

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 133**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/74** (2006.01)

**C07K 14/575** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2015 PCT/EP2015/081186**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146221**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015 E 15820531 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3271731**

54 Título: **Procedimiento in vitro para la detección de la leptina mutada y el uso de un reactivo de detección**

30 Prioridad:

**16.03.2015 EP 15159303**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.02.2020**

73 Titular/es:

**MEDIAGNOST GESELLSCHAFT FÜR  
FORSCHUNG UND HERSTELLUNG VON  
DIAGNOSTIKA GMBH (100.0%)  
Aspenhastrasse 25  
72770 Kusterdingen, DE**

72 Inventor/es:

**FLEHMIG, BERTRAM**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 742 133 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento in vitro para la detección de la leptina mutada y el uso de un reactivo de detección

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento in vitro para la detección de leptina mutada y al uso de un reactivo de detección que se une a la leptina no mutada, pero no a la leptina mutada o lo hace con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada, en el momento del diagnóstico, particularmente en el diagnóstico diferencial de la obesidad.
- 10 **[0002]** La obesidad, también conocida como adiposidad, es una enfermedad nutricional y metabólica en la que las personas afectadas presentan un sobrepeso significativo. El sobrepeso se debe en particular a la formación de grasa corporal. Los adipocitos son el componente principal del tejido graso, y se distingue entre adipocitos univacuolares y adipocitos plurivacuolares.
- 15 **[0003]** Los adipocitos univacuolares disponen de una sola vacuola llena de lípidos. Este tipo de células forman el llamado tejido adiposo blanco. En los adipocitos plurivacuolares, los lípidos se almacenan en varias vacuolas separadas entre sí. Los adipocitos plurivacuolares se acumulan principalmente en el llamado tejido adiposo marrón.
- [0004]** Los adipocitos contienen el gen de la obesidad que codifica para la leptina. En cantidades menores, la leptina también se produce en la placenta, la mucosa gástrica, la médula ósea, el epitelio de la mama, el músculo esquelético, la hipófisis y el hipotálamo.
- 20 **[0005]** La leptina inhibe la aparición de la sensación de hambre y desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo de los lípidos en los mamíferos, particularmente en los humanos. La leptina es secretada principalmente por los adipocitos del tejido adiposo blanco. Los niveles de la leptina se correlacionan positivamente con la cantidad de grasa corporal.
- 25 **[0006]** La leptina humana es una proteína compuesta de 167 aminoácidos, incluido el péptido señal. El péptido señal N-terminal presenta una longitud de 21 aminoácidos y se escinde durante el proceso de secreción, de modo que la leptina madura presenta 146 aminoácidos. La leptina actúa uniéndose a receptores de leptina específicos que están presentes tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos. Debido a los procesos de empalme alternativos, existen varias isoformas del receptor de leptina. La isoforma A es una isoforma corta del receptor de leptina y desempeña un papel importante en el transporte de la leptina a través de la barrera hematoencefálica. La isoforma B, que es la llamada isoforma larga de la leptina, induce la transducción de señales y se expresa en el hipotálamo.
- 30 **[0007]** Tras la unión de la leptina a la isoforma B del receptor de leptina, se activan varias vías de transducción de señales, incluidas la Janus quinasa (JAK) y las proteínas STAT (STAT: transductores de señales y activadores de la transcripción), en particular STAT-3, y fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). En otras vías de señalización, la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), la proteína quinasa activada por monofosfato de 5'-adenosina (AMPK) y la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR: diana mecánica de la rapamicina o diana de la rapamicina en mamíferos) están activadas.
- 35 **[0008]** Las mutaciones homocigotas en el gen de la leptina conducen a una deficiencia completa de leptina, tal como se describe en casos muy raros de obesidad humana.
- 40 **[0009]** Sin embargo, la gran mayoría de las personas obesas presentan altos niveles de leptina circulante (Kesisidis T. y col., Ann Intern Med. 2010, enero 19, 152(2): 93-100, Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications).
- 45 **[0010]** Los pacientes que no presentan niveles detectables de leptina en el caso de la lipodistrofia, la amenorrea hipotalámica y la deficiencia congénita de leptina (DCL) se tratan con una terapia de reemplazo de leptina y administración de metreleptina. La metreleptina es un análogo de leptina recombinante compuesto de 147 aminoácidos de leptina humana madura más un residuo de metionina en el extremo N-terminal. Es un polipéptido no glicosilado con un enlace disulfuro entre una Cys-97 y una Cys-147. El peso molecular es de aproximadamente 16,15 kDa.
- 50 **[0011]** La metreleptina no está aprobada por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos, Estados Unidos) para el tratamiento de pacientes con lipodistrofia parcial porque no hay pruebas de que la metreleptina sea segura y eficaz en un grupo heterogéneo. Por lo tanto, la metreleptina tiene una importancia muy limitada en el tratamiento de pacientes con obesidad convencional, ya que estos pacientes presentan niveles elevados de leptina y, por lo tanto, muestran resistencia central a la leptina (Paz-Filho G. y col., Metabolism (2014), 1-11, Leptin treatment: Facts and expectations).
- 55 **[0012]** Las mutaciones en el gen que codifica para la leptina suelen dar lugar a la ausencia de leptina circulante y, por lo tanto, a una obesidad extrema. Wabitsch y col. (N Engl J Med; 372; 1; enero 1, 2015; 48-54) encontraron una

mutación homocigótica en un niño de dos años con obesidad extrema que da lugar a una sustitución de guanina por timina en la posición 298. En la leptina traducida, esto da lugar a una sustitución de aminoácido del ácido aspártico por tirosina en la posición de secuencia 100 de la leptina (teniendo en cuenta el péptido señal con los aminoácidos 1 a 21). La proteína mutada se secreta, pero no se une al receptor de leptina y no lo activa. Cuando el paciente fue tratado con metreleptina, se produjo la normalización de la conducta alimentaria y una pérdida de peso.

**[0013]** Los niveles de leptina en sangre se pueden determinar, por ejemplo, mediante RIA (radioinmunoensayo) o ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (Kratzsch y col., Horm Res 2002; 57: 127-132: A Rapid Quantitative Immunofunctional Assay for Measuring Human Leptin).

10

**[0014]** Lahlou y col., Diabetes, Bd. 49, agosto de 2000, S. 1347-1352 se refieren al receptor de leptina soluble en el suero de pacientes con resistencia completa a la leptina. Wu y col., J Clin Endocrinol Metab, junio de 2002, 87(6): 2931-2939 se refieren a la cuantificación del receptor de leptina soluble en sangre humana. Fischer-Posovszky y col., J Clin Endocrinol Metab, junio de 2010, 95(6): 2836-2840 describen una mutación sin sentido en la leptina que causa obesidad leve e hipogonadismo sin afectar la respuesta de las células T. Mazen y col., Molecular Genetics and Metabolism 97(2009) 305-308 se refieren a una mutación sin sentido en el gen de la leptina (N103K) en un paciente egipcio obeso. Funcke y col., Molecular and Cellular Pediatrics 2014, 1:3 dan a conocer formas monogénicas de obesidad infantil debidas a mutaciones en la leptina.

15

**[0015]** El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento que permita un diagnóstico diferencial mejorado de la obesidad. Además, es un objetivo de la invención proporcionar medios para llevar a cabo dicho procedimiento.

20

**[0016]** El objetivo subyacente de la invención se consigue mediante un procedimiento in vitro para la detección de la leptina mutada según la reivindicación 1.

25

**[0017]** La determinación de la unión de leptina no mutada de o en un primer material de muestra líquido que es suero o plasma, y la determinación de la unión de leptina mutada y leptina no mutada de o en un segundo material de muestra líquido que es suero o plasma, se puede realizar de forma independiente. Por ejemplo, la determinación de estos dos parámetros puede realizarse de forma independiente en términos de tiempo y de espacio.

30

**[0018]** El primer y el segundo material de muestra líquido se aisló del mismo sujeto antes de realizar el procedimiento de la invención.

