que contiene distinto uno del otro al menos una primera preparación que contiene al menos DSM ACC 2618 o una proteína de fusión según la presente invención y un ensayo de prueba operativo listo para usarse, basado en una reacción antígeno/anticuerpo, para la determinación cuantitativa de un ligando, que sirve como un antígeno en este ensayo.

Un kit debe entenderse como una forma en conjunto de diferentes constituyentes en una forma de envase. En este caso es en particular un kit de diagnóstico que contiene los diferentes constituyentes requeridos para el análisis cuantitativo de un ligando.

Se prefiere un kit en el que la primera preparación contiene DSM ACC 2618 o una proteína de fusión, dirigida al sitio de unión del ligando, preferiblemente leptina, especialmente preferentemente leptina humana, en la, preferiblemente proteína de unión de la leptina humana, y/o que contiene, además de la primera preparación y el ensayo de prueba operativo listo para usarse, basado en una reacción antígeno/anticuerpo, para la determinación cuantitativa de un ligando, también una preparación para la calibración.

Una realización especialmente preferida, es un kit según la presente invención, en el que la primera preparación contiene el anticuerpo ZMC2 (depositado, véase anteriormente) y/o la preparación para la calibración y/o el anticuerpo B en el ensayo de prueba operativo adjunto listo para usarse, en el que el ensayo de prueba se basa en una reacción antígeno/anticuerpo para la determinación cuantitativa de un ligando, en el que el anticuerpo B, preferiblemente un anticuerpo monoclonal B, está dirigido al ligando.

Preferiblemente, el ligando es leptina y el anticuerpo B está dirigido a la isoforma principal de la leptina con un peso molecular de 16 kDa.

Una realización adicional de la invención es el uso de al menos un anticuerpo para la determinación, preferiblemente determinación cuantitativa, de un ligando fisiológico, preferiblemente leptina, de una proteína de unión a la leptina fisiológica.

Una materia adicional de la invención es un método para preparar un anticuerpo según la presente invención, es decir un anticuerpo dirigido a una proteína de unión a la leptina, que está dirigido además a un ligando, que comprende las etapas siguientes: (a) inmunización de animales con proteína de unión a la leptina producida recombinantemente, (b) aislamiento de células inmunes del animal, (c) fusión con líneas celulares de mieloma a cultivos de células de hibridoma, (d) selección de clones con alta especificidad para la proteína de unión a la leptina. La inmunización puede realizarse con todos los animales adecuados para dichos propósitos, tales como ratones, conejos, cerdos, caballos, etc. Con el fin de separar dichos clones, que producen los anticuerpos dirigidos a la proteína de unión a la leptina, de los clones de la invención (que producen anticuerpos que están por ejemplo específicamente dirigidos al sitio de unión del ligando de la proteína de unión a la leptina), medios adecuados (por ejemplo pocillos de placas de microtitulación, lechos de poliestireno, tubos de plástico) se recubren cada uno con un anticuerpo de captura anti-leptina (no seleccionado) en una etapa (e) del método. En otro método (f), se añaden la proteína de unión a la leptina y posteriormente el ligando (por ejemplo leptina). De esta manera, el ligando está preferiblemente marcado (por ejemplo usando biotinylación, marcaje (marcaje radiactivo, marcador fluorescente, marcador enzimático (peroxidasa de rábano) etc.)) o puede ser detectable usando un anticuerpo anti-ligando respectivo, de manera que la propiedad del ligando para unirse a la proteína de unión a la leptina en el recipiente recubierto con el anticuerpo de captura pueda examinarse. Así, métodos alternativos son, por ejemplo, radiactividad, quimioluminiscencia, métodos colorimétricos o una reacción enzimática. Después de la etapa de lavado, aquellos "pocillos" o "lechos" que no muestran una señal después de la adición del ligando pueden identificarse. En este caso, el anticuerpo de captura bloquea el sitio de unión del ligando. Así, el sitio de unión no está ya disponible para la unión del ligando, ya que el anticuerpo de captura interfiere con el ligando.

Finalmente, DSM ACC 2618 o una proteína de fusión según la presente invención puede identificarse realizando ensayos de unión competitivos. Como se ha descrito anteriormente, aquí se requiere un proceso de recubrimiento,

aunque, en este método cada pocillo (por ejemplo de una placa de microtitulación) se recubre con un anticuerpo anti- proteína de unión a la leptina, que no reconoce específicamente el sitio de unión del ligando. Después de la adición de la proteína de unión a la leptina, se añade un anticuerpo potencialmente interesante o una proteína de fusión (cada uno con la propiedad de reconocer específicamente el sitio de unión del ligando) a cada pocillo anterior con ligando marcado. Al aumentar la concentración del anticuerpo específico para el sitio de unión del ligando, la intensidad de la señal del ligando en el pocillo disminuye. Este método puede usarse para la selección de anticuerpos de la invención dirigidos a un receptor de la leptina y/o una proteína de unión a la leptina.

Como alternativa al uso de células de hibridoma, pueden usarse los métodos denominados de "exposición en fago" (Morphosys o Cambridge Antibody Technologies), con el fin de generar anticuerpos potencialmente de la invención y para seleccionarlos, como se ha descrito anteriormente .

En la sección siguiente, la invención se describe con más detalle mediante ejemplos, sin limitar el alcance de la presente invención a estos Ejemplos.

Ejemplos y Figuras:

Descripción de las Figuras:

Figura 1: muestra los resultados del examen en el Ejemplo 2. Los resultados prueban que la adición del anticuerpo de la invención puede disminuir o suprimir la influencia que la leptina media a través del receptor de la leptina.

Figura 2A: muestra la secuencia de proteína de la cadena ligera de ZMC2/F_{ab} (corregida).

Figura 2B: representa la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto del vector pComb3/ZMC2,F_{ab} (cadena ligera) y su traducción en la secuencia de proteína codificada de la cadena ligera de ZMC2/F_{ab} (véase también la Figura 2A). Los codones de inicio y de parada se indican en letras en negrita, los sitios de restricción están subrayados y las secuencias de los cebadores están doblemente subrayadas. La secuencia del vector pComb3/ZMC2,F_{ab} se indica en letras en *itálica*.

Figura 3A: representa la secuencia de proteína de la cadena pesada de ZMC2/F_{ab}-His.

Figura 3B: muestra la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto del vector pComb3/ZMC2,F_{ab}-His (cadena pesada) y su traducción en la secuencia de proteína codificada de la cadena pesada de ZMC2/F_{ab} Cadena pesada-His (véase la Figura 3A). Los codones de inicio y de parada se indican en letras en negrita, los sitios de restricción están subrayados y las secuencias de los cebadores están doblemente subrayadas. La secuencia del vector pComb3/ZMC2,F_{ab}-His se indica en letras en *itálica*. La etiqueta His se indica por una línea de puntos (.....).

Figura 4A: describe la secuencia de nucleótidos del clon de alta afinidad ZMC2 ScFv (1C3). La secuencia de V_L se indica en letras en negrita. La secuencia de V_H está doblemente subrayada. El conector intermedio se indica en letras normales. La secuencia del vector se indica en letras en *itálica*. La etiqueta E se indica por una línea de puntos. Los sitios de restricción (SfiI y NotI) están subrayados y las secuencias de los cebadores están doblemente subrayadas.

Figura 4B: muestra la secuencia de proteína traducida codificada por la secuencia de nucleótidos del clon de alta afinidad ZMC2 ScFv (1C3) como se muestra en la Figura 4A. Se describe la secuencia desde V_H hasta el final de la etiqueta E.

Figura 5A: representa la secuencia de nucleótidos de la construcción cadena pesada de ZMC2-Leptina. Se describe la secuencia de nucleótidos de 1.203 pb, en la que los codones de inicio y de parada se indican en letras en negrita y los sitios de restricción están subrayados. La cadena pesada de ZMC2 ase indica por una línea de puntos (.....), el conector (G₄S)₄ está doblemente subrayado. La secuencia de la leptina se indica por una línea (.....) y el vector se indica en letras en *itálica*. La etiqueta his se indica por una línea (.....).

Figura 5B: muestra la secuencia de proteína traducida de la construcción cadena pesada de ZMC2-Leptina (véase la Figura 5A). La cadena pesada de ZMC2 ase indica por una línea de puntos (.....), el conector (G₄S)₄ está doblemente subrayado. La secuencia de la leptina se indica por una línea sencilla y el vector se indica en letras en *itálica*. La etiqueta his se indica por una línea (.....).

Figura 6: ilustra la unión del anticuerpo ZMC2 a leptina-R humano en ELISA. La Figura 6 muestra claramente que el anticuerpo ZMC2 se une a leptina-R humano de una manera dependiente de la dosis (véase el Ejemplo 3).

Figura 7: muestra un gráfico de barras que indica los resultados de un experimento de unión competitiva de un anticuerpo ZMC2 a leptina-R humano en presencia de (un exceso) de Leptina. En el eje de las x se indican diferentes concentraciones de leptina (ng/ml) (10.000, 1.000, 100, 10, 1 y 0,1 ng/ml) y ZMC2 en una concentración de 10 ng/ml. El eje de las y muestra la absorbancia a 450 nm (DO 450 nm). Como puede verse, la unión de ZMC2 a leptina-R es aparentemente muy fuerte. Sólo un gran exceso de leptina puede desplazar la unión del anticuerpo ZMC2 a leptina-R humano (véase el Ejemplo 4).

Figura 8: muestra un gráfico de barras de la respuesta a la dosis de la actividad luciferasa en respuesta a la estimulación con leptina de células HEK293. Por lo tanto, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con Ob-Rb y una construcción informadora STAT3-luciferasa y se estimularon con dosis variables de leptina durante 2 horas. Después, se midió la actividad luciferasa y se corrigió para B-galactosidasa. En el eje de las x se indican diferentes concentraciones de leptina (ng/ml) (1, 5, 10, 20, 50, 100, 250, 1.000 ng/ml). El eje de las y muestra el grado de veces de inducción frente a las células no estimuladas. Como puede obtenerse de la Figura 8, la inducción de las células HEK293 con leptina alcanza un nivel máximo, a partir del cual casi no se observa estimulación adicional (véase el Ejemplo 5).

Figura 9: ilustra en un gráfico de barras la respuesta a la dosis para los efectos inhibidores del anticuerpo ZMC2 en la señalización de la leptina. Las células HEK293 se transfectaron temporalmente con leptina-R y una construcción informadora STAT3-luciferasa y se estimularon con leptina (5 ng/ml) durante 2 horas. Se añadieron al cultivo diferentes dosis de anticuerpo ZMC2 (ug/ml, véase el eje de las x), se midió la actividad luciferasa y se corrigió para B-galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción sobre las células no estimuladas. En el eje de las x se indican diferentes concentraciones de leptina (ng/ml) (0, 12,5, y 100 ng/ml) y ZMC2 (10, 5, 1, 0,5 y 0,1 ng/ml). Como puede obtenerse de la Figura 9, el anticuerpo ZMC2 demostró efectos inhibidores en la señalización de la leptina de una manera de respuesta a la dosis (véase el Ejemplo 6).

Figura 10: muestra un gráfico de barras de la unión del anticuerpo ZMC2 a leptina-R de ratón. La unión del anticuerpo ZMC2 se detectó usando un anticuerpo secundario biotinilado seguido de SAV-HRP. La DO del color resultante se midió a 450 nm. En el eje de las x se indican diferentes concentraciones de leptina (ng/ml) y de ZMC2 (ng/ml). Como puede verse en la Figura 10, el anticuerpo ZMC2 se une a leptina-R de ratón de una manera dependiente de la dosis y su unión puede ser desplazada por la leptina sólo a altas concentraciones de leptina (véase el Ejemplo 7).

Figura 11: ilustra en un gráfico de barras el bloqueo de la producción de TNF- α en monocitos humanos activados con leptina por el anticuerpo ZMC2. Los monocitos humanos se cultivaron en presencia de PBS, Leptina (250 ng/ml), ZMC2 (10 ng/ml) + Leptina y ZMC2 (5 ng/ml) + Leptina. El eje de las Y muestra el porcentaje de monocitos que expresan TNF- α (véase el Ejemplo 8).

Figura 12A: representa un ensayo de proliferación que muestra la estimulación por okt3 (dosis óptima 100 ng/ml) de PBL humanos en suero humano autólogo en presencia de ab ZMC2 a diferentes concentraciones. En la Figura 12A se muestra ZMC2 (de 0,01, 0,1, 1 y 10 ug/ml) en presencia o ausencia de leptina exógena (100 ng/ml). Como puede obtenerse de la Figura 12A, existe un efecto pequeño de ZMC2 para incrementar la proliferación de PBL que es reducida por la leptina (véase el Ejemplo 9).

Figura 12B: muestra la estimulación por okt3 (dosis óptima 100 ng/ml) de PBL humanos en suero humano autólogo con diferentes dosis de leptina y se muestran más puntos de la respuesta a la dosis del mAb ZMC2 (0, 0,005, 0,05, 0,5, 5, 50 ug/ml). La curva de la Figura 12B es bifásica con una ligera tendencia a proliferación incrementada después de tratamiento con ZMC2 que se reduce de nuevo por la leptina (véase el Ejemplo 9).

Figuras 12C-D: muestran experimentos comparativos realizados con un donante (en el mismo ensayo que el mostrado en las Figuras 12A y B) con un ab anti-receptor de la leptina agonista de R&D systems y otros tratamiento anti-leptina humana de R&D systems. El anticuerpo anti-ObR2 agonista incrementa la proliferación de manera similar al antagonista ZMC2 y el anti-leptina a dosis bajas incrementa la proliferación. La proliferación se revierte por la leptina cuando se usa ZMC2, mientras que todavía está estimulada con anti-ObR2. En una población mixta de células no estimuladas/de memoria, con leptina presente en el suero controlando la proliferación de las células de memoria, la adición del ab ZMC2 de bloqueo incrementa ligeramente la proliferación que puede revertirse. Así, ZMC2 está actuando como un anticuerpo antagonista (véase el Ejemplo 9).

Figura 13: muestra un gráfico de los resultados de un ensayo de proliferación similar a los descritos en la Figura 12, pero extendido a un periodo de tiempo más largo (proliferación a 4 días (96 h)). La Figura 13 muestra la estimulación por okt3 (dosis óptima 100 ng/ml) de PBL humanos en suero humano autólogo con diferentes dosis de leptina y se muestran más puntos en la respuesta a la dosis del mAb ZMC2 (0, 0,005, 0,05, 0,5, 5, 50 ug/ml). El anticuerpo ZMC2 estimula la proliferación, que es claramente revertida por la adición de leptina. Así, ZMC2 reacciona claramente como un antagonista de leptina-R respecto a la respuesta global en la población mixta de células T (véase el Ejemplo 10).

Figura 14A-C: muestran un gráfico de experimentos de toma de alimento (véase el Ejemplo 11) en ratones ob/ob y ob/+; se seleccionaron 3 grupos de ratones; todas hembras; Los ratones se trataron inicialmente con una dosis baja de leptina para mantener el peso constante. El tratamiento fue 100 ug/diariamente ip + Rec leptina 0,5 ug/g de peso, durante 5 días. En la Figura 14A, el cambio en porcentaje del peso corporal es plano durante el tratamiento con leptina sola y en lugar de evitarse por ZMC2, el peso se incrementó ligeramente en términos de ausencia de cambio o incluso pequeña reducción del peso corporal. En los heterocigotos (Figura 14B, véase el Ejemplo 11), tratados en paralelo, muestran básicamente resultados similares. Con la misma dosis de ZMC2 solo, los ratones no tratados incrementaron ligeramente el peso corporal durante el tiempo; En un Experimento comparativo (Figura 14C, véase el Ejemplo 9), la proliferación de células del bazo de ratones normales (B6) se estimuló con anti-CD3 para ratón

(denominado 2C11) respuesta a la dosis (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 ug/ml) en presencia de FCS 2%. Como puede verse en la Figura 14C, puede obtenerse una clara inhibición a 10-100 ug/ml.

Figura 15: representa una fotografía de una electroforesis en gel. Las muestras aplicadas en el gel se obtuvieron de un experimento de estimulación con anti-CD3 usando células T de ratones NOD tendientes a la autoinmunidad. Como puede obtenerse del gel, la fosforilación de ERK1/2 se reduce por el anticuerpo que bloquea leptina-R.

Figura 16: muestra un mapa del plásmido del clon pComb3/ZMC2F_{ab}-His.

Figura 17: muestra los resultados de un experimento de Transferencia Western durante la purificación de F_{ab} ZMC2 recombinante. Como puede obtenerse de la Transferencia Western, F_{ab} ZMC2 recombinante se expresa en la fracción soluble y la Transferencia muestra una proteína del tamaño correcto de la cadena ligera Kappa.

Figura 18: muestra los resultados de un experimento de Transferencia Western durante la purificación de F_{ab} ZMC2 recombinante etiquetado con His. Como puede obtenerse de la Transferencia Western, F_{ab} ZMC2 etiquetado con His puede purificarse en una Columna de Cobalto.

Figura 19: muestra una tinción con Azul de Coomassie de un gel de poliacrilamida de un anticuerpo F_{ab} ZMC2 purificado.

Figura 20A: muestra un gráfico de barras de un experimento de unión de ZMC2 y F_{ab} ZMC2 recombinante expresado a Leptina Humana. El eje de las y muestra la absorbancia a 450 nm (DO 450 nm).

Figura 20B: muestra el efecto de F_{ab} ZMC2 recombinante en la activación de SIE inducida por leptina. Como puede obtenerse de la Figura 20A F_{ab} ZMC2 recombinante (rF_{ab}) y F_{ab} ZMC2 preparado químicamente (cF_{ab}) para ZMC2 bloquean la señalización de la leptina.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Producción del anticuerpo A (dirigido a leptina-BP)

Más de 20 ratones Balb/c se inmunizaron repetidamente con leptina-BP producida de manera recombinante según el método conocido generalmente (ref. al folleto de Titermax®). Cuando se consiguió una alta titulación frente a leptina-BP, el bazo se extirpó de los animales y según el método descrito por Köhler y Milstein (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 1975, Ago. 7; 256 (5517): 495-7) se produjeron cultivos de células de hibridoma por fusión con una línea celular de mieloma de ratón. También según métodos conocidos generalmente (dilución limitada, cribado de los sobrenadantes del cultivo de células de hibridoma con antígeno marcado) se seleccionaron aquellos clones que producían anticuerpo monoclonal con alta afinidad y especificidad para leptina-BP.

La mayoría de los clones seleccionados se dirigieron a dichos epítomos en la molécula de leptina-BP, que están situados fuera del sitio de unión para la leptina. Con el fin de seleccionar anticuerpos A según la presente invención, dirigidos a un epítipo en el sitio de unión, se usó en primer lugar uno de muchos de los anticuerpos que se unen a leptina-BP fuera del sitio de unión. Se identificó aplicando todos los anticuerpos monoclonales frente a leptina-BP (tantos como fue posible), por ejemplo, en pocillos separados cada uno, en una placa de microtitulación (placas de poliestireno con superficie altamente adsorbente) como anticuerpo de captura, (alternativamente, también pueden usarse otros métodos como, por ejemplo, lechos de poliestireno recubiertos, tubos de plástico recubiertos etc.). Posteriormente, se añadió leptina-BP recombinante, que se une al anticuerpo de recubrimiento - en una disposición primaria todavía desconocida (unión según cada epítipo en o fuera del sitio de interacción del receptor de la hormona). Finalmente, se añadió la leptina marcada (en nuestro caso biotinilada), que puede unirse ahora exclusivamente a las moléculas de leptina-BP y que posee un sitio de unión accesible libremente (es decir, en el que el anticuerpo de recubrimiento no interfiere con la unión de la leptina). La determinación del anticuerpo unido se realizó por adición de estreptavidina europio, que se une a una leptina biotinilada unida y puede medirse en un fluorímetro (fluorescencia en tiempo resuelto después de la adición de disolución de amplificación). Alternativamente, esta etapa también puede efectuarse usando métodos análogos (radiactividad, método de reacción enzimática/colorimétrico o quimioluminiscencia).

Con el fin de encontrar un anticuerpo que está dirigido al sitio de unión, se recubrió una placa de microtitulación con un anticuerpo frente a leptina-BP, seleccionado según el método anterior, que no interfiere con la unión de la leptina. La adición de leptina-BP provocó una unión alienada de las moléculas de leptina-BP, es decir con un sitio de unión para la leptina accesible libremente. Posteriormente, se añadió leptina biotinilada y simultáneamente todos los demás anticuerpos frente a leptina-BP (de nuevo cada anticuerpo en un pocillo propio de la placa de microtitulación). Si el anticuerpo está dirigido al sitio de unión, debería bloquear la unión de leptina biotinilada de manera dependiente de la concentración. Esto podría detectarse por una disminución de la intensidad de la señal (método de detección en nuestro caso de nueva fluorescencia en tiempo resuelto (estreptavidina europio). Para confirmar en un experimento invertido se realizó el desplazamiento de los anticuerpos biotinilados dirigidos a leptina-BP añadiendo

leptina no marcada. Esto es posible si el anticuerpo biotinilado compite con la leptina no marcada para la unión en el sitio de unión del receptor, es decir, si el epítipo de los mAb está localizado en el sitio de interacción de la leptina/receptor de la leptina.

Ejemplo 2:

- 5 Verificación de la eficacia de un anticuerpo según la presente invención y la mejora asociada de los métodos generales de medida cuantitativa en presencia de proteína de unión a leptina de interferencia

La proteína de unión a la leptina se inmovilizó en una placa de microtitulación de manera que el sitio de unión para la leptina era accesible libremente. Esto se realizó usando otros anticuerpos dirigidos a la proteína de unión a la leptina, que no se unen en sino fuera del sitio de interacción de la hormona-receptor. Posteriormente, se añadió leptina marcada (biotinilada). Después, se añadieron disoluciones de tampón con concentraciones crecientes del anticuerpo de la invención ZMC2 a las disoluciones de incubación. Después de un tiempo de incubación de 2 horas, la cantidad de leptina marcada unida a la proteína de unión a la leptina inmovilizada se midió por adición de un marcador de fluorescencia, que se une específicamente a la biotina. Con una concentración creciente de ZMC2, la unión de la leptina biotinilada disminuyó, probando así el efecto de desplazamiento de ZMC2.

- 15 Además, el bloqueo funcional de los receptores de la leptina se ha probado en un ensayo de cultivo celular usando ZMC2. Por lo tanto, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con el receptor de la leptina humano así como con un informador STAT3-luciferasa. Esta construcción permite la visualización o la medida de la activación de la cascada de la señal intracelular causada por la leptina.

- 20 Como se muestra en la Figura 1, la adición de leptina al cultivo celular provoca un incremento de 7-8 veces de la actividad luciferasa (comparado con el control que no contiene leptina). La adición del anticuerpo ZMC2 de la invención a la preparación (5 µg/ml) evita esta activación a diferencia del anticuerpo control (anticuerpo con especificidad irrelevante, en este caso frente a KLH).

Ejemplo 3:

Unión del anticuerpo ZMC2 a leptina-R humano en ELISA

- 25 Para detectar la unión del anticuerpo ZMC2 a leptina-R humano, una placa ELISA se recubrió con leptina-R humano recombinante (200 ng/pocillo) y se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpo ZMC2 (1.000, 333, 111, 37, 12,3, 4, 1, 1,3, 0,45, 0,15, 0,05, 0,016, 0,005, 0,0018, 0,0006 ng/ml). La unión del anticuerpo ZMC2 a leptina-R se detectó posteriormente usando un anticuerpo secundario biotinilado seguido de SAV-HRP y la señal (DO del color resultante) se midió a 450 nm. Como resultado, el anticuerpo ZMC2 se une a leptina-R de una manera dependiente de la dosis como puede obtenerse a partir del gráfico de barras correspondiente (véase la Figura 6).

Ejemplo 4:

Especificidad de la unión del anticuerpo ZMC2 a leptina-R humano

- 35 Para un experimento de unión competitiva de un anticuerpo ZMC2 a leptina-R humano en presencia de leptina (en exceso), una placa de ELISA se recubrió con leptina-R humano recombinante (200 ng/pocillo). Se añadieron diferentes concentraciones de leptina (10.000, 1.000, 100, 10, 1, 0,1 ng/ml) a los pocillos en presencia o ausencia del anticuerpo ZMC2. ZMC2, si se añadió, estaba presente en una concentración de 10 ng/ml. La unión del anticuerpo ZMC2 se detectó posteriormente usando un anticuerpo secundario biotinilado seguido de SAV-HRP y la señal (DO del color resultante) se midió a 450 nm. Como puede obtenerse de la Figura 7 sólo un gran exceso de leptina puede desplazar la unión del anticuerpo ZMC2 de leptina-R humano. De acuerdo con esto, la unión del anticuerpo ZMC2 a leptina-R es altamente específica.

Ejemplo 5:

Respuesta a la dosis de la actividad luciferasa en respuesta a la estimulación con leptina

- 45 Con el fin de detectar una respuesta a la dosis de la actividad luciferasa en respuesta a la estimulación con leptina, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con leptina-Rb y una construcción informadora STAT3-luciferasa y se estimularon con dosis variables de leptina durante 2 horas. Después de 2 horas, el medio se reemplazó con medio fresco que no contenía leptina y los cultivos se inoculaban durante 4 horas más antes de que las células se lisaran. Posteriormente, la actividad luciferasa se midió y se corrigió para β-galactosidasa, que se usó como un control de la transfección. Los resultados se muestran en la Figura 8. Los valores mostrados expresan las veces de inducción respecto a las células no estimuladas. La inducción es dependiente de la dosis y alcanza un máximo a aproximadamente 50-1.000 ng/ml de leptina.