35

**[0019]** Según una variante de la invención, el primer y el segundo material de muestra puede provenir de una extracción de un sujeto, que posteriormente se subdividió en dos, tres, cuatro o más materiales de muestra. En estos materiales de muestra obtenidos de esta manera, según una variante, se pueden realizar ambos parámetros, es decir, la unión de la leptina no mutada por una parte y la unión de la leptina mutada y la leptina no mutada, por otra parte, por separado en términos temporales y espaciales o de manera correlacionada en términos temporales y espaciales.

40

**[0020]** Según otra variante de la invención, el primer y el segundo material de muestra también se pueden haber extraído de un sujeto por separado en términos temporales y/o espaciales. Por tanto, en esta variante de la invención, el primer y el segundo material de muestra pueden provenir de diferentes extracciones de un sujeto, por ejemplo, un ser humano.

45

**[0021]** Según una variante adicional de la invención, el primer y el segundo material de muestra, antes de la determinación de la unión respectiva, también pueden haber sido procesados y/o procesados de manera diferente, preferentemente en función del reactivo de detección usado en cada caso.

50

**[0022]** Según la invención, el primer reactivo de detección es un receptor de leptina humana que se une a la leptina no mutada, pero no se une a la leptina mutada o se une con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada.

55

**[0023]** Según la invención, el segundo reactivo de detección es un anticuerpo policlonal o monoclonal, en el que el anticuerpo policlonal o monoclonal se une a la leptina mutada y no mutada.

60

**[0024]** En el sentido de la invención, se entiende por un primer o segundo reactivo de detección un reactivo de detección único como también una pluralidad de reactivos de detección, en particular una o más moléculas de detección. Así pues, un reactivo de detección, en particular una molécula de detección o varias moléculas de detección, puede ser en el sentido de la invención, por ejemplo, una combinación de moléculas de detección como, por ejemplo, un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo y/o un anticuerpo adicional y/o una o varias moléculas de receptores de leptina.

65

**[0025]** El segundo anticuerpo y/o los anticuerpos adicionales, por ejemplo, un anticuerpo terciario, pueden estar marcados de forma detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, fluoróforo, oligonucleótido, biotina o con partículas

detectables, por ejemplo, partículas de oro.

**[0026]** El segundo anticuerpo y/o los anticuerpos adicionales también pueden estar acoplados a una enzima, por ejemplo, una enzima informadora, de modo que tenga lugar la detección de la unión por conversión enzimática.  
5 Por ejemplo, la enzima acoplada a un anticuerpo puede ser peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.

**[0027]** Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En lugar de anticuerpos, también se pueden usar estructuras de anticuerpos tales como fragmentos de anticuerpos o elementos de anticuerpos que se especifican a continuación.

10 **[0028]** El término «reactivo de detección» en el sentido de la invención comprende tanto uno solo como una pluralidad de reactivos de detección, a menos que se indique lo contrario.

**[0029]** El objetivo subyacente de la invención también se resuelve mediante el uso de un receptor de leptina humano que se une a la leptina no mutada con un primer valor de enlace, pero no a la leptina mutada o lo hace con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada, en el diagnóstico, preferentemente en el diagnóstico diferencial, de la obesidad.

**[0030]** Tal como se usa en el presente documento, se entiende por una «combinación de reactivos de detección» cualquier disposición que incluya tanto el primer reactivo de detección como el segundo reactivo de detección.

**[0031]** Esta disposición es un sistema de ensayos inmunológicos. El sistema de ensayos inmunológicos se selecciona entre un RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), FIA (inmunoensayo de fluorescencia) o LIA (inmunoensayo de luminiscencia).

**[0032]** Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden prepararse mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, la técnica de hibridoma o la técnica de presentación en fagos, y seleccionarse por su especificidad mediante procedimientos de selección convencionales.

30 **[0033]** El primer reactivo de detección es un receptor de leptina humano. Según la invención, por un «receptor de leptina» se entiende cualquier estructura de unión a leptina específica, por ejemplo, el receptor de leptina de origen natural o fragmentos del receptor de leptina. Además, la estructura del receptor de leptina puede ser un receptor de leptina sintético o de origen natural y mutado o fragmentos del receptor de leptina.

35 **[0034]** Según la invención, es esencial que el primer reactivo de detección se una a la leptina no mutada pero no a la leptina mutada o solo con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada. El primer reactivo de detección se une preferentemente a la leptina mutada con un máximo del 40 %, un máximo del 30 %, un máximo del 20 %, un máximo del 10 %, un máximo del 5 % del valor de enlace de la leptina no mutada. Más preferentemente,  
40 el primer reactivo de detección se une a la leptina no mutada, pero no a la leptina mutada, o solo con un máximo del 5 %, un máximo del 2 % del valor de enlace de la leptina no mutada. Preferentemente, el primer reactivo de detección no se une a la leptina mutada.

**[0035]** Según la invención, el primer reactivo de detección es un receptor de leptina humano.  
45 Sorprendentemente, el receptor de leptina humano distingue selectivamente entre leptina no mutada y leptina mutada. El receptor de leptina humano, en sus diversas isoformas, es excelentemente adecuado para la detección selectiva de leptina no mutada en presencia de leptina mutada. En lugar del receptor de leptina completo o las diversas isoformas completas, también se pueden usar los fragmentos del receptor de leptina correspondientes y/o los receptores de leptina modificados y/o los fragmentos del receptor de leptina modificados. Por ejemplo, se puede usar el dominio de unión a leptina del receptor de leptina o una proteína de fusión  
50 que contiene el dominio de unión al receptor de leptina. Los receptores de leptina, en forma fragmentada y/o modificada, se caracterizan por su funcionalidad de unión selectiva a la leptina no mutada.

**[0036]** Según la invención, se entiende por «valor de enlace» el valor medido característico del sistema de medición particular usado para la unión del reactivo de detección a la leptina no mutada por un lado o la leptina no mutada y mutada por el otro. Este valor medido puede ser una medida directa o indirecta de la afinidad de unión.

**[0037]** El valor medido que refleja la afinidad de unión representa una medida de la unión del primer reactivo de detección a la leptina no mutada. En el segundo reactivo de detección, el valor medido que refleja la afinidad de  
60 unión representa una medida para la unión de leptina mutada y no mutada.

**[0038]** Por ejemplo, el valor medido para el valor de enlace puede tener la unidad de una concentración (o una cantidad). Por ejemplo, en RIA, ELISA, FIA o LIA, la concentración (o cantidad) de leptina no mutada con capacidad de unión, por un lado, o la concentración (o cantidad) de leptina no mutada y mutada con capacidad de unión, por otro  
65 lado, se suele determinar en una muestra de medición.

**[0039]** El valor medido para el valor de enlace también se puede expresar como la constante de equilibrio  $K_D$ , es decir, como equilibrio químico en términos de la ley de acción de masas.

5 **[0040]** Según una variante de la invención, la afinidad de unión se correlaciona con la constante de equilibrio  $K_D$ :

$$K_D = (C_N \cdot C_L)/C_{NL}$$

10 en el que:

$C_N$  es la concentración del reactivo de detección,

$C_L$  es la concentración de leptina (no mutada o no mutada y mutada), y

$C_{NL}$  es la concentración del complejo de reactivo de detección y leptina (no mutada o no mutada y mutada).

15

**[0041]** Cuanto menor sea el valor  $K_D$ , mayor será la afinidad de unión.

**[0042]** Como valor de enlace, se pueden usar otras señales adecuadas tales como fluorescencia, medición de radioactividad o similares.

20

**[0043]** Preferentemente, el valor de enlace en la invención se expresa como una concentración, de modo que las concentraciones se comparan entre sí.

**[0044]** Según una variante de la invención, es preferible que el valor de enlace, es decir, el valor medido particular para la unión de la leptina no mutada al primer reactivo de detección, así como de leptina no mutada y leptina mutada al segundo reactivo de detección, se determine en condiciones esencialmente idénticas, preferentemente en condiciones de medición idénticas.

**[0045]** Por lo tanto, se puede realizar la medición correspondiente en condiciones de temperatura idénticas, por ejemplo a 20 °C o 25 °C, en condiciones de tampón sustancialmente idénticas, por ejemplo, con solución salina tamponada con fosfato pH 7,5, con diluciones sustancialmente idénticas durante un período de tiempo sustancialmente idéntico, por ejemplo, 2 horas.

**[0046]** Sin embargo, se ha demostrado sorprendentemente que la detección de la unión o la determinación del valor de enlace se puede realizar con un resultado fiable incluso si el primer valor de enlace, es decir, el valor medido determinado para la unión de la leptina no mutada al primer reactivo de detección, en el que la leptina mutada no se une, o lo hace con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada, y el segundo valor de enlace de la unión a leptina mutada y no mutada al segundo reactivo de detección, se determina en cada caso en condiciones sustancialmente diferentes, en particular en condiciones diferentes de medición y/o con diferentes procedimientos de medición. En particular, las diferentes condiciones de medición también pueden ser diferentes procedimientos de medición. En el caso de un procedimiento de medición idéntico, pueden diferir particularmente las condiciones en las que se realizan las mediciones.

**[0047]** Así, por ejemplo, se puede determinar el valor de enlace de la leptina mutada y no mutada, que por lo tanto, se corresponde con un valor de enlace de la leptina total («leptina total»), mediante un procedimiento de detección convencional, por ejemplo, un procedimiento de detección basado en afinidad, por ejemplo, con un ensayo inmunológico tal como un ELISA, RIA, FIA, LIA, etc. en o desde un material de muestra de un sujeto, preferentemente líquido.

**[0048]** El valor de enlace de la leptina no mutada se realiza con un procedimiento de detección o con una combinación de reactivos de detección, por ejemplo, un sistema de ensayos, en el que el reactivo de detección o los reactivos de detección distinguen entre la leptina mutada y la no mutada, por lo que la leptina no mutada se une y la leptina mutada no se une o se une con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada. Según la invención, se usa un receptor de leptina humano o variantes del receptor de leptina. Sorprendentemente, el receptor de leptina humano presenta una especificidad extraordinaria por la leptina no mutada, por lo que preferentemente no se une a la leptina mutada o se une de manera no detectable.

**[0049]** A pesar de cualquier posible variación en la determinación del valor de enlace de la leptina total, es decir, la leptina mutada y la leptina no mutada, por un lado, y en la determinación del valor de enlace de la leptina no mutada, en el que la leptina mutada no se une o lo hace con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada, por otro lado, los valores de enlace correspondientes sorprendentemente son significativamente diferentes, por lo que es posible realizar un diagnóstico diferencial.

**[0050]** Por ejemplo, con la combinación o con el procedimiento según la invención, se puede determinar si en un sujeto, preferentemente un ser humano hay heterocigosidad u homocigosidad con respecto a la leptina mutada.

5 **[0051]** El procedimiento según la invención para detectar leptina mutada se realiza in vitro utilizando material de muestra aislado. Por lo tanto, el procedimiento según la invención no se realiza in vivo.

**[0052]** Según una variante preferida, el segundo reactivo de detección es un anticuerpo policlonal que se une tanto a la leptina mutada como a la leptina no mutada.

10

**[0053]** Los anticuerpos policlonales se pueden preparar de una manera convencional. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales contra la leptina humana pueden prepararse inmunizando animales con leptina, opcionalmente con adyuvantes. Como animales, por ejemplo, se pueden usar cabras, conejos, ratones o ratas. Los anticuerpos producidos por las diversas células B reconocen una pluralidad de epítomos en la leptina, de modo que tanto la leptina mutada como la no mutada son reconocidas por los anticuerpos policlonales.

15

**[0054]** Como alternativa, también se pueden usar anticuerpos monoclonales.

**[0055]** Las células B obtenidas después de la inmunización con leptina se fusionan de manera convencional con una célula de mieloma (técnica del hibridoma).

20

**[0056]** Los hibridomas obtenidos se aíslan y se seleccionan en función de la especificidad de los anticuerpos producidos por las células del hibridoma. De esta manera, se pueden aislar anticuerpos monoclonales que reconocen tanto la leptina mutada como la no mutada. El experto en la técnica conoce la producción de anticuerpos monoclonales y la selección de células de hibridoma en función de la especificidad de los anticuerpos.

25

**[0057]** Según la invención, el primer reactivo de detección es un receptor de leptina humano. Según otra variante de la invención, el primer reactivo de detección es un fragmento del receptor de leptina, un receptor de leptina modificado y/o un fragmento del receptor de leptina modificado. Por ejemplo, el primer reactivo de detección puede ser el dominio de unión a leptina del receptor de leptina o una proteína de fusión que contiene el dominio de unión a leptina del receptor de leptina. Los fragmentos y/o modificaciones del receptor de leptina mencionados anteriormente presentan la funcionalidad de selección entre leptina mutada y no mutada.

30

**[0058]** Según otra realización preferida de la invención, el receptor de leptina comprende el dominio de unión a leptina del receptor de leptina humana, preferentemente la isoforma A, la isoforma B, la isoforma C, la isoforma D y/o la isoforma E.

35

**[0059]** El receptor de leptina es un receptor unido a membrana que presenta un dominio extracelular de unión a leptina. El dominio extracelular de unión a leptina está unido a un dominio citoplásmico a través de una región transmembrana.

40

**[0060]** Hay cinco isoformas humanas, la isoforma A, la isoforma B, la isoforma C, la isoforma D y la isoforma E, que son variantes de empalme alternativas.

45 **[0061]**

La isoforma B es la variante más larga del receptor de leptina.

**[0062]** La isoforma A, la isoforma C y la isoforma D del receptor de leptina humano difieren con respecto a los dominios citoplásmicos. Los dominios citoplasmáticos están unidos a la Janus quinasa (JAK). Tras la unión de la leptina al receptor de leptina, se produce la agregación de homodímeros del receptor, lo que induce la activación de la Janus quinasa. En el curso de la activación, se produce la fosforilación de los factores de transcripción citoplasmáticos STAT, en particular STAT-3. Los transductores de señal activados y los activadores de la transcripción (STAT) migran al núcleo e inducen la transcripción de los genes.

50

**[0063]** Las isoformas A, C y D contribuyen solo de manera insignificante a la transcripción de la señal.

55

**[0064]** La isoforma E es una forma soluble de un receptor de leptina que supuestamente se separa de la superficie de la célula mediante una escisión proteolítica en un desprendimiento del receptor.

**[0065]** Según la invención, se usa el dominio de unión a leptina o la isoforma E del receptor de leptina como el primer reactivo de detección, según una realización preferida.

60

**[0066]** El dominio de unión a leptina también se puede usar como proteínas de fusión. Por lo tanto, según una variante de la invención, el dominio de unión a leptina o la isoforma E se pueden fusionar con la porción Fc de un anticuerpo. Cuando se fusiona con la porción Fc de un anticuerpo, se pueden proporcionar homodímeros del dominio de unión a leptina. Estos homodímeros son similares a los homodímeros inducidos in vivo en una célula por la unión

65

natural de leptina.

**[0067]** Según una variante preferida de la invención, se usan los aminoácidos Thr20 a Asp839 de la isoforma B en la preparación de una proteína de fusión. Preferentemente, los aminoácidos Thr20 a Asp839 de la isoforma B se fusionan a la porción Fc de un anticuerpo, preferentemente como un homodímero. De forma alternativa, por ejemplo, también la isoforma E es adecuada según la invención en la preparación de proteínas de fusión, por ejemplo, con la porción Fc de un anticuerpo, opcionalmente como un homodímero.

**[0068]** Se ha demostrado de manera sorprendente que el dominio de unión a leptina del receptor de leptina natural se une selectivamente a la leptina no mutada.

**[0069]** Los receptores de leptina cuya secuencia no es idéntica a la del receptor natural de leptina también se pueden usar como el primer reactivo de detección.

**[0070]** Según la invención, por tanto, se pueden usar variantes de receptores de leptina del receptor de leptina natural en los que hay aminoácidos delecionados o sustituidos por otros aminoácidos, siempre y cuando la leptina no mutada se siga uniendo de manera específica.