Ejemplo 6:

Respuesta a la dosis para los efectos inhibidores del anticuerpo ZMC2 en la señalización de la leptina

Para obtener una respuesta a la dosis para los efectos inhibidores del anticuerpo ZMC2 en la señalización de la leptina, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con leptina-Rb y una construcción informadora STAT3-luciferasa y se estimularon con leptina (5ng/ml) durante 2 horas. Se añadieron diferentes dosis de anticuerpo ZMC2 (10, 5, 1, 0,5 y 0,1 µg/ml, si la leptina está contenida) al cultivo 30 minutos antes de la adición de la leptina (0 ng/ml, si no había ZMC2 y 12,5 ng/ml si había ZMC2). La actividad luciferasa se midió posteriormente y se corrigió para β-galactosidasa. Los resultados se muestran como un gráfico de barras en la Figura 9, expresándose como veces de inducción respecto a las células no estimuladas. Como resultado, el anticuerpo ZMC2 demostró efectos inhibidores en la señalización de la leptina de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 7:

Unión del anticuerpo ZMC2 a leptina-R de ratón

Se recubrió una placa de ELISA con leptina-R de ratón recombinante (200 ng/pocillo) y se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpo ZMC2, leptina, hormona de crecimiento o la combinación de éstas (ng/ml). La unión del anticuerpo ZMC2 se detectó usando un anticuerpo secundario biotinilado seguido de SAV-HRP y la DO del color resultante se midió a 450 nm. Los resultados se muestran en la Figura 10 como un gráfico de barras. Como puede obtenerse del gráfico, el anticuerpo ZMC2 se une a leptina-R de ratón de manera dependiente de la dosis y su unión puede ser desplazada por la leptina sólo a altas dosis.

Ejemplo 8:

Bloqueo de la producción de TNF-α en monocitos humanos activados por leptina por ZMC2

Para este experimento, la producción de TNF-α se indujo por monocitos humanos activados con leptina. Después de inducir la producción de TNF-α, se añadió ZMC2 (10 y 5 ng/ml) a los monocitos en presencia y ausencia de leptina (250 ng/ml). Los resultados se muestran en la Figura 11. Como puede verse en la Figura 11, ZMC2 es capaz de bloquear la producción de TNF-α por los monocitos humanos activados con leptina. El eje de las Y muestra el porcentaje de monocitos que expresan TNF-α (% de monocitos doble positivos (positivos para CD-14 y TNF-α).

Ejemplo 9:

Estimulación de PBL humanos en suero humano autólogo por okt3 (experimento anti-CD3)

Para medir la estimulación de PBL humanos en suero humano autólogo por okt3 (dosis óptima 100 ng/ml) las células se inocularon en presencia de ab ZMC2 (de 0, 0,1, 1 y 10 µg/ml) y en presencia o ausencia de leptina exógena (100 ng/ml). Las células se recogieron después de 60 min permitiendo una síntesis máxima de ADN. La proliferación se midió (cpm) y puede verse en la Figura 12A. Existe un efecto pequeño de ZMC2 para incrementar la proliferación de PBL que se reduce por la leptina. Este incremento en la proliferación puede ser revertido por la leptina, como puede verse en los experimentos siguientes. ZMC2 actúa así como un antagonista. Además, se considera que la respuesta a la estimulación anti-CD3 en los seres humanos en presencia de leptina es dependiente de la proporción relativa de células sin estimular/de memoria en PBL; cuantas más células sin estimular están presentes mayor es el incremento en la proliferación en respuesta a la leptina; alternativamente, cuantas más células de memoria están presentes mayor es la inhibición de la proliferación inducida por la leptina (aunque se incrementa la secreción de IFN-γ, a pesar de la proliferación reducida de células de memoria).

En las Figuras 12B, C y D se muestra la estimulación por okt3 (dosis óptima 100 ng/ml) de PBL humanos en suero humano autólogo con diferentes dosis de leptina (10 y 100 ng/ml) y más puntos de mAb ZMC2 de respuesta a la dosis (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 µg/ml). Como puede verse, la curva es bifásica con una ligera tendencia a proliferación incrementada después del tratamiento con ZMC2 (Figura 12B) que se reduce de nuevo con leptina; con el donante se realizaron 2 experimentos en el mismo ensayo, es decir, el ab anti-receptor de leptina agonista (anti-ObR2) de R&D systems (Figura 12C) y otro tratamiento anti-leptina humana de R&D systems (Figura 12D). Anti-ObR2 incrementa la proliferación de manera similar a ZMC2 y el anti-leptina a bajas dosis incrementa la proliferación, que es revertida por la leptina. Aquí, se estudian los efectos en una población mixta de células no estimuladas/de memoria, en los que la leptina está presente en el suero controlando la proliferación de las células de memoria. La adición del ab ZMC2 de bloqueo incrementa ligeramente la proliferación, que puede revertirse después de la adición de la leptina. Así, ZMC2 está actuando como un anticuerpo antagonista, mientras que anti-ObR2 actúa como un anticuerpo agonista.

Ejemplo 10:

Experimentos de proliferación elongados

Para definir mejor el efecto de ZMC2, se realizaron experimentos de proliferación durante un periodo de tiempo mayor para ver si el incremento en la proliferación era más visible cuando las células estaban en una fase más tardía del ciclo celular. Por lo tanto, la proliferación se midió a los 4 días (96 h) y sorprendentemente el ab ZMC2 todavía estimulaba la proliferación, en el que - observando la respuesta global en una población mixta de células T - se descubrió que ZMC2 actúa como un antagonista, ya que la adición de leptina reduce la proliferación (véase la Figura

13). La especificidad de ZMC2 puede medirse adicionalmente por el hecho de que la adición de leptina reduce la proliferación.

Ejemplo 11:

Experimentos de toma de alimento en ratones ob/ob y ob/+ : 3 grupos de ratones

- 5 Para los experimentos de toma de alimento se usaron ratones ob/ob y ob/+, todos hembras. En el caso de ob/ob, los ratones se trataron con leptina a baja dosis con el fin de mantener el peso, es decir, no perder peso pero tampoco incrementar el peso, como pasa habitualmente. Habitualmente, se proporciona como alimento típicamente 1 gramo de peso corporal cada 2 días a los ratones. El tratamiento en el experimento fue 100 ug/diariamente ip + Rec leptina 0,5 ug/g de peso, durante 5 días. Como puede verse en la Figura 14A, la curva de %de cambio de peso corporal es
- 10 plana durante el tratamiento con leptina sola, lo que indica que el tratamiento estaba funcionando. En lugar de ser evitado por el ab, el peso corporal se incrementó ligeramente en términos de ausencia de cambio en el peso corporal. En un experimento comparativo, se usaron ratones heterocigotos (véase la Figura 14B) porque muestran menos leptina que los ratones normales. Los heterocigotos se trataron en paralelo con la misma dosis de ab solo. Los ratones no tratados mostraron una tendencia a incrementar el peso corporal con el tiempo (menos fuerte que la
- 15 de los ratones ob/ob); los tratados con ab fueron similares para el peso corporal, pero después de parar el peso corporal se incrementó más que los controles.

Proliferación de células del bazo de ratones normales (B6)

- La proliferación de células del bazo de ratones normales (B6) se estimuló con anti-CD3 para la respuesta a la dosis de ratones (denominados 2C11) (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 ug/ml) en presencia de FCS 2%. Como puede
- 20 verse en la Figura 14C, puede obtenerse una clara inhibición a 10-100 ug/ml.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Klinikum der Universitaet Muenchen Grosshadem-Innenstadt

<120> Antagonista de la leptina y método para la medida cuantitativa de la leptina

<130> LM01P002WO

5 <150> DE 103 53 953.4

<151> 2003-11-17

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

10 <211> 272

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (1)..(270)

<223> Xaa = desconocido u otro

<400> 1

Xaa His Asn Pro Ile Pro Met Pro Pro Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro
20 25 30

Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys
35 40 45

Ala Thr Gln Asn Val Arg Thr Ala Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Ala Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg His Thr
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Asn Asn Val Lys Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys
100 105 110

Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
130 135 140

ES 2 380 341 T3

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
195 200 205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
210 215 220

Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Xaa
225 230 235 240

Ser Arg Val Lys Arg Xaa Gln Ser Xaa Gly Gly Pro Gly Thr Pro Ile
245 250 255

Arg Pro Ile Gly Xaa Pro Tyr Tyr Asn Ser Leu Gly Gly Gly Phe Gln
260 265 270

<210> 2
<211> 818
<212> ADN
5 <213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(818)
<223> n = a, t, g, c, desconocido u otro

10 <220>
<221> CDS
<222> (3)..(818)
<223>

<400> 2

na	ngt	cat	aat	cca	ata	cct	atg	cct	acg	gca	gcc	gct	gga	ttg	tta	47
	Xaa	His	Asn	Pro	Ile	Pro	Met	Pro	Thr	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu		
1				5				10					15			
tta	ctc	gct	gcc	caa	cca	gcc	atg	gcc	gag	ctc	gtg	atg	acc	cag	tct	95
Leu	Leu	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Glu	Leu	Val	Met	Thr	Gln	Ser	
			20					25					30			
cca	aaa	ttc	atg	tcc	aca	tca	ata	gga	gac	agg	gtc	aat	atc	acc	tgc	143
Pro	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Ile	Gly	Asp	Arg	Val	Asn	Ile	Thr	Cys	
			35					40				45				

15

aag gcc act cag aat gtt cgt act gct gtt acc tgg tat caa cag aaa Lys Ala Thr Gln Asn Val Arg Thr Ala Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys 50 55 60	191
cca ggg cag tct cct caa gca ctg att ttc ttg gca tcc aac cgg cac Pro Gly Gln Ser Pro Gln Ala Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg His 65 70 75	239
act ggt gtc cct gct cga ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe 80 85 90 95	287
act ctc acc att aac aat gtg aaa tct gaa gac ctg gca gat tat ttc Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Lys Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe 100 105 110	335
tgt cta caa cat tgg aat tat cct ctc acg ttc ggc tcg ggg aca aag Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys 115 120 125	383
ttg gaa ata aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro 130 135 140	431
cca tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe 145 150 155	479
ttg aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag att gat Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp 160 165 170 175	527
ggc agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act gat cag gac Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp 180 185 190	575
agc aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc acg ttg acc aag Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys 195 200 205	623
gac gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt gag gcc act cac aag Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys 210 215 220	671
aca tca act tca ccc att gtc aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230 235	719
taa tct aga gtt aag cgg ccg caa tcg agg ggg ggc ccg gta ccc caa Ser Arg Val Lys Arg Pro Gln Ser Arg Gly Gly Pro Val Pro Gln 240 245 250	767
ttc gcc cta tag ggg ngc cgt att aca att cac tgg gcg gcg gtt ttc Phe Ala Leu Gly Xaa Arg Ile Thr Ile His Trp Ala Ala Val Phe 255 260 265	815
aan Xaa	818

<210> 3
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(292)
 <223> Xaa = cualquiera u otro

<400> 3

Leu Ala Xaa Arg Gly Gly Gly Arg Lys Ile Xaa Phe Xaa Arg Glu Thr
 1 5 10 15

Val Ile Met Lys Tyr Leu Xaa Ala Tyr Gly Pro Ala Ala Gly Leu Leu
 20 25 30

Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser
 35 40 45

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Glu Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr
 50 55 60

Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Asp Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly
 85 90 95

Ser Thr Tyr Phe Asn Ser Leu Phe Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Arg
 100 105 110

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Glu Met Asp Ser Leu Gln Thr
 115 120 125

Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Lys His Asp Gly His Glu Thr
 130 135 140

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ser Lys
 145 150 155 160

Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln
 165 170 175

Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro
 180 185 190

Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val
 195 200 205

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser
210 215 220

Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys
225 230 235 240

Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val
245 250 255

Pro Arg Asp Cys Thr Ser His His His His His Xaa Ala Ser Leu
260 265 270

Val Val Ala Val Ala Leu His Ser Phe Val Xaa Ile Lys Ala Asn Arg
275 280 285

Arg Pro Ala Xaa
290

<210> 4

<211> 876

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(876)

<223> n = a, t, g, c, desconocido u otro

10 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(876)

<223>

<400> 4

ttg gcc ncc cgc ggt ggc ggc cgc aaa att nta.ttt nca agg gag aca 48
Leu Ala Xaa Arg Gly Gly Gly Arg Lys Ile Xaa Phe Xaa Arg Glu Thr
1 5 10 15

gtc ata atg aaa tac ctt ttn gcc tac ggg cca gcc gct gga ttg tta 96
Val Ile Met Lys Tyr Leu Xaa Ala Tyr Gly Pro Ala Ala Gly Leu Leu
20 25 30

tta ctc gct gcc caa cca gcc atg gcc cag gtg aaa ctg ctc gag tca 144
Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser
35 40 45

gga cct ggc ctg gtg gcg ccc tca gag agc ctg tcc atc aca tgc act 192
Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Glu Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr
50 55 60

atc tca ggg ttc tca tta acc gac gat ggt gta agc tgg att cgg cag 240
Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Asp Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
65 70 75 80

cct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg gga gta ata tgg ggt ggt gga 288