**[0071]** Según una variante preferida, el receptor de leptina usado presenta al menos una identidad de secuencia del 80 %, preferentemente de al menos el 90 %, más preferentemente de al menos el 95 %, incluso más preferentemente de al menos el 98 %, aún más preferentemente de al menos el 99 %, basado en la secuencia del receptor de leptina natural.

**[0072]** Según otra realización preferida de la invención, el receptor de leptina es una isoforma soluble que preferentemente presenta los aminoácidos Thr20 a Asp839 de la isoforma B del receptor de leptina humano.

**[0073]** Según una variante preferida, el receptor de leptina usado presenta al menos una identidad de secuencia del 80 %, preferentemente de al menos el 90 %, más preferentemente de al menos el 95 %, incluso más preferentemente de al menos el 98 %, aún más preferentemente de al menos el 99 %, basado en la secuencia de la isoforma soluble del receptor natural de leptina, que preferentemente presenta los aminoácidos Thr20 a Asp839 de la isoforma B.

**[0074]** Según otra realización preferida de la invención, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos D100Y, N103K y/o L72S. Los datos de secuencia en la presente invención se refieren a la secuencia de leptina que incluye el péptido señal, a menos que se indique lo contrario.

**[0075]** Según otra realización preferida de la invención, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos R105W, G133V, S141C y/o L161G.

**[0076]** Según la invención, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: D100Y, N103K, L72S, R105W, G133V, S141C y/o L161G.

**[0077]** Según otra realización preferida de la invención, la leptina mutada presenta al menos una sustitución de aminoácidos D100Y en la secuencia de aminoácidos.

**[0078]** En una realización preferida, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos la sustitución de aminoácidos D100Y.

**[0079]** En una realización preferida, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos la sustitución de aminoácidos N103K.

**[0080]** En una realización preferida, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos la sustitución de aminoácidos L72S.

**[0081]** En una realización preferida, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos la sustitución de aminoácidos R105W.

**[0082]** En una realización preferida, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos la sustitución de aminoácidos G133V.

**[0083]** En una realización preferida, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos la sustitución de aminoácidos S141C.

**[0084]** En una realización preferida, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos la sustitución

de aminoácidos L161G.

**[0085]** Se ha demostrado de manera sorprendente que el receptor de leptina natural se une a la leptina no mutada de una manera altamente selectiva o no se une significativamente, preferentemente no se une a la leptina mutada.

**[0086]** Por lo tanto, ya en una sustitución de aminoácidos en leptina, por ejemplo, en la posición de secuencia 100 de D por Y (D100Y), la leptina mutada ya no se une al dominio de unión natural del receptor de leptina. En una variante muy preferida de la invención, la leptina mutada en la posición de secuencia 100 presenta una sustitución de aminoácidos de D por Y.

**[0087]** El procedimiento según la invención para detectar leptina mutada se especifica en la reivindicación 1.

**[0088]** El primer y segundo material de muestra líquido, que es suero o plasma, se aisló del mismo sujeto antes de realizar el procedimiento según la invención de manera simultánea según una variante de la invención. Según otra variante de la invención, el material de muestra se extrajo de un sujeto en diferentes momentos.

**[0089]** En función del procedimiento de medición empleado, se puede realizar la determinación del primer valor de enlace y el segundo valor de enlace en una muestra de medición idéntica o por separado en dos muestras de medición. En el primer caso, los valores de enlace se determinan juntos en una muestra de medición, y en el segundo caso, el material de la muestra se divide en dos muestras de medición y se mide por separado, pero opcionalmente en paralelo. Según otra variante de la invención, el primer valor de enlace y el segundo valor de enlace se determinan en diferentes momentos y opcionalmente bajo diferentes condiciones de medición y/u opcionalmente con diferentes procedimientos de medición.

**[0090]** El sujeto es preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano.

**[0091]** El primer y segundo material líquido de la muestra son suero o plasma de una muestra de sangre tomada de un sujeto, preferentemente un ser humano. Después de la extracción de la sangre, la parte celular de la sangre se puede separar antes de la coagulación o después de la coagulación. Si la separación tiene lugar antes de la coagulación, se obtiene plasma sanguíneo; si la separación se realiza después de la coagulación, se obtiene el suero sanguíneo.

**[0092]** Según la invención, tanto el plasma sanguíneo como el suero sanguíneo pueden usarse como primer y segundo material de muestra líquido.

**[0093]** Según una variante preferida de la invención, se usa suero sanguíneo.

**[0094]** La muestra de sangre puede separarse después de la separación de los componentes celulares para obtener un primer y un segundo material de muestra líquido.

**[0095]** Después de una dilución adecuada, por ejemplo, en un tampón, por ejemplo, en solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris o en tampón de bicarbonato de sodio, el primer y segundo material de muestra líquido diluido de esa manera se pone en contacto con el primer y segundo reactivo de detección, respectivamente, y se determina el valor de enlace respectivo.

**[0096]** El valor medido que representa el valor de enlace se puede determinar mediante diversos procedimientos, pudiéndose determinar, por ejemplo, después de ajustar las condiciones de equilibrio, la concentración del reactivo de detección libre, la leptina libre y/o la concentración del complejo del reactivo de detección y leptina.

**[0097]** El valor de enlace, que es una medida de la afinidad, también se puede determinar mediante un ensayo de competición. El ensayo de competición se puede realizar, por ejemplo, en forma de un RIA, ELISA, FIA o LIA de una manera convencional.

**[0098]** Según una variante del procedimiento según la invención, al determinar el valor de enlace como una medida de la afinidad tanto en la determinación del primer valor de enlace como en la determinación del segundo valor de enlace, se puede realizar un procedimiento de medición idéntico en condiciones idénticas.

**[0099]** Según otra realización del procedimiento según la invención, la determinación del primer valor de enlace y el segundo valor de enlace tiene lugar en una única muestra de medición.

**[0100]** En esta variante de la invención, no se requiere separación en un primer y un segundo material de muestra líquido. Más bien, la determinación del primer valor de enlace se realiza utilizando el primer reactivo de detección y la determinación del segundo valor de enlace utilizando el segundo reactivo de detección en una muestra

de medición, por ejemplo, en un volumen de medición. La medición de ambos valores de enlace tiene lugar preferentemente de forma simultánea o casi simultánea.

**[0101]** Los procedimientos de medición adecuados son aquellos en los que el primer y segundo reactivo de detección se acoplan a las fases sólidas particuladas. Estas fases sólidas particuladas, a las que está acoplado en cada caso el primer y el segundo reactivo de detección, por ejemplo, se pueden distinguir basándose en diferentes propiedades de fluorescencia, por ejemplo, debido al uso de diferentes colorantes fluorescentes, y se pueden medir juntas, preferentemente al mismo tiempo, por ejemplo, mediante citometría de flujo. Estos ensayos basados en partículas son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como «ensayos multiplex basados en microesferas». La medición mediante multiplexación basada en partículas también puede realizarse utilizando biochips.

**[0102]** Según una variante muy preferida, la determinación del primer valor de enlace y el segundo valor de enlace tiene lugar en diferentes momentos y opcionalmente en diferentes condiciones de medición y/u opcionalmente con diferentes procedimientos de medición, tal como se indicó anteriormente.

**[0103]** Si el primer valor de enlace es inferior al segundo, eso es una prueba de que el material de la muestra contiene leptina mutada. La proporción de leptina mutada es, por tanto, una medida de la proporción de leptina no activa fisiológicamente.

**[0104]** Cuando se usa el primer reactivo de detección, se mide la unión de la leptina no mutada. Cuando se determina el segundo valor de enlace, se mide la unión de la leptina mutada y la de la leptina no mutada utilizando el segundo reactivo de detección. El valor de enlace de la leptina mutada y de la leptina no mutada también se puede denominar valor de enlace de la leptina total, por lo tanto, «leptina total».

**[0105]** Si preferentemente el primer material de muestra líquido y preferentemente el segundo material de muestra líquido obtenido del mismo sujeto no contiene leptina mutada, el primer valor de enlace obtenido con el primer reactivo de detección será idéntico o casi idéntico al segundo valor de enlace obtenido con el segundo reactivo de detección. Se entiende que casi idéntico significa que los valores de los enlaces primero y segundo difieren en preferentemente en hasta menos del 20 %, más preferentemente en hasta menos del 15 %.

**[0106]** Según la invención, el procedimiento que se usa es un ELISA, RIA, FIA, LIA, más preferentemente un ELISA.

**[0107]** Según una variante del procedimiento según la invención, la determinación del primer valor de enlace y el segundo valor de enlace tiene lugar en diferentes muestras de medición, preferentemente en diferentes momentos y opcionalmente con diferentes procedimientos de determinación.

**[0108]** Según otra variante del procedimiento según la invención, la determinación del primer valor de enlace y del segundo valor de enlace se realiza mediante diferentes procedimientos de determinación.

**[0109]** Según otra variante del procedimiento según la invención, existe un cociente Q formado a partir del primer y el segundo valor de enlace:

$$Q = (\text{primer valor de enlace})/(\text{segundo valor de enlace})$$

entre 0,8 y 1,2, preferentemente entre 0,9 y 1,1, o entre 0,3 y 0,7, preferentemente entre 0,4 y 0,6, o inferior a 0,2, preferentemente inferior a 0,1.

**[0110]** Según otra variante del procedimiento según la invención, el primer y/o segundo reactivo de detección comprende en cada caso una combinación de dos o más reactivos de detección, en particular de moléculas de detección.

**[0111]** El procedimiento según la invención es preferentemente adecuado para el diagnóstico in vitro de la obesidad, en el que un cociente Q obtenido del primer y segundo valor de unión:

$$Q = (\text{primer valor de enlace})/(\text{segundo valor de enlace})$$

- 60 - entre 0,8 y 1,2, preferentemente entre 0,9 y 1,1, indica homocigosidad en el gen de la obesidad con respecto a la leptina no mutada;
- entre 0,3 y 0,7, preferentemente entre 0,4 y 0,6, indica heterocigosidad en el gen de la obesidad con respecto a la leptina mutada y no mutada; e
- inferior a 0,2, preferentemente inferior a 0,1 indica homocigosidad con respecto a la leptina mutada.

65

**[0112]** Según otra variante preferida de la invención, un cociente Q formado a partir del primer y el segundo valor de enlace es:

$$5 \quad Q = (\text{primer valor de enlace})/(\text{segundo valor de enlace}) \text{ 0,8 o inferior.}$$

**[0113]** Más preferentemente, el cociente Q es 0,7 o inferior, 0,6 o inferior, 0,5 o inferior, 0,4 o inferior, 0,3 o inferior, 0,2 o inferior, o 0,1 o inferior.

10 **[0114]** Con un valor de 0,1 o inferior o un valor cercano a 0, esto es una indicación de que el paciente es homocigoto para una mutación de la leptina o leptina mutada. Si el cociente se encuentra entre 0,8 y 0,1, más preferentemente entre 0,6 y 0,3, esto es una indicación de que el paciente es heterocigoto con respecto a la mutación de la leptina. En este caso, el paciente secreta leptina no mutada y mutada.

15 **[0115]** El resultado del procedimiento según la invención permite un diagnóstico diferencial de la obesidad.

**[0116]** Si hay una proporción significativa de leptina mutada, esto es para el médico de gran importancia en el contexto de un diagnóstico diferencial. En este caso, aunque el paciente puede tener niveles posiblemente elevados de leptina, que comprenden leptina mutada y no mutada, puede estar indicada la administración de un agente de  
20 sustitución de leptina, por ejemplo, metreleptina, para tratar la obesidad y, si es necesario, otros trastornos fisiológicos.

**[0117]** Si un sujeto, preferentemente un mamífero, por ejemplo, un ser humano, es heterocigoto para la leptina mutada y no mutada, y por tanto, lleva el alelo de leptina no mutado y el alelo de leptina mutado, esto no puede detectarse en la determinación de la leptina total. Sin embargo, la presente invención permite un diagnóstico diferencial  
25 que permite una terapia, particularmente de sujetos heterocigotos, por ejemplo, con metreleptina.

**[0118]** Además, la presente invención permite un diagnóstico rápido in vitro de una enfermedad genética a nivel de proteína con respecto a la leptina mutada. Por lo tanto, si tanto el hombre como la mujer son heterocigotos para la leptina mutada, se puede proporcionar información sobre los riesgos de obesidad potencial de los posibles  
30 descendientes. En el contexto de un diagnóstico prenatal, es posible determinar o confirmar específicamente si existe o no un riesgo de obesidad determinada genéticamente.

**[0119]** La presente invención permite así un diagnóstico diferencial, que permite un nuevo enfoque terapéutico en el caso de pacientes que sintetizan solamente o también leptina mutada.  
35

**[0120]** En función del cociente Q formado a partir del primer valor de enlace y el segundo valor de enlace, también es posible hacer un diagnóstico sobre la cantidad probable de sustancia de reemplazo de leptina que deberá administrarse, por ejemplo, metreleptina.

40 **[0121]** Para pacientes obesos, especialmente niños y adolescentes, la presente invención representa un avance significativo en el diagnóstico, particularmente en el diagnóstico diferencial y la terapia de la obesidad.

**[0122]** En el procedimiento según la invención, se usa como el primer reactivo de detección un receptor de leptina humana que se une a la leptina no mutada, pero no se une a la leptina mutada o se une con un máximo del 50  
45 % del valor de enlace de la leptina no mutada.

**[0123]** En el procedimiento según la invención, se usa como el segundo reactivo de detección un anticuerpo policlonal o monoclonal, en el que el anticuerpo policlonal o monoclonal se une a la leptina mutada y no mutada.

50 **[0124]** Según la invención, se usa como primer reactivo de detección un receptor de leptina humano. Según otra variante de la invención, se usa como primer reactivo de detección un fragmento del receptor de leptina, un receptor de leptina modificado y/o un fragmento del receptor de leptina modificado. Por ejemplo, el primer reactivo de detección puede ser el dominio de unión a leptina del receptor de leptina o una proteína de fusión que contiene el dominio de unión a leptina del receptor de leptina. Los fragmentos y/o modificaciones del receptor de leptina  
55 mencionados anteriormente presentan la funcionalidad de selección entre leptina mutada y no mutada.

**[0125]** Según otra realización preferida del procedimiento según la invención, es preferible que el receptor de leptina comprenda el dominio de unión a leptina del receptor de leptina humano, preferentemente la isoforma A, la isoforma B, la isoforma D.  
60

**[0126]** Según otra variante preferida del procedimiento según la invención, el receptor de leptina es una isoforma soluble y preferentemente presenta los aminoácidos Thr20 a Asp839.

**[0127]** Además, es preferible que la leptina mutada en la secuencia de aminoácidos tenga al menos una de las  
65 siguientes sustituciones de aminoácidos en las posiciones de secuencia D100Y, N103K y/o L72S. Las especificaciones

de la secuencia se refieren a la secuencia de leptina, incluido el péptido señal.

**[0128]** Según otra realización preferida de la invención, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos R105W, G133V, S141C y/o L161G.

5

**[0129]** Según la invención, la leptina mutada presenta en la secuencia de aminoácidos al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: D100Y, N103K, L72S, R105W, G133V, S141C y/o L161G.

**[0130]** Según otra realización preferida de la invención, la leptina mutada presenta al menos una sustitución de aminoácidos D100Y en la secuencia de aminoácidos.

10

**[0131]** Según la invención, el procedimiento es un procedimiento inmunológico, es decir, un ELISA, RIA, FIA o LIA.

**[0132]** Las explicaciones dadas anteriormente con respecto a la combinación de los reactivos de detección se aplican de forma correspondiente al procedimiento según la invención.