15

Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Gly	Gly		
				85					90					95			
agc	aca	tac	ttt	aat	tca	ctt	ttc	aaa	tcc	aga	ctg	agc	atc	acc	agg	336	
Ser	Thr	Tyr	Phe	Asn	Ser	Leu	Phe	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Arg		
			100					105					110				
gac	aac	tct	aag	agc	caa	gtt	ttc	tta	gaa	atg	gac	agt	cta	caa	act	384	
Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Glu	Met	Asp	Ser	Leu	Gln	Thr		
			115				120					125					
gat	gac	aca	gcc	atg	tac	tac	tgc	gcc	aaa	cat	gac	gga	cac	gag	act	432	
Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Asp	Gly	His	Glu	Thr		
			130				135					140					
atg	gac	tat	tgg	ggc	caa	gga	acc	tca	gtc	acc	gtc	tcc	tca	tcc	aaa	480	
Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Lys		
					150					155					160		
acg	aca	ccc	cca	tct	gtc	tat	cca	ctg	gcc	cct	gga	tct	gct	gcc	caa	528	
Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln		
				165					170					175			
act	aac	tcc	atg	gtg	acc	ctg	gga	tgc	ctg	gtc	aag	ggc	tat	ttc	cct	576	
Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro		
			180					185					190				
gag	cca	gtg	aca	gtg	acc	tgg	aac	tct	gga	tcc	ctg	tcc	agc	ggc	gtg	624	
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val		
			195				200					205					
cac	acc	ttc	cca	gct	gtc	ctg	cag	tct	gac	ctc	tac	act	ctg	agc	agc	672	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser		
			210			215					220						
tca	gtg	act	gtc	ccc	tcc	agc	acc	tgg	ccc	agc	gag	acc	gtc	acc	tgc	720	
Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys		
					230					235					240		
aac	gtt	gcc	cac	ccg	gcc	agc	agc	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	att	gtg	768	
Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val		
				245					250					255			
ccc	agg	gat	tgt	act	agt	cat	cat	cat	cat	cat	cat	taa	gct	agc	cta	816	
Pro	Arg	Asp	Cys	Thr	Ser	His	His	His	His	His	His		Ala	Ser	Leu		
			260					265						270			
gtg	gtg	gcg	gtg	gct	ctc	cat	tcg	ttt	gtg	ang	ata	aag	gcc	aat	cgn	864	
Val	Val	Ala	Val	Ala	Leu	His	Ser	Phe	Val	Xaa	Ile	Lys	Ala	Asn	Arg		
			275					280					285				
aga	cct	gcg	cna													876	
Arg	Pro	Ala	Xaa														
			290														

<210> 5
 <211> 832
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(832)
 <223> n = a, t, g, c, cualquiera u otro

<220>
 <221> CDS

<222> (38)..(814)

<223>

<400> 5

```

atnctttntt gttcctttct atgcggccca gccggcc atg gcc cag gtc cag ctg      55
                               Met Ala Gln Val Gln Leu
                               1           5

cag gag tca gga act gaa gtg gta aag cct ggg gct tca gtg aag ttg      103
Gln Glu Ser Gly Thr Glu Val Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
          10           15           20

tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttc aca agt tat gat ata gac tgg      151
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asp Trp
          25           30           35

gtg agg cag acg cct gaa cag gga ctt gag tgg att gga tgg att ttt      199
Val Arg Gln Thr Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe
          40           45           50

cct gga gag ggg agt act gaa tac aat gag aag ttc aag ggc agg gcc      247
Pro Gly Glu Gly Ser Asp Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala
55           60           65           70

aca ctg agt gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tat atg gag ctc act      295
Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Thr
          75           80           85

agg ctg aca tct gag gac tct gct gtc tat ttc tgt gct aga ggg gac      343
Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp
          90           95          100

tac tat agg cgc tac ttt gac ttg tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc      391
Tyr Tyr Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
          105          110          115

gtc tcc tca tgt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc      439
Val Ser Ser Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          120          125          130

gga tct gac att gag ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct      487
Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
          135          140          145          150

cca ggg gag agg gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt ata cgt      535
Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Arg
          155          160          165

tac ata tat tgg tac caa cag aag cct gga tcc tcc ccc aga ctc ctg      583
Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu
          170          175          180

att tat gac aca tcc aac gtg gct cct gga gtc cct ttt cgc ttc agt      631
Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Val Ala Pro Gly Val Pro Phe Arg Phe Ser
          185          190          195

```

ES 2 380 341 T3

```

ggc agt ggg tct ggg acc tct tat tct ctc aca atc aac cga atg gag      679
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Met Glu
  200                      205                      210

gct gag gat gct gcc act tat tac tgc cag gag tgg agt ggt tat cct      727
Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu Trp Ser Gly Tyr Pro
  215                      220                      225                      230

ctc acg ttc ggc tgc ggc acc aag cgg gaa atc aaa cgg gcg gcc gca      775
Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Arg Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
                235                      240                      245

ggt gcg ccg gtg ccg tat ccg gat ccg ctg gaa ccg cgt gccgcataga      824
Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
                250                      255

ctgttgaa                                                                832

```

<210> 6

<211> 259

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(832)

<223> n = a, t, g, c, cualquiera u otro

10 <400> 6

```

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Thr Glu Val Val Lys Pro
  1                      5                      10                      15

Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr
                20                      25                      30

Ser Tyr Asp Ile Asp Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Gln Gly Leu Glu
                35                      40                      45

Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Glu Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Glu
                50                      55                      60

Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
  65                      70                      75                      80

Ala Tyr Met Glu Leu Thr Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
                85                      90                      95

Phe Cys Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
                100                      105                      110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
                115                      120                      125

```

ES 2 380 341 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
130 135 140

Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser
145 150 155 160

Ala Ser Ser Ser Ile Arg Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
165 170 175

Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Val Ala Pro Gly
180 185 190

Val Pro Phe Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
195 200 205

Thr Ile Asn Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
210 215 220

Glu Trp Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Arg Glu
225 230 235 240

Ile Lys Arg Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu
245 250 255

Glu Pro Arg

<210> 7

<211> 1252

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1.252)

<223> n = a, t, g, c, desconocido u otro

10 <400> 7

ES 2 380 341 T3

```

tcgctgccca accagccatg gccaggtga aactgctcga gtcaggacct ggctgtgtgg      60
cgccctcaga gagcctgtcc atcacatgca ctatctcagg gttctcatta accgacgatg      120
gtgtaagctg gattcggcag cctccaggaa agggctctgga gtggctggga gtaatatggg      180
gtggtggaag cacatacttt aattcacttt tcaaatccag actgagcatc accagggaca      240
actctaagag ccaagttttc ttagaaatgg acagtctaca aactgatgac acagccatgt      300
actactgctc caaacatgac ggacacgaga ctatggacta ttgggggtcaa ggaacctcag      360
tcaccgtctc ctcatccaaa acgacacccc catctgtcta tccactggcc cctggatctg      420
ctgcccaaac taactccatg gtgaccctgg gatgcctggt caagggctat ttccctgagc      480

cagtgcacagt gacctggaac tctggatccc tgtccagcgg tgtgcacacc ttcccagctg      540
tcctgcagtc tgacctctac actctgagca gtcagtgac tgtcccctcc agcacctggc      600
ccagcgagac cgtcacctgc aacgttgccc acccggccag cagcaccaag gtggacaaga      660
aaattgtgcc cagggattgt actagtgggtg gcggaggtag tgggtggcga ggtagcgggtg      720
gcgagaggtt tgggtggcga ggttccgaat tcctcgaggt gcccatccaa aaagtccaag      780
atgacaccaa aacctctatc aagacaattg tcaccaggat caatgacatt tcacacacgc      840
agtcagtctc ctccaaacag aaagtcaccg gtttggactt cattcctggg ctccaccca      900
tcctgacctt atccaagatg gaccagacac tggcagtcta ccaacagatc ctcaccagta      960
tgctttccag aaacgtgatc caaatatcca acgacctgga gaacctccgg gatctttctc     1020
acgtgctggc cttctctaag agctgccact tgccctgggc cagtggcctg gagaccttgg     1080
acagcctggg ggggtgtcctg gaagcttcag gctactccac agaggtggtg gccctgagca     1140
ggctgcaggg gtctctgcag gacatgctgt ggcagctgga cctcagccct ggggtgacta     1200
gtcatcatca tcatcatcat taagctagcc tagtggtggc ggtggctctc ca              1252

```

<210> 8

<211> 401

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(401)

<223> Xaa = desconocido u otro

10 <400> 8

ES 2 380 341 T3

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

ES 2 380 341 T3

	Cys	Ala	Lys	His	Asp	Gly	His	Glu	Thr	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	
			115					120					125				
5	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	
		130					135					140					
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	
	145					150					155					160	
	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
10					165					170					175		
	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
				180					185					190			
	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	
			195					200					205				
15	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Thr	Ser	Gly	
		210				215						220					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
	Gly	Gly	Ser	Glu	Phe	Leu	Glu	Val	Pro	Ile	Gln	Lys	Val	Gln	Asp	Asp	
20					245					250					255		
	Thr	Lys	Thr	Leu	Ile	Lys	Thr	Ile	Val	Thr	Arg	Ile	Asn	Asp	Ile	Ser	
				260					265					270			
	His	Thr	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Lys	Gln	Lys	Val	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	
25			275					280					285				
	Ile	Pro	Gly	Leu	His	Pro	Ile	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Met	Asp	Gln	Thr	
		290					295					300					
	Leu	Ala	Val	Tyr	Gln	Gln	Ile	Leu	Thr	Ser	Met	Pro	Ser	Arg	Asn	Val	
	305					310					315					320	
30	Ile	Gln	Ile	Ser	Asn	Asp	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Val	
					325					330					335		

ES 2 380 341 T3

340

345

350

Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr
355 360 365

Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu
370 375 380

Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys Thr Ser His His His His His
385 390 395 400

His

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de un anticuerpo monoclonal, dirigido al dominio extracelular del receptor de la leptina o la proteína de unión a la leptina **caracterizado porque** el anticuerpo o fragmento se selecciona del grupo que consiste en:
 - 5 i) un anticuerpo monoclonal depositado con el número de registro DSM ACC 2618;
 - ii) un fragmento de anticuerpo de cadena única como se representa en SEQ ID NO: 6;
 en el que dicho anticuerpo o fragmento desplaza a la leptina que está unida al receptor de la leptina o la proteína de unión a la leptina.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal o fragmento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se une al sitio de unión de la leptina.
3. Un anticuerpo monoclonal o fragmento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, para usarse como un medicamento.
4. Una proteína de fusión, que contiene:
 - i) un anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1 ó 2; y
 - 15 ii) un segundo anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido o leptina.
5. La proteína de fusión según la reivindicación 4, **caracterizada porque** la proteína de fusión contiene un conector entre las partes i) y ii).
6. La proteína de fusión según la reivindicación 5, **caracterizada porque** el conector comprende una longitud de 5 a 40 aminoácidos, más preferiblemente entre 5 y 30 aminoácidos y lo más preferiblemente entre 5 y 20 aminoácidos.
- 20 7. La proteína de fusión según las reivindicaciones 5 ó 6, **caracterizada porque** el conector contiene al menos 50% de residuos de glicina, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% y lo más preferiblemente al menos 80%.
8. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, **caracterizada porque** la proteína de fusión es biespecífica y está dirigida al receptor de la leptina o la proteína de unión de la leptina como una primera especificidad y a una proteína de la superficie celular como una segunda especificidad.
- 25 9. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, **caracterizada porque** la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 7.
10. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, **caracterizada porque** la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.
- 30 11. Un método para la determinación cuantitativa de leptina en una muestra que contiene leptina y el receptor de la leptina o la proteína de unión a la leptina en forma solubilizada o suspendida, **caracterizado porque** un anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1 ó 2, y/o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10 se añade(n) a la muestra que se va a determinar.
12. El método según la reivindicación 11, **caracterizado porque** un anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1 ó 2 se añade antes o durante la determinación cuantitativa y/o se incuba con la muestra.
- 35 13. El método según la reivindicación 11 ó 12, **caracterizado porque** la muestra contiene líquido.
14. El método según la reivindicación 13 en el que dicha muestra es un líquido corporal más preferiblemente líquido corporal humano.
15. El método según la reivindicación 13 ó 14 en el que dicha muestra es sangre.
- 40 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, **caracterizado porque** la proteína de unión a la leptina es soluble, preferiblemente una parte soluble del receptor de la leptina y/o una proteína de unión a hormona, en particular una proteína de unión a hormona soluble.
17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-16, **caracterizado porque** la determinación cuantitativa de la leptina se realiza usando la unión de la leptina como un antígeno a un anticuerpo.
- 45 18. El método según la reivindicación 17 en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

19. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-18, **caracterizado porque** la determinación cuantitativa se realiza usando un ensayo de unión competitiva.
20. El método según la reivindicación 19 en el que dicho ensayo es un radioinmunoensayo.
- 5 21. El método según una de las reivindicaciones 11-20, **caracterizado porque** la determinación cuantitativa se realiza por la medida de un parámetro de lectura creciente que se incrementa como función de la concentración del ligando que se va a determinar.
22. El método según la reivindicación 21 en el que dicho método es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y/o un ensayo en sandwich.
- 10 23. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-22, **caracterizado porque** la proteína de unión a la leptina no se separa de la muestra que se va a determinar antes de la determinación cuantitativa.
24. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-23, **caracterizado porque** un anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1 ó 2 se añade a la muestra en una concentración más alta que la proteína de unión a la leptina, preferiblemente en una concentración de al menos 50% más, más preferiblemente de al menos 100%, incluso más preferiblemente de al menos 200% más, y lo más preferiblemente de al menos 400% más.
- 15 25. Un medicamento que contiene un anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10.
26. Un agente de diagnóstico que contiene un anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1 ó 2, o una proteína de fusión según una de las reivindicaciones 4-6.
- 20 27. Un kit que contiene: un anticuerpo o fragmento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, o una proteína de fusión según una de las reivindicaciones 4-6.
28. El kit según la reivindicación 27, **caracterizado porque** el kit contiene además un anticuerpo monoclonal de la leptina.
29. El kit según la reivindicación 28, **caracterizado porque** el anticuerpo monoclonal de la leptina está dirigido a la isoforma principal de la leptina con un peso molecular de 16 kDa.
- 25

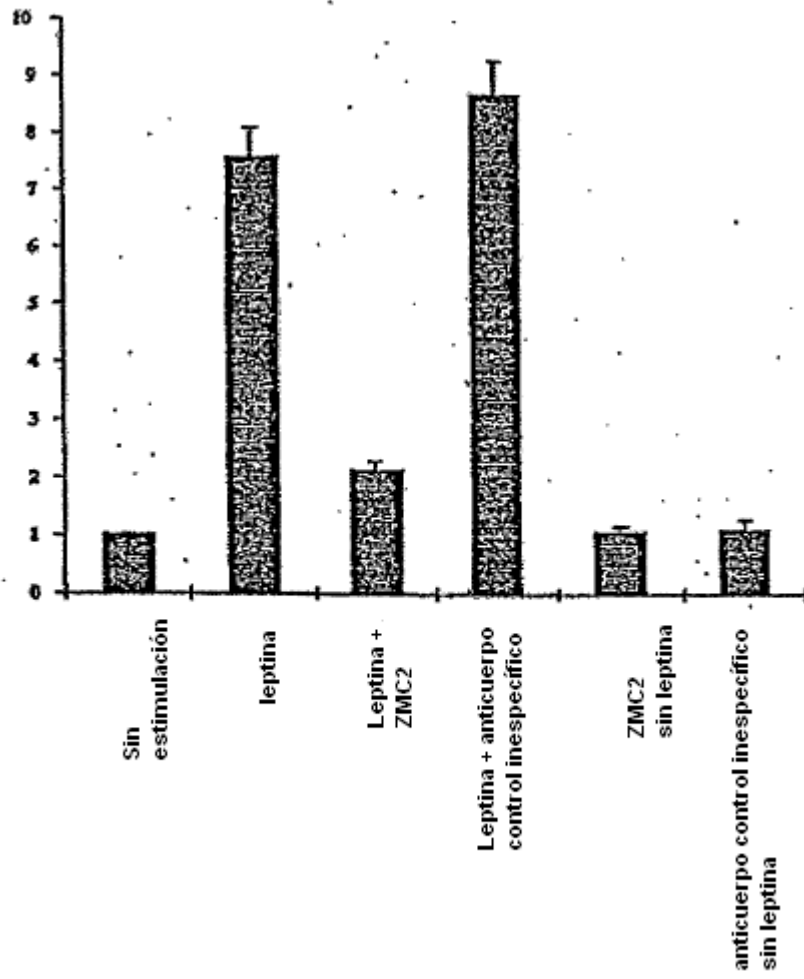


Figura 1

A)

XHNPIPMPPAAAGLLLLAAQPAMAEVMTQSPKFMSTSIGDRVNITCKAT
QNVRTAVTWYQQKPGQSPQALIFLASNRHTGVPARFTGSGSGTDFTLTIN
NVKSEDLADYFCLQHWNYPITFGSGTKLEIKRADAAPTQVSIFFPSSEQLT
SGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMS
STLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRGEC**SRVKRXQXSG
GPGTPIRPIGXPPYNSLGGGFQ

B)

DNA: NANGTCATAATCCAATACCTATGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTAC
+3: X H N P I P M P T A A A G L L L L
pComb3 vector SacI $V_L(\kappa)$ primer
DNA: TCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCTCGTGATGACCCAGTCTCCAAAT
+3: A A Q P A M A E L V M T Q S P K F
DNA: TCATGTCCACATCAATAGGAGACAGGGTCAATATCACCTGCAAGGCCACTC
+3: M S T S I G D R V N I T C K A T Q
DNA: AGAATGTTCTGACTGCTGTTACCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAGTCTC
+3: N V R T A V T W Y Q Q K P G Q S P
DNA: CTCAAGCACTGATTTTCTTGGCATCCAACGGGCACACTGGTGTCCCTGCTC
+3: Q A L I F L A S N R H T G V P A R
DNA: GATTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAAACATG
+3: F T G S G S G T D F T L T I N N V
DNA: TGAAATCTGAAGACCTGGCAGATTATTTCTGTCTACAACATTGGAATATC
+3: K S E D L A D Y F C L Q H W N Y P
DNA: CTCTCAGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTG
+3: L T F G S G T K L E I K R A D A A
DNA: CACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAATCATCTGGAG
+3: P T V S I F P P S S E Q L T S G G
DNA: GTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATG
+3: A S V V C F L N N F Y P K D I N V
DNA: TCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTT
+3: K W K I D G S E R Q N G V L N S W
BclI
DNA: GGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCA
+3: T D Q D S K D S T Y S M S S T L T
DNA: CGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCA
+3: L T K D E Y E R H N S Y T C E A T
 $C_L(\kappa)$ primer
DNA: CTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
+3: H K T S T S P I V K S F N R G E C
Stop XbaI NotI KpnI
DNA: GTTAGTAATCTAGAGTTAAGCGGCCCAATCGAGGGGGGGCCCGGTACCCC
+3: * * S R V K R P Q S R G G P V P Q
DNA: AATTCGCCCTATAGGGNGCCGTATTACAATTCAGTGGCGGCGGTTTCA
+3: F A L * G X R I T I H W A A V F X
DNA: AN
+3:

Figura 2

A)

LAXRGGGRKIXFXRETVMKYLXAYGPAAGLLLLAAQPAMAQVKLLESGP
GLVAPSESLSITCTISGFSLTDDGVSWIRQPPGKGLEWLGVWGGGSTYF
NSLFKSRLSITRDNSKSQVFLEMDSLQDDTAMYYCAKHDGHETMDYWGQ
GTSVTVSSSKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWN
SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTK
VDKKIVPRDCTSHHHHHH*ASLVVAVALHSFVXIKANRRPAX

B)

DNA: TTGGCCNCCGCGGTGGCGGCCGCAAAATTNTATTTCAGGGAGACAGTC
-1: L A X R G G G R K I X F X R E T V

DNA: ATAATGAAATACCTTTTNGCCTACGGGCCAGCGCGCTGGATTGTTATTACTC
-1: I M K Y L X A Y G P A A G L L L L
pComb3 vector XhoI V_hb primer

DNA: GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGTGAACTGCTCGAGTCAGGACCTGGC
-1: A A Q P A M A Q V K L L E S G P G

DNA: CTGGTGGCGCCTCAGAGAGCCTGTCCATCACATGCACTATCTCAGGGTTC
-1: L V A P S E S L S I T C T I S G F

DNA: TCATTAAACGACGATGGTGTAACTGGATTGGCGAGCCTCCAGGAAAGGGT
-1: S L T D D G V S W I R Q P P G K G

DNA: CTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTGGTGAAGCACATACCTTAAATCA
-1: L E W L G V I W G G G S T Y F N S

DNA: CTTTTCAAATCCAGACTGAGCATCACCAGGGACAACTCTAAGAGCCAAGTT
-1: L F K S R L S I T R D N S K S Q V

DNA: TTCTTAGAAATGGACAGTCTACAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGC
-1: F L E M D S L Q T D D T A M Y Y C

DNA: GCCAAACATGACGGACACGAGACTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCA
-1: A K H D G H E T M D Y W G Q G T S

DNA: GTCACCGTCTCCTCATCCAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCC
-1: V T V S S S K T T P P S V Y P L A

DNA: CCTGGATCTGCTGCCCAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTC
-1: P G S A A Q T N S M V T L G C L V

DNA: AAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTG
-1: K G Y F P E P V T V T W N S G S L

DNA: TCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACT
-1: S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

DNA: CTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTC
-1: L S S S V T V P S S T W P S E T V

DNA: ACCTGCAACGTTGCCCAACCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAATT
-1: T C N V A H P A S S T K V D K K I
C_{H1}(γ1)Primer SpeI His tag Stop

DNA: GTGCCCAAGGATTGTACTAGTCATCATCATCATCATTAAGCTAGCCTA
-1: V P R D C T S H H H H H H * A S L

DNA: GTGGTGGCGGTGGCTCTCCATTCGTTTGTGANGATAAAGGCCAATCGNAGA
-1: V V A V A L H S F V X I K A N R R

DNA: CCTGCNCNA
-1: P A X

Figura 3

A)

ATNCTTTNTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTG
CAGGAGTCAGGAACTGAAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGCCT
GCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACAAGTTATGATATAGACTGGGTGAGGCAG
ACGCCTGAACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTTCCTGGAGAGGGGA
GTAAGTGAATACAATGAGAAAGTTCAAGGGCAGGGCCACACTGAGTGTAGACAA
GTCCTCCA GCACAGCCTATATGGAGCTCACTAGGCTGACATCTGAGGACTCTG
CTGTCTATTTCTGTGCTAGAGGGGACTACTATAGGCGCTACTTTGACTTGTGGG
GCCAAAGGGACACCGGTCACCGTCTCCTCATGTGGAGGCGGTTACAGGCGGAGG
TGGCTCTGGCGGTGGCGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCA
TGTCTGCACTCTCCAGGGGAGAGGGTCAACCATGACCTGCAGTGCCAGCTC
AAGTATACGTTACATATATTGGTACCAACAGAAGCCTGGATCCTCCCCCA
GACTCCTGATTTATGACACATCCAACGTGGCTCCTGGAGTCCCTTTTCGC
TTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTATTCTCTCACAATCAACCGAAT
GGAGGCTGAGGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGGAGTGGAGTGGTTAT
CCTCTCACGTTTCGGCTCGGGCACCAAGCGGGAAATCAAACGGGGCGGCCGC
AGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCATAGACT-
GTTGAA

B)

MAQVQLQES GTEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYDIDWVRQTPEQGLEWIG
 WIFPGEGST EYNEKFKGRATLSVDKSSSTAYMELTRLTSEDSAVYFCARG
 DYYRRYFDLWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASP
 GERVTMTCSASSIRIYIYQKPGSSPRLLIYDTSNVAPGVPRFSGSG
 SGTSLYSLTINRMEAEDAATYYCQEWSGYPLTFGSGTKREIKRAAAGAPVP
 YPDPLEPR

Figura 4

A)

tcgctgccccaccagcc**ATG**gccaggtgaaactgctcgagtcaggacctggcctggtgg
 cgcctcagagagcctgtccatcacatgcactatctcagggttctcattaaccgacgatg
 gtgtaagctggattcggcagcctccaggaaagggctggaagtggctgggagtaatatggg
 gtggtggaagcacatactttaattcacttttcaaactccagactgagcatcaccagggaca
 actctaagagccaagttttcttagaaatggacagtctacaaactgatgacacagccatgt
 actactgcgccaacatgacggacacgagactatggactattgggggtcaaggaaacctcag
 tcaccgtctcctcatccaaaacgacacccccatctgtctatccactggccctggatctg
 ctgccccaaactaactccatggtgacctgggatgcctggtcaagggtatttccctgagc
 cagtga cagtgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctg
 tccctgcagtctgacctctacactctgagcagctcagtactgtccctccagcacctggc
 ccagcgagaccgtcacctgcaacgttgcccaccggccagcagcaccaaggtggacaaga
 aaattgtgccagggattgtactagtgtgagcaggtagtgtgagcaggtatagcaggtg
 gcccaggttctggtggcaggttccgaattcctcgaggtgccatccaaaaagtcgaag
 atgacacaaaaacctcatcaagacaattgtcaccaggatcaatgacatttcacacacgc
 agtcagctctcctccaaacagaaagtccacgggttggacttcattcctggggtccacccca
 tcttgaccttatccaagatggaccagacactggcagctctaccaacagatcctcaccagta
 tgccttcagaaaacgtgatccaaatatccaacgacctggagaacctccgggatcttcttc
 acgtgctggccttctctaagagctgccacttgcctgggacagtggcctggagaccttgg
 acagcctgggggggtgtcctggaagcttcaggctactccacagaggtggtggcctgagca
 ggctgcaggggtctctgcaggacatgctgtggcagctggacctcagccctgggtgcacta
 gtcacatcatcatcatcat**TAA**gctagcctagtgtggtggcgggtggctctcca

B)

Maqvklllesgpglvapseslsitctisqfsltddgvswirppgkglewlgviwggsty
 fnslfksrlsitrdnsksgvflemdslqddtamyycakhdghetmdywggtstvtvsss
 kttpsvyplapgsaaqtnsmvtlgclvkgyfpepvtvtwnsgslssgvhtfpavqlsdl
 ytlsssvtvpssstwpsetvtcnvahasstkvdkkiiprdctsggggsgggsgggsgg
 ggseflevpigkvqddtkliktiivtrindishtqsvsskqkvtgldfipglhpiltlsk
 mdgtlavyyqgiltsmprnviqisndlenlrldllhvlafskschlpwasgletldslgqv
 leasgystevvalsrllgslqdmwqldlspgctshhhhhh