15

**[0133]** La presente invención se refiere además al uso del receptor de leptina humano según la reivindicación 10, que se une a la leptina no mutada con un primer valor de enlace pero no se une a la leptina mutada o se une con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada en el diagnóstico de la obesidad.

20

**[0134]** Preferentemente, se usa el receptor de leptina humano en el diagnóstico diferencial de la obesidad.

**[0135]** Según otra realización preferida del uso según la invención, el receptor de leptina humano, también denominado primer reactivo de detección, se usa junto con un segundo reactivo de detección. El segundo reactivo de detección se une a la leptina mutada y no mutada con un segundo valor de enlace.

25

**[0136]** Según una variante preferida del uso según la invención, el segundo reactivo de detección es un anticuerpo policlonal o monoclonal, en el que el anticuerpo policlonal o monoclonal se une tanto a la leptina mutada como a la leptina no mutada.

30

**[0137]** Según la invención, se prefiere además que el receptor de leptina humano usado como el primer reactivo de detección comprenda el dominio de unión a leptina del receptor de leptina humano, preferentemente de la isoforma A, isoforma B, isoforma D.

35

**[0138]** Según otra variante del uso según la invención, el receptor de leptina que se usa como primer reactivo de detección es una isoforma soluble y preferentemente presenta los aminoácidos Thr20 a Asp839 de la isoforma B.

**[0139]** Además, es preferible que la leptina mutada en la secuencia de aminoácidos tenga al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en las posiciones de secuencia D100Y, N103K y/o L72S, en LA que la numeración de secuencia se refiere a la secuencia de aminoácidos que incluye péptidos señal.

40

**[0140]** Según una variante preferida del uso según la invención, la leptina mutada presenta una sustitución de aminoácidos D100Y en la secuencia de la leptina natural.

45

**[0141]** Según una variante preferida del uso según la invención, la leptina mutada presenta una sustitución de aminoácidos N103K en la secuencia de la leptina natural.

**[0142]** Según una variante preferida del uso según la invención, la leptina mutada presenta una sustitución de aminoácidos L72S en la secuencia de la leptina natural.

50

**[0143]** Preferentemente el procedimiento es un procedimiento inmunológico, más preferentemente un ELISA, RIA, FIA o LIA.

**[0144]** Las explicaciones dadas para la combinación de reactivos de detección antes mencionada o para el procedimiento según la invención se aplican en consecuencia para el uso según la invención.

55

**[0145]** La presente invención se refiere según una realización preferida al uso del receptor de leptina humano según la reivindicación 10, que se une a la leptina no mutada con un primer valor de enlace, pero no se une a la leptina mutada o se une con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada en el diagnóstico de la obesidad.

60

**[0146]** La presente invención se refiere según otra realización preferida al uso según la invención en la determinación in vitro de homocigosidad o heterocigosidad con respecto al gen de la obesidad de un mamífero, preferentemente un ser humano, que codifica para leptina mutada y/o leptina no mutada.

65

**[0147]** El uso según la invención permite, por tanto, en particular con materiales de prueba aislados de manera sorprendente un diagnóstico diferencial de la obesidad muy fiable, particularmente con respecto a la homocigosidad y heterocigosidad en el caso del gen de la obesidad que codifica para leptina o leptina mutada, a nivel de proteína, en particular con un sistema de ensayo inmunológico o un procedimiento de ensayo inmunológico. Los procedimientos de ensayos inmunológicos pueden estar diseñados como ensayos rápidos. En particular, el uso según la invención permite una realización sencilla de cribados en masa. Si se desea, se pueden realizar análisis genéticos complejos para confirmar las muestras conspicuas.

**[0148]** Las siguientes figuras y ejemplos sirven para ilustrar la invención, pero sin limitar la invención.

## Figuras

### [0149]

La **figura 1a** muestra la secuencia del precursor de la leptina humana que comprende la leptina madura (aminoácidos 22-167) así como el péptido señal N-terminal (aminoácidos 1-21).

La **figura 1b** muestra la secuencia del precursor de la leptina humana de una leptina mutada que contiene en la posición 100 de los aminoácidos una sustitución de ácido aspártico (D) por tirosina (Y).

La **figura 1c** muestra la secuencia del precursor de la leptina humana de una leptina mutada que contiene en la posición 103 de los aminoácidos una sustitución de asparagina (N) contra lisina (K).

La **figura 1d** muestra la secuencia del precursor de la leptina humana de una leptina mutada que contiene en la posición 72 de los aminoácidos una sustitución de leucina (L) contra serina (S).

La **figura 2a** muestra la secuencia del receptor de leptina humano de la isoforma A.

La **figura 2b** muestra la secuencia del receptor de leptina humano de la isoforma B.

La **figura 2c** muestra la secuencia del receptor de leptina humano de la isoforma C.

La **figura 2d** muestra la secuencia del receptor de leptina humano de la isoforma D.

La **figura 2e** muestra la secuencia del receptor de leptina humano de la isoforma E.

La **figura 2f** muestra el fragmento de Thr20 a Asp839 de la secuencia del receptor de leptina humano de la isoforma B.

## Ejemplos

### Ejemplo 1a: Detección in vitro de leptina total

**[0150]** Se usaron placas de microtitulación de poliestireno disponibles comercialmente para preparar un ELISA de leptina total (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE - Tipo C8, Fondo plano, N.º 705071).

**[0151]** Adherido a estas placas de microtitulación de poliestireno como una fase sólida, se encontraba un anticuerpo primario contra leptina humana IgG1 monoclonal de ratón disponible comercialmente a una concentración de 2 mg/mL en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4.

**[0152]** Las placas se incubaron durante la noche en una cámara humidificada (2 °C a 8 °C). A continuación, la solución de anticuerpo se aspiró, y los sitios de unión no saturados en la superficie de poliestireno se saturaron con albúmina de suero bovino (BSA) en solución al 1 % en PBS durante 4 horas a pH 7,4. La solución se aspiró y las placas se usaron directamente o se secaron hasta que se usaron.

**[0153]** Las mediciones se realizaron por duplicado. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C).

1. Se pusieron 100 µl de tampón de dilución (tampón PBS 50 mM, pH 7,4 con BSA al 0,5 % y detergente Tween-20 al 0,05 %) en todos los pocillos requeridos de las placas de microtitulación.

2. En los primeros 2 pocillos, se pipetearon 20 µl de tampón de dilución (blanco). Después de esto, se agregaron 20 µl de leptina estándar o 20 µl de la muestra a medir.