Figura 5

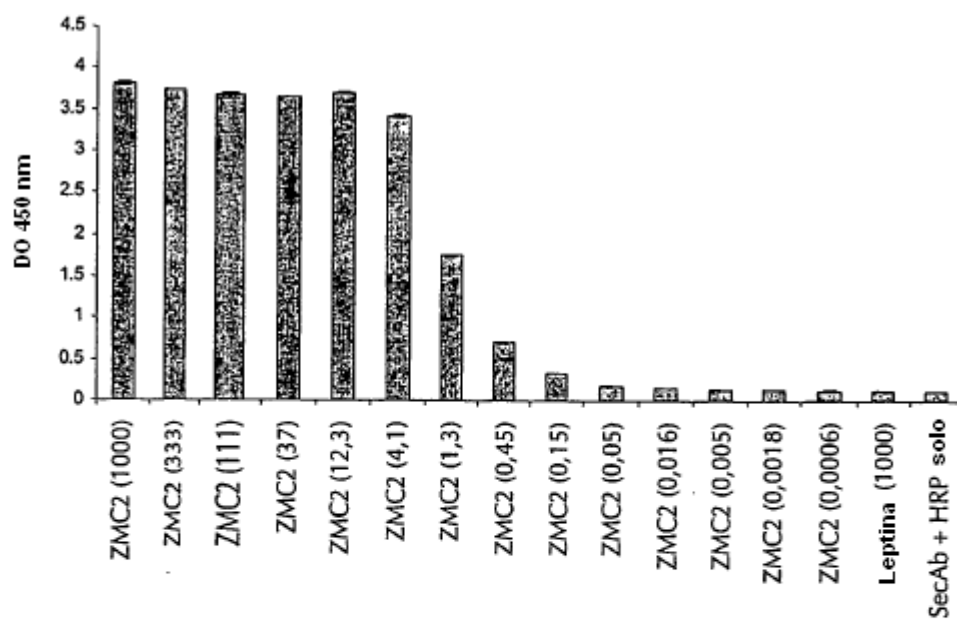


Figura 6

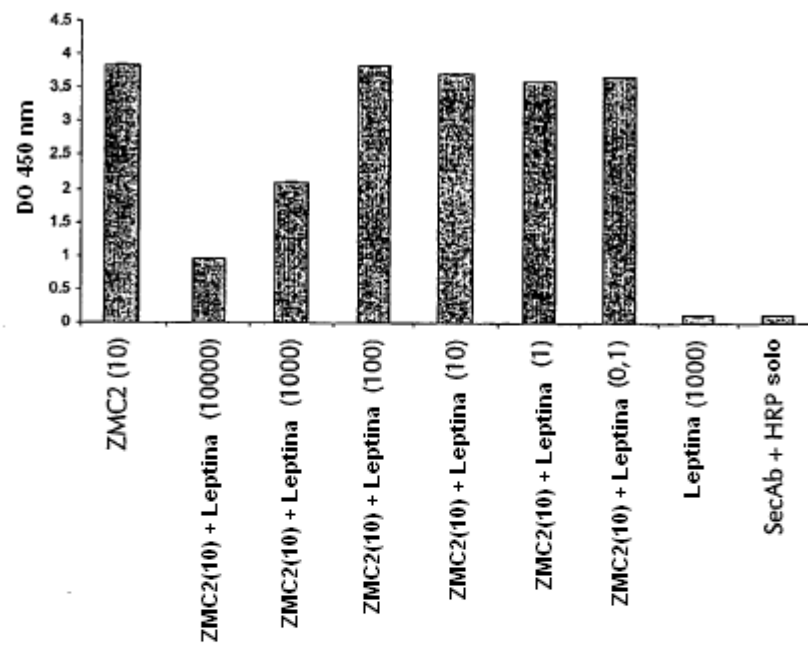


Figura 7

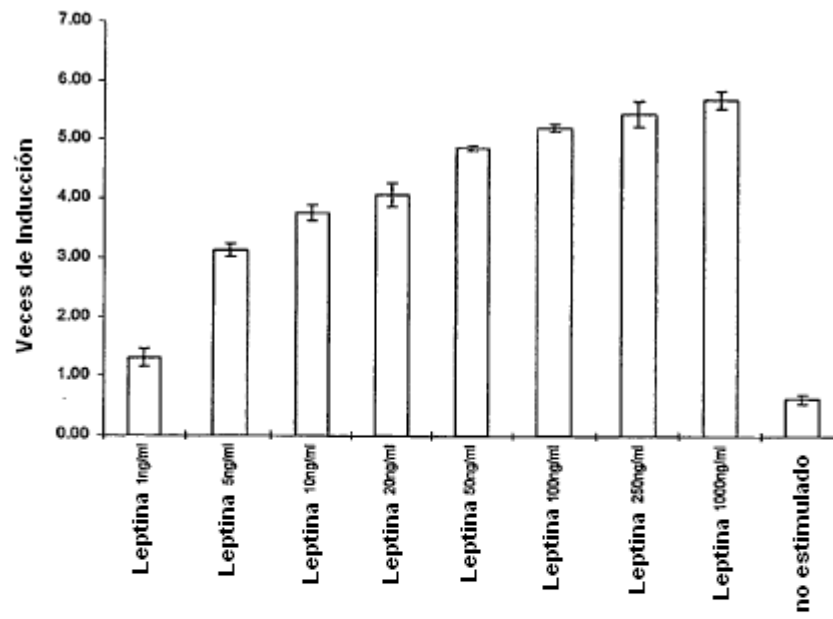


Figura 8

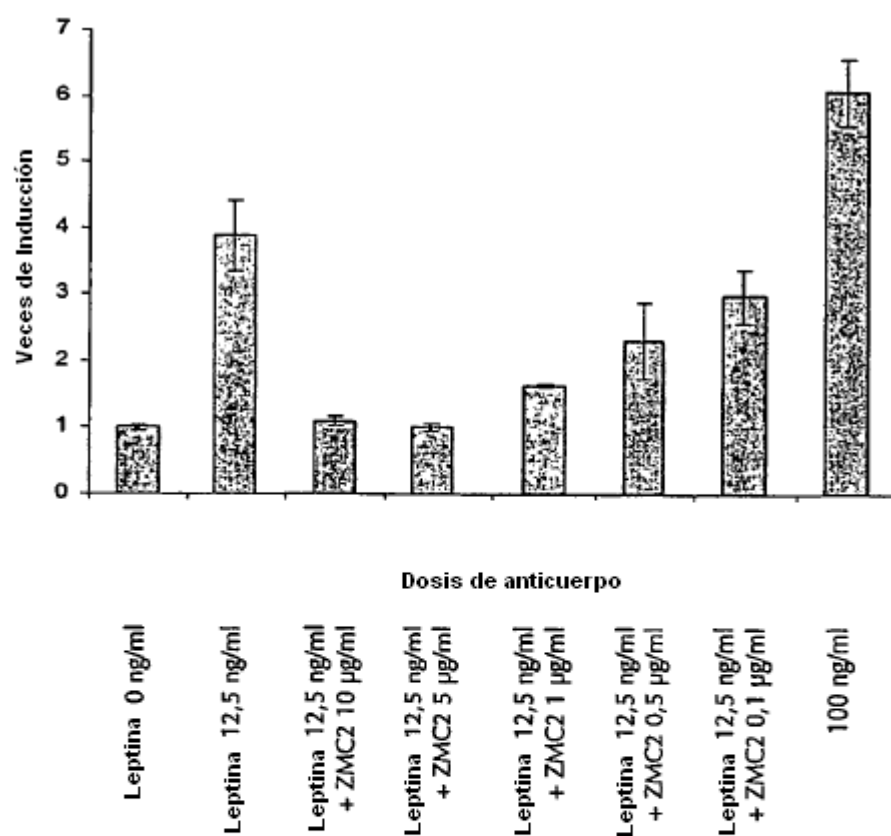


Figura 9

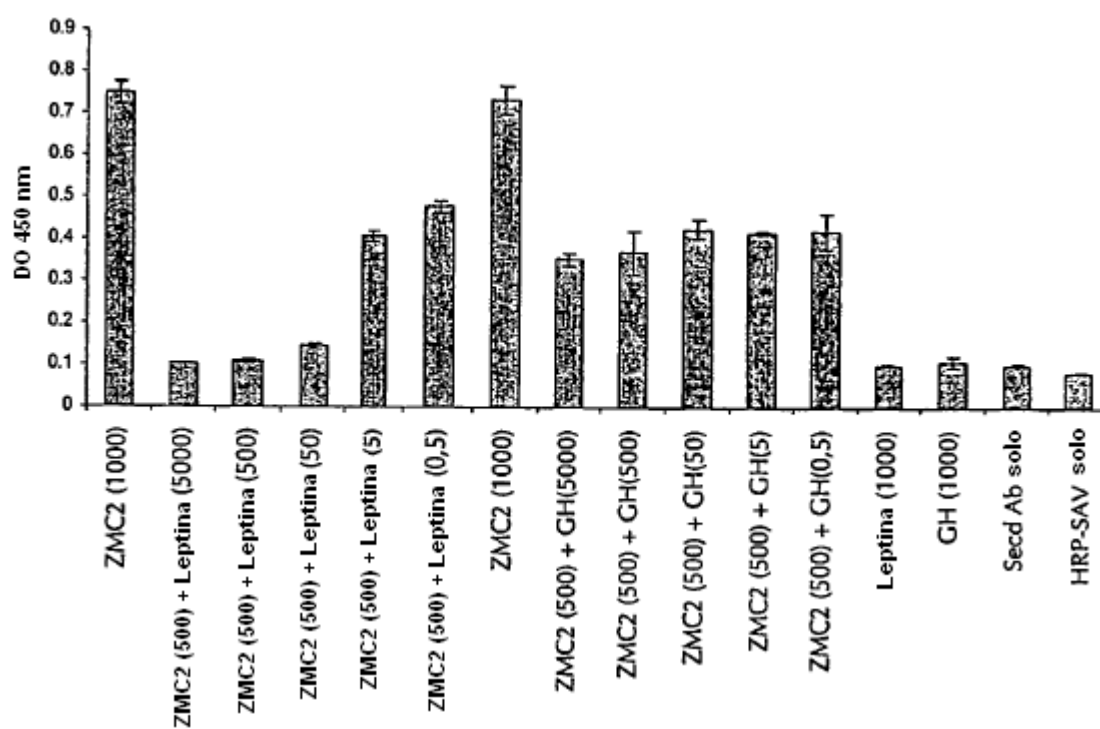


Figura 10