3. Los pocillos de la placa se cubrieron con una película adhesiva y se agitaron durante 1 hora a 200 a 350 rpm.

4. Después del período de incubación, las soluciones se filtraron por succión y la placa se lavó cinco veces con 300 µl de tampón de lavado WP (tampón PBS 50 mM, pH 7,4 con BSA al 0,5 %)/pocillo. El tampón de lavado permaneció en los pocillos durante unos 15 segundos antes de la aspiración.
- 5
5. Después de la etapa de lavado final, se pipetearon en cada pocillo 100 µl de un conjugado de peroxidasa de rábano picante (POD) de un anticuerpo IgG1 anti-ratón en cada pocillo y se agitó el lote durante 30 minutos a 200-350 rpm.
6. Después de completar esta incubación, la placa se lavó 5 veces tal como se describe en la etapa 4).
- 10
7. Se pipetearon 100 µl de la solución de sustrato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tetrametilbenzidina estabilizada en cada pocillo.
8. La placa se incubó durante 15 minutos en la oscuridad, ya que el sustrato es fotosensible.
- 15
9. Después de completar la incubación, se pipetearon en cada pocillo 100 µl de ácido sulfúrico 0,1 M.
10. La medición de la reacción de color se llevó a cabo en un plazo de 30 minutos en un fotómetro para placas de microtitulación («lector ELISA») a 450 nm (filtro de referencia ≥590 nm).
- 20 **[0154]** Las muestras que alcanzaron absorbancias más altas que el estándar de concentración más alta estaban fuera de la curva estándar. Para una determinación segura, estas muestras se midieron nuevamente en un segundo procedimiento de ensayo a una dilución mayor.
- [0155]** Como estándares del ELISA, se utilizó leptina recombinante (Mediagnost, Reutlingen, DE) en
- 25 concentraciones de 1, 10, 25, 50 y 100 ng/ml.
- [0156]** A partir de los valores medios de la densidad óptica (DO) de las concentraciones estándar y las muestras, se resta la DO media del blanco.
- 30 **[0157]** Las concentraciones estándar (eje x) se representaron frente a la densidad óptica medida (eje y) y se generó una curva estándar.
- [0158]** La curva estándar proporciona la concentración de leptina de los controles o muestras.
- 35 **Ejemplo 1b: Detección in vitro de leptina funcional**
- [0159]** Para la detección de leptina funcional, se varió el diseño del ensayo de tal manera que se uniera a las placas de microtitulación de poliestireno como fase sólida un receptor de leptina que se unía a la leptina no mutada, pero no a la leptina mutada o se unía con máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada.
- 40 **[0160]** El receptor de leptina utilizado fue una molécula producida de forma recombinante disponible comercialmente con la secuencia de aminoácidos Thr20-Asp839 del receptor de leptina humano (Recombinant Human Leptin R Fc Chimera, Catalog Number 389-LR/CF, R & D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.).
- 45 **[0161]** El receptor de leptina se adsorbió en placas de microtitulación de poliestireno a pH 9,6 durante la noche en una cámara húmeda en un ambiente refrigerado (2 °C a 8 °C) en una concentración de 1,5 mg/mL en tampón de carbonato de sodio 10 mM.
- [0162]** A continuación, la solución de revestimiento se aspiró y los sitios de unión no saturados en la superficie
- 50 de poliestireno se saturaron con albúmina de suero bovino en solución al 1 % en PBS durante 4 horas a pH 7,4.
- [0163]** La solución se aspiró y las placas se usaron directamente o se almacenaron secas hasta su uso. Las mediciones se realizaron por duplicado. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (25 °C).
- 55 **[0164]** Las muestras o controles a medir se diluyeron 1:10 con tampón de dilución (tampón PBS 50 mM pH 7,4 con BSA al 0,5 % y detergente Tween-20 al 0,05 %).
1. Se pipetearon 100 µl de solución estándar o 100 µl de muestra de control prediluida en todos los pocillos requeridos de las placas de microtitulación.
- 60
2. Los pocillos de la placa se cubrieron con una película adhesiva y se agitaron durante 2 horas a 350 rpm.
3. Después del período de incubación, las soluciones se aspiraron y la placa se lavó tres veces con 300 µl de tampón de lavado WP/pocillo. El tampón de lavado permaneció en los pocillos durante unos 15 segundos antes de la
- 65 aspiración.

4. Después de la etapa de lavado final, se pipetearon 100 µl de un conjugado de biotina de un anticuerpo policlonal de conejo contra leptina humana disponible comercialmente en cada pocillo y la preparación se agitó durante 30 minutos a 350 rpm.
- 5  
5. Después de completar esta incubación, la placa se lavó tres veces tal como se describe en la etapa 3.
6. Después de la última etapa de lavado, se pipetea por ejemplo 100 µl de un conjugado de estreptavina-peroxidasa de rábano picante en cada pocillo y agita la reacción a 350 rpm durante 30 minutos. Después de completar esta  
10 incubación, la placa se lavó 3 veces tal como se describe en la etapa 3).
7. Se pipetearon 100 µl de la solución de sustrato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tetrametilbenzidina estabilizada en cada pocillo.
8. La placa se incubó durante 15 minutos en la oscuridad a 20 °C-25 °C, ya que el sustrato es fotosensible.
- 15  
9. Después de completar la incubación, se pipetearon en cada pocillo 100 µl de ácido sulfúrico 0,1 M.
10. La medición de la reacción de color se llevó a cabo en un plazo de 30 minutos en un fotómetro para placas de microtitulación («lector ELISA») a 450 nm (filtro de referencia ≥590 nm).
- 20  
**[0165]** Las muestras que alcanzaron absorbancias más altas que el estándar de concentración más alta estaban fuera de la curva estándar. Para una determinación segura, estas muestras se midieron nuevamente en un segundo procedimiento de ensayo a una dilución mayor.
- 25  
**[0166]** Como estándares de ELISA, se utilizó leptina recombinante (Mediagnost, Reutlingen, DE) a concentraciones de 0, 0,2, 1, 2,5, 5, 7,5 y 10 ng/mL.
- [0167]** A partir de los valores medios de la densidad óptica (DO) de las concentraciones estándar y las muestras, se resta la DO media del blanco.
- 30  
**[0168]** Las concentraciones estándar (eje x) se representaron frente a la densidad óptica medida (eje y) y se generó una curva estándar.
- [0169]** A partir de la curva estándar, se obtiene la concentración de leptina de los controles o muestras diluidas,  
35 y después de la multiplicación por el factor de dilución, se obtiene la concentración de leptina de los controles o muestras no diluidas.
- [0170]** La leptina funcional no mutada se midió en este ensayo a una concentración equivalente a la medida en el ELISA de leptina para la leptina total.
- 40  
**Ejemplo 1c: Análisis**
- [0171]** Se usó ADNc de leptina humana (secuencia de referencia NCBI: NM\_000230.2) para generar mutaciones puntuales mediante mutagénesis dirigida al sitio.
- 45  
**[0172]** El kit de mutagénesis dirigida al sitio Q5® de la empresa New England Biolabs GmbH (Fráncfort del Meno, DE) se utilizó conforme a las instrucciones del fabricante.
- [0173]** Las células HEK293 se transfectaron de manera transitoria con leptina humana (pcDNA3.1 + -leptin\_wt) o leptina mutada (pcDNA3.1 + - leptin\_D100Y o pcDNA3.1 + -leptin\_N103K) tal como se describe en Sambrook y col. (Molecular cloning: a laboratory handbook, 2ª edición, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, EE. UU.)
- 50  
**[0174]** 48 horas después de la transfección, se lisaron las células respectivas y se usaron 100 ml de los sobrenadantes como muestras 1 a 3 en los ensayos ELISA descritos en el Ejemplo 1a y el Ejemplo 1b.
- 55  
**[0175]** Además, se usaron muestras de suero de 5 donantes de sangre, así como leptina humana recombinante purificada, así como leptina humana recombinante purificada con la mutación D100Y.
- 60  
**[0176]** Los resultados de medición de varias muestras con los ensayos descritos en el Ejemplo 1a y el Ejemplo 1b se muestran en la tabla 1:

**Tabla 1: Comparación de valores medidos de leptina total versus leptina funcional**

| Muestra | HEK 293 con expresión transitoria | Valores medidos de leptina funcional | Valores medidos de leptina total |
|---------|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
|---------|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|

| N.º  | Sobrenadantes de cultivos celulares                              | Leptina      | Leptina     |
|--|--|--------------|-------------|
| 1  | Leptina no mutada  | 490,2 ng/mL  | 577,7 ng/mL |
| 2  | Leptina mutación D100Y   | < 0,5 ng/mL  | 193,1 ng/mL |
| 3  | Leptina mutación N103K<br><b>Leptina recombinante purificada</b> | < 0,35 ng/mL | 37,1 ng/mL  |
| 4  | Leptina no mutada  | 277,7 µg/mL  | 335,2 µg/mL |
| 5  | Leptina mutación D100Y   | 108 ng/mL    | 8,03 µg/mL  |
| <b>Estándar internacional de la OMS para la leptina humana OMS IS NIBSC 97/594</b> |  |              |             |
| 6  | nominal 2 ng/mL:   | 1,83 ng/mL   | 1,84 ng/mL  |
| 7  | nominal 6 ng/mL:   | 6,05 ng/mL   | 6,1 ng/mL   |
| <b>Muestras de suero/plasma Donantes de sangre</b>                                 |  |              |             |
| 8  | <b>CS-2</b>  | 2,81 ng/mL   | 2,46 ng/mL  |
| 9  | <b>DO-2226</b>   | 4,61 ng/mL   | 5,05 ng/mL  |
| 10   | IDB-883-   | 7,25 ng/mL   | 8,31 ng/mL  |
| 11   | <b>IDB-8960</b>  | 23,96 ng/mL  | 25,05 ng/mL |
| 12   | <b>BB-3935</b>   | 34,12 ng/mL  | 34,84 ng/mL |

**[0177]** En la tabla 1 se puede ver que es posible hacer una distinción entre la leptina mutada y la leptina no mutada con la combinación según la invención o el procedimiento según la invención.