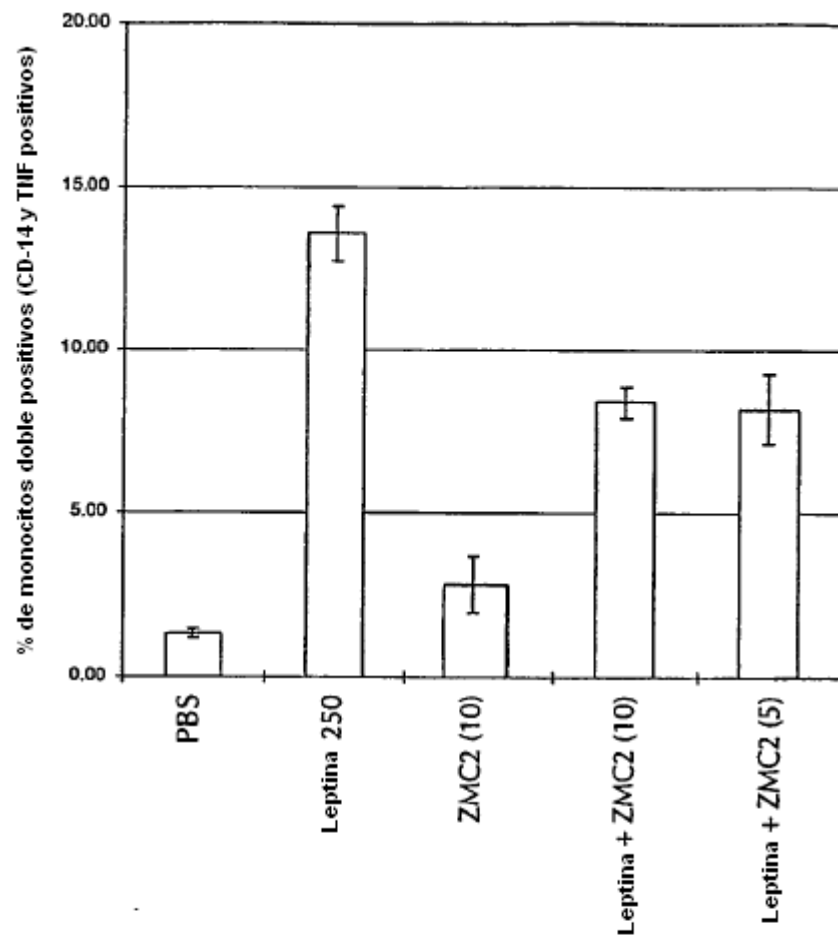


Figura 11

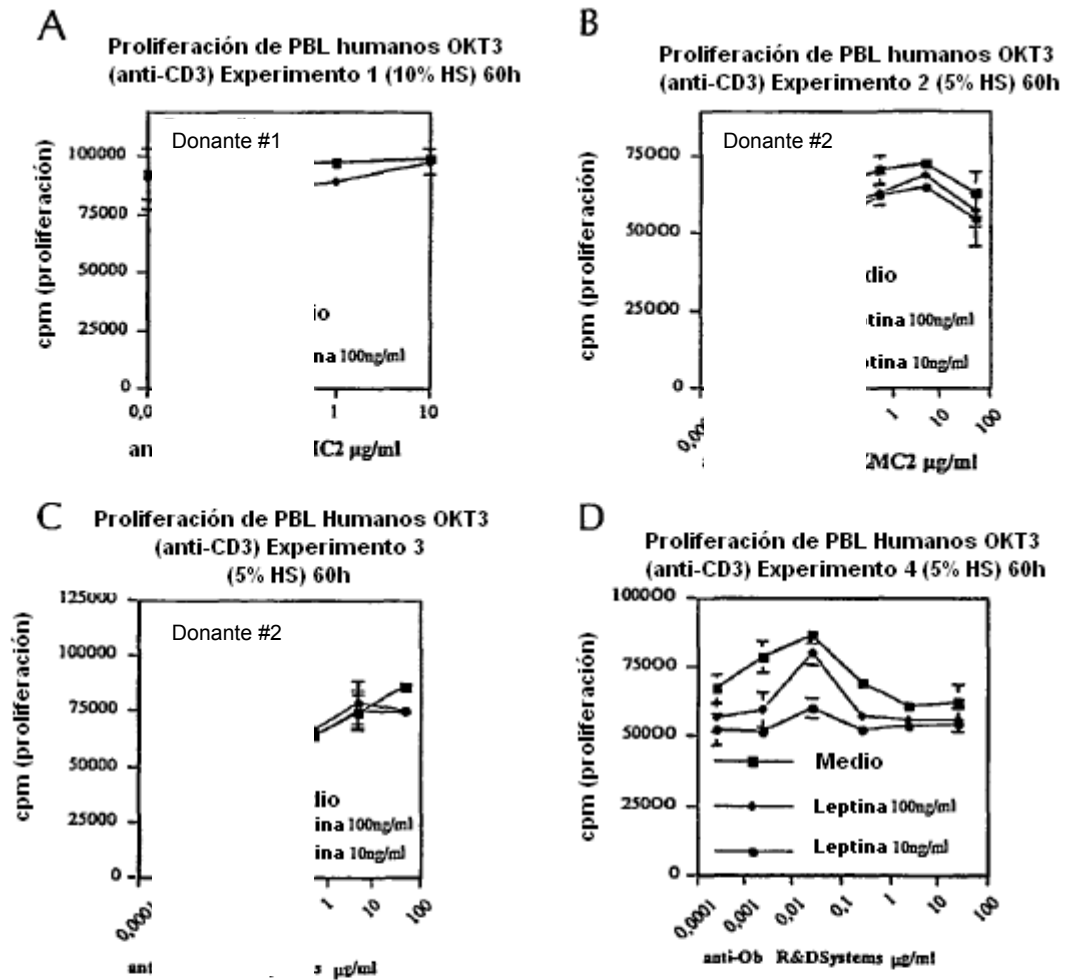


Figura 12

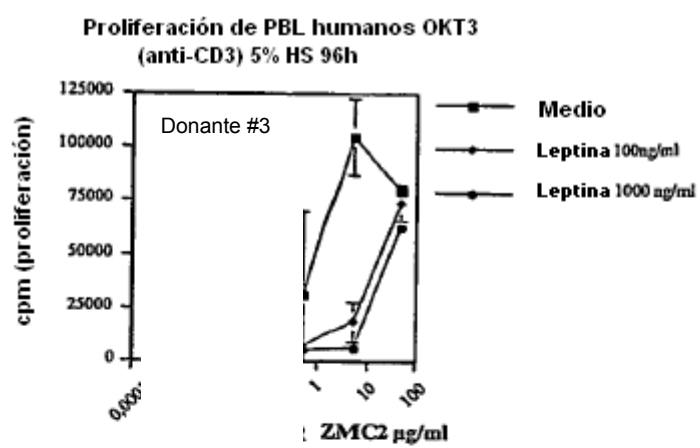


Figura 13

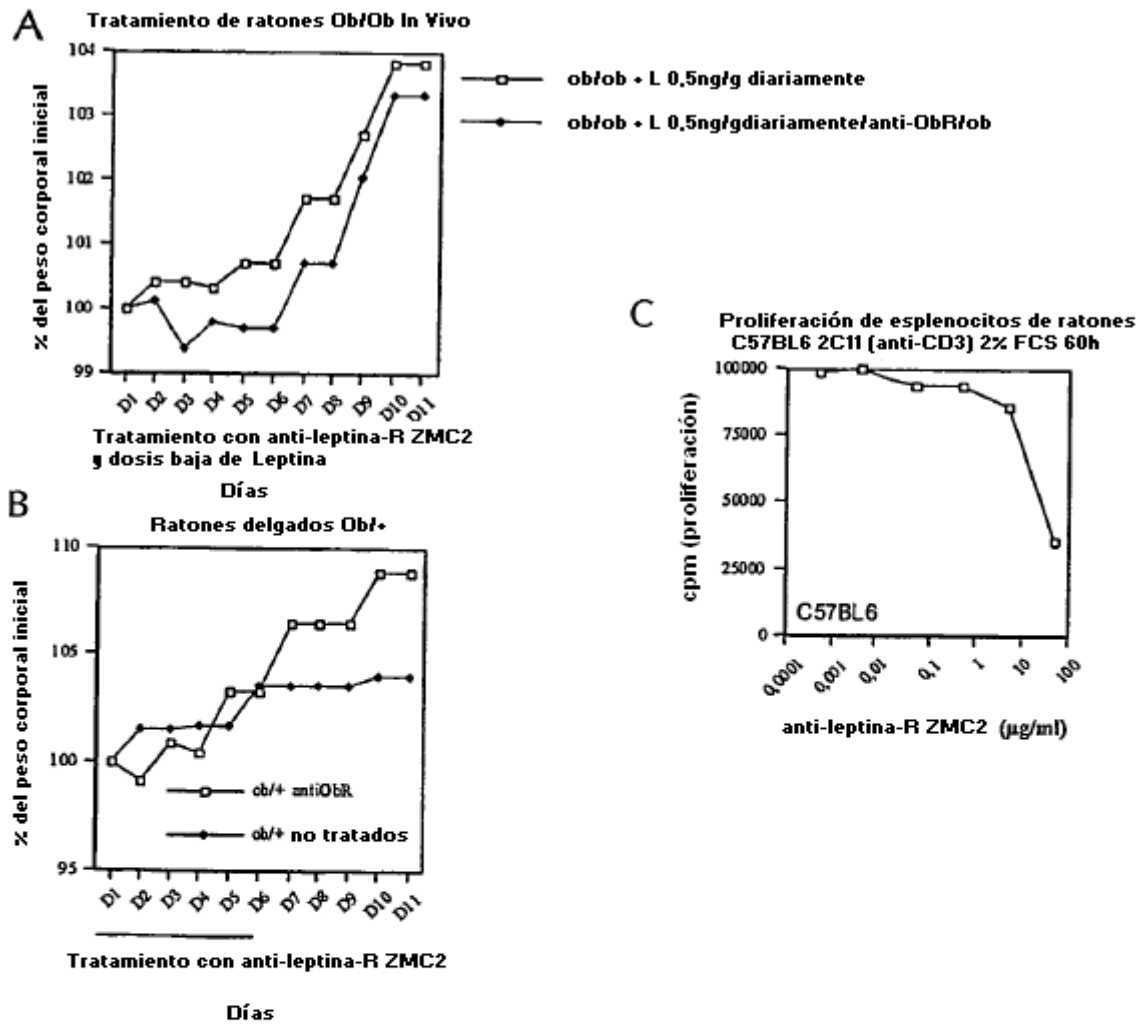


Figura 14

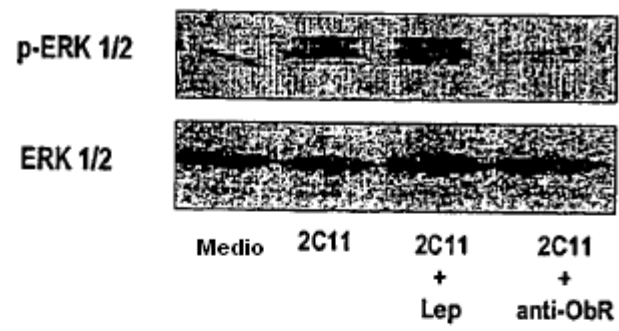


Figura 15

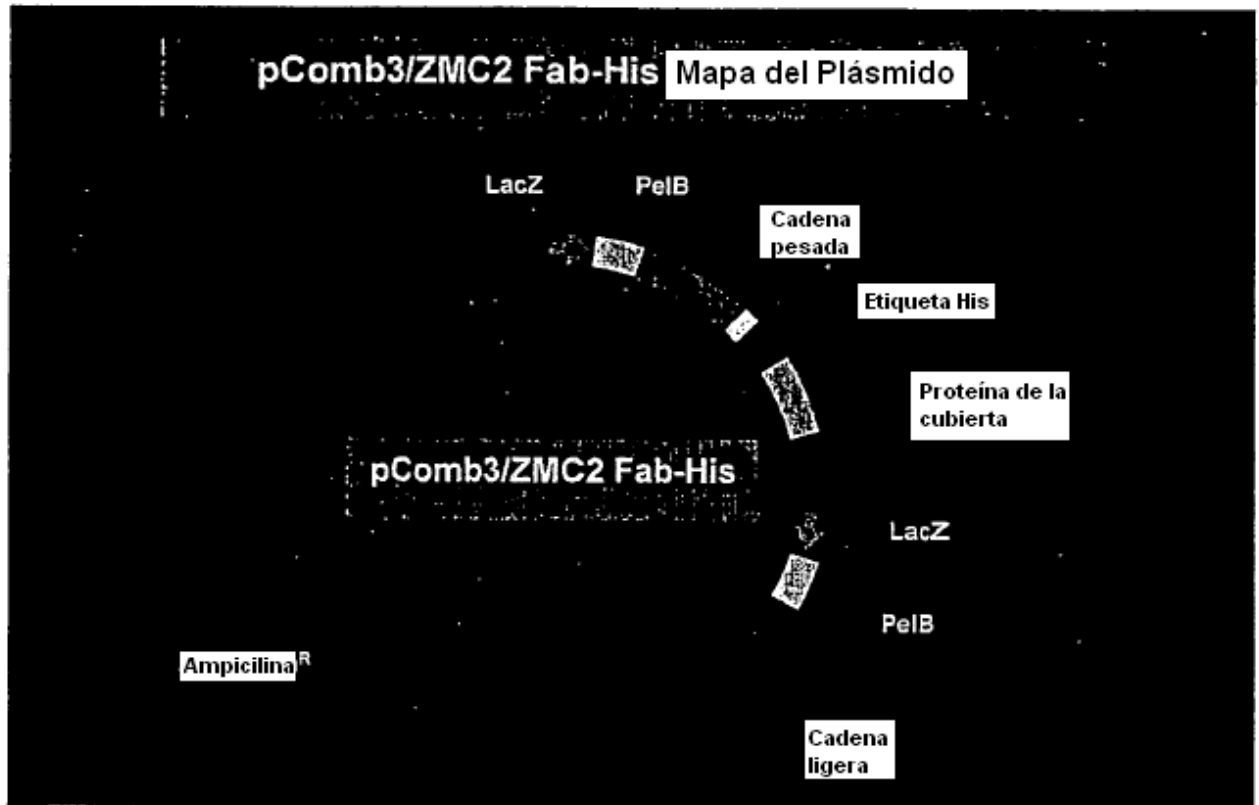


Figura 16

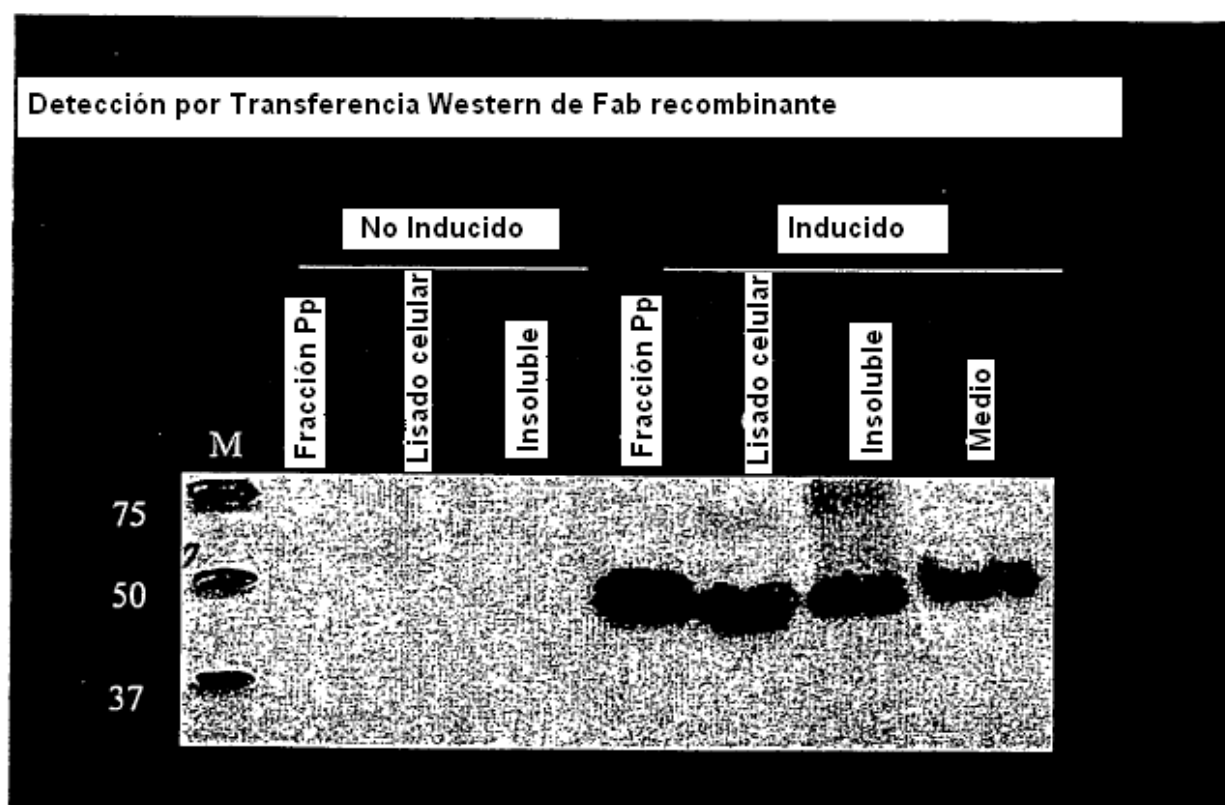


Figura 17

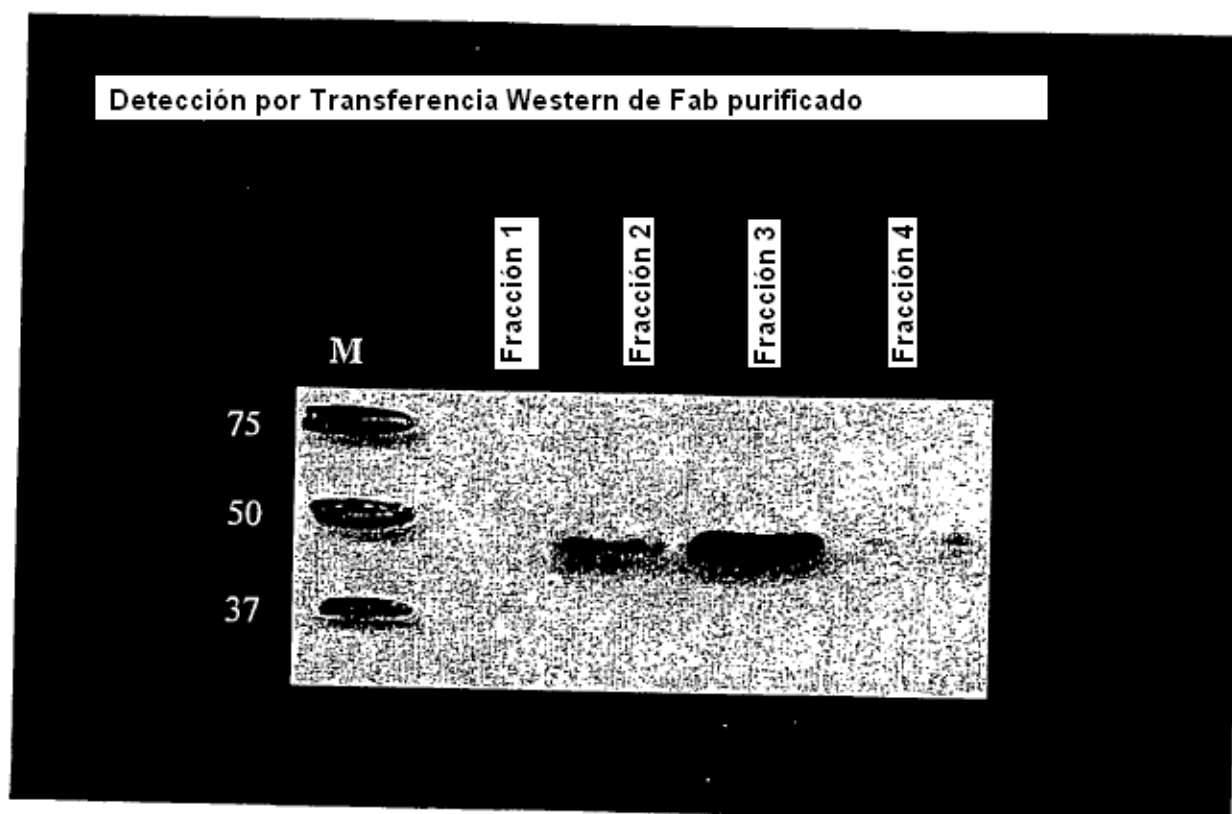


Figura 18

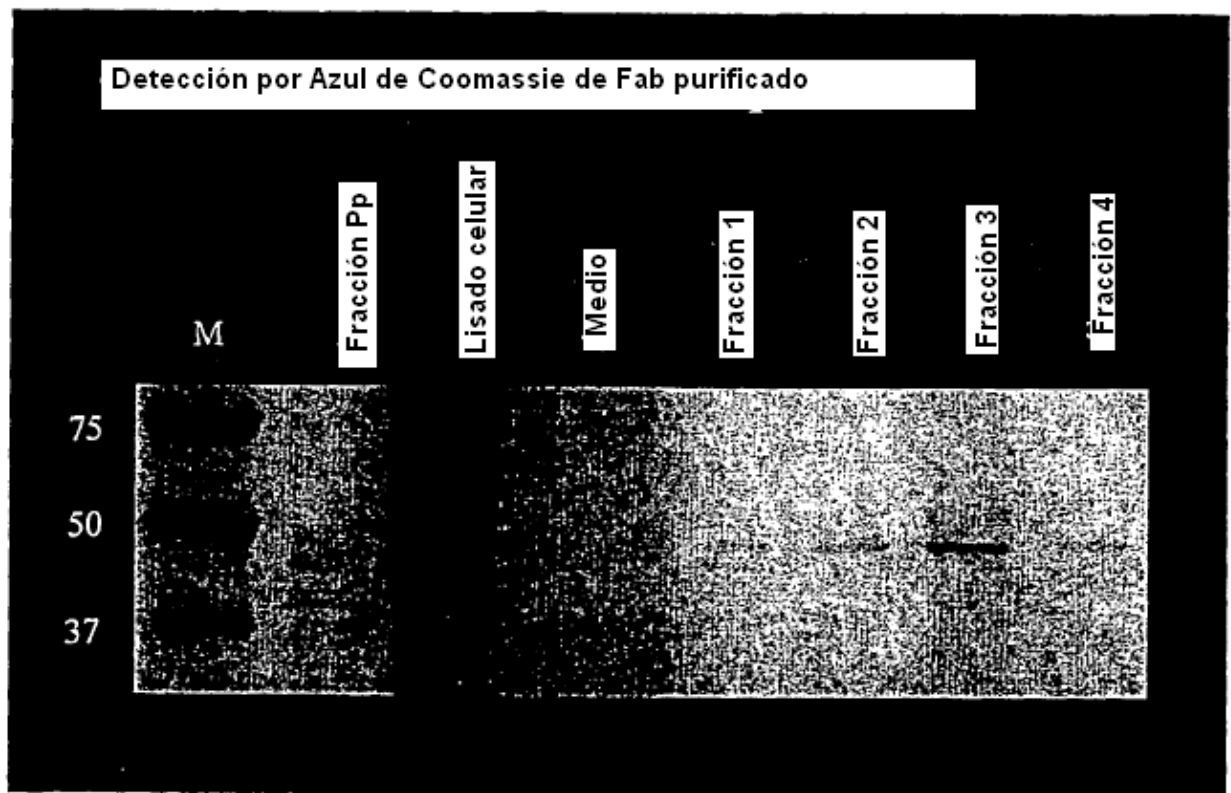
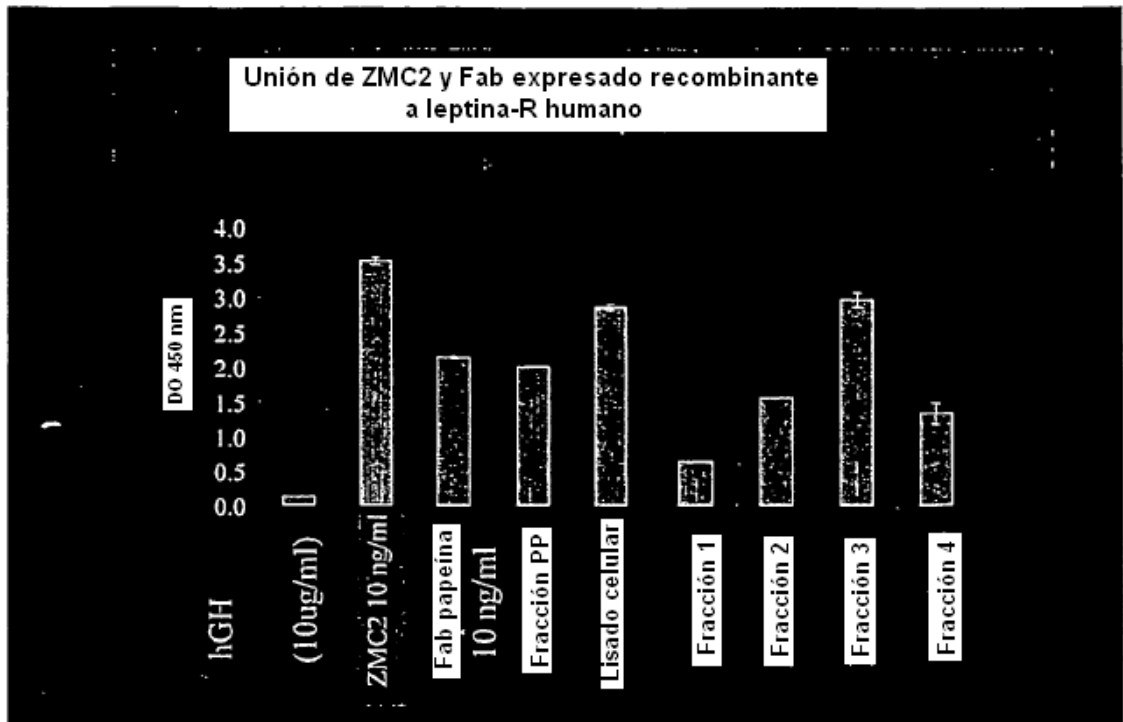


Figura 19

A)



B)

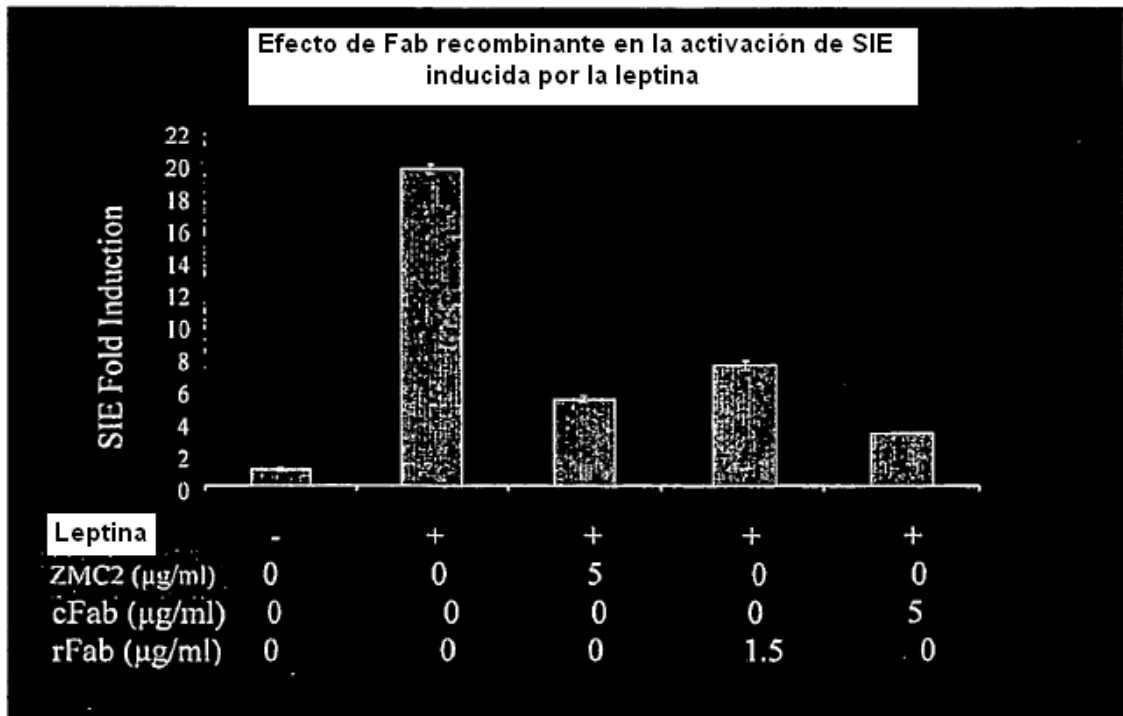


Figura 20