5 La muestra N.º 1 contiene solo leptina no mutada. El cociente de la concentración de leptina no mutada (leptina funcional) y leptina total es de aproximadamente 0,85 (490,2/577,7).

10 La muestra N.º 2 solo contiene leptina mutada con la mutación D100Y. El cociente de la concentración de leptina no mutada (leptina funcional) y leptina total es <0,01 (0,5/193,1).

La muestra N.º 3 solo contiene leptina mutada con la mutación N130K. El cociente de la concentración de leptina no mutada (leptina funcional) y leptina total es <0,01 (0,35/37,1).

15 Las muestras N.º 4 y 5 contienen leptina humana en una concentración de 2 ng/ml y 6 ng/ml, respectivamente, según el estándar de la OMS. El cociente de la concentración de leptina no mutada (leptina funcional) y leptina total es 0,99 (1,83/1,84) y 0,99 (6,05/6,1), respectivamente.

20 Las muestras N.º 8 a 12 son muestras de suero/plasma de donantes de sangre sanos. El cociente de la concentración de leptina no mutada (leptina funcional) y leptina total es 1,14 (2,81/2,46), 0,91 (4,61/5,05), 0,87 (7,25/8,31), 0,96 (23,96/25,05) y 0,98 (34,12/34,84), respectivamente.

## Ejemplo 2

25 **[0178]** En un lactante adiposo (no se muestra en la tabla 1), se determinó una concentración de leptina total de 30,1 ng/ml y una concentración de leptina no mutada (leptina funcional) de 0,3 ng/ml en muestras de suero/plasma. El cociente de la concentración de leptina no mutada (leptina funcional) y leptina total es, por lo tanto, 0,01 (0,3/30,1).

**[0179]** A continuación, se determinó la concentración en el plasma/suero sanguíneo de leptina no mutada (leptina funcional) o leptina total en el padre y la madre:

30 En las muestras de suero/plasma del padre se determinó una concentración de leptina total de 2,3 ng/ml y una concentración de leptina no mutada (leptina funcional) de 1,2 ng/ml. El cociente de la concentración de leptina no mutada (leptina funcional) y leptina total es, por lo tanto, 0,52 (1,2/2,3).

35 **[0180]** En las muestras de suero/plasma de la madre, se determinó una concentración de leptina total de 11,4 ng/ml y una concentración de leptina no mutada (leptina funcional) de 4,8 ng/ml. El cociente de la concentración de leptina no mutada (leptina funcional) y leptina total es, por lo tanto, 0,42 (4,8/11,4).

40 **[0181]** A partir de los valores de concentración medidos de leptina no mutada y leptina total o los cocientes calculados a partir de ellos, se puede observar inmediatamente que el padre y la madre son heterocigotos con respecto a la leptina mutada o la leptina no mutada, respectivamente.

**[0182]** Sin embargo, el hijo del padre y de la madre es homocigoto para la leptina mutada.

45 **[0183]** La leptina mutada del padre, de la madre y del niño fue leptina con una mutación D100Y.

**[0184]** La combinación según la invención y/o el procedimiento la invención, por lo tanto, permiten de manera sorprendente un diagnóstico diferencial de la obesidad muy fiable, particularmente con respecto a la homocigosidad y heterocigosidad en el caso del gen de la obesidad que codifica para leptina o leptina mutada, a nivel de proteína, en particular con un sistema de ensayo inmunológico o un procedimiento de ensayo inmunológico. Los procedimientos de ensayos inmunológicos pueden estar diseñados como ensayos rápidos. En particular, el procedimiento según la invención es generalmente más rápido que los análisis genéticos, también en el contexto de un cribado en masa.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 **[0185]**

<110> Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

15 <120> Combinación de reactivos de detección, procedimiento in vitro para la detección de leptina mutada y el uso de un reactivo de detección

<130> E/53284WO/AW/kn

20 <160> 10

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 167

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FUENTE

30 <222> 1..167

<223> /mol\_tipo="proteína" /nota="Precursor de la leptina" /organismo="Homo sapiens"

<400> 1

```

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

```

35

<210> 2

<211> 167

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<220>

ES 2 742 133 T3

<221> FUENTE  
 <222> 1..167  
 <223> /mol\_tipo="proteína" /nota="Precursor de la leptina variante D100Y" /organismo="Homo sapiens"

5 <400> 2

```

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

10 <210> 3  
 <211> 167  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..167  
 <223> /mol\_type="protein" /note="Precursor de la leptina variante N103K" /organism="Homo sapiens"

20 <400> 3

ES 2 742 133 T3

```

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

```

<210> 4 <211> 167

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..167

10 <223> /mol\_type="protein" /note="Precursor de la leptina variante L72S" /organism="Homo sapiens"

<400> 4

```

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

```

15

<210> 5

<211> 896

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 742 133 T3

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..896

5 <223> /mol\_tipo="proteína" /nota="Receptor de leptina isoforma A" /organismo="Homo sapiens"

<400> 5

```

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

```

ES 2 742 133 T3

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro  
 165 170 175  
 Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu  
 180 185 190  
 Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr  
 195 200 205  
 Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser  
 210 215 220  
 Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser  
 245 250 255  
 Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys  
 260 265 270  
 Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val  
 275 280 285  
 Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr  
 290 295 300  
 Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe  
 325 330 335  
 Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys  
 340 345 350  
 Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp  
 355 360 365  
 Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val  
 370 375 380  
 Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys  
 385 390 395 400  
 Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His  
 405 410 415  
 Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile  
 420 425 430  
 Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg  
 435 440 445  
 Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu  
 450 455 460  
 Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His  
 465 470 475 480  
 Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr  
 485 490 495  
 Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp  
 500 505 510  
 Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Thr Cys  
 515 520 525  
 Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys  
 530 535 540  
 Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys  
 545 550 555 560  
 Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu  
 565 570 575  
 Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys  
 580 585 590  
 Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala  
 595 600 605  
 Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn  
 610 615 620  
 Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met  
 625 630 635 640  
 Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys

ES 2 742 133 T3

```

        645                650                655
Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser
        660                665                670
Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn
        675                680                685
Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu
        690                695                700
Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile
705                710                715                720
Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser
        725                730                735
Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser
        740                745                750
Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met
        755                760                765
Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys
        770                775                780
Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His
785                790                795                800
Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met
        805                810                815
Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp
        820                825                830
Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val
        835                840                845
Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His
        850                855                860
Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
865                870                875                880
Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg Thr Asp Ile Leu
        885                890                895

```

<210> 6  
 <211> 1165  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> FUENTE  
 10 <222> 1..1165  
 <223> /mol\_tipo="proteína" /nota="Receptor de leptina isoforma B" /organismo="Homo sapiens"

<400> 6

ES 2 742 133 T3

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

ES 2 742 133 T3

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro  
 165 170 175  
 Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu  
 180 185 190  
 Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr  
 195 200 205  
 Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser  
 210 215 220  
 Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser  
 245 250 255  
 Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys  
 260 265 270  
 Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val  
 275 280 285  
 Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr  
 290 295 300  
 Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe  
 325 330 335  
 Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys  
 340 345 350  
 Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp  
 355 360 365  
 Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val  
 370 375 380  
 Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys  
 385 390 395 400  
 Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His  
 405 410 415  
 Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile  
 420 425 430  
 Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg  
 435 440 445  
 Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu  
 450 455 460  
 Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His  
 465 470 475 480  
 Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr  
 485 490 495  
 Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp  
 500 505 510  
 Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys  
 515 520 525  
 Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys  
 530 535 540  
 Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys  
 545 550 555 560  
 Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu  
 565 570 575  
 Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys  
 580 585 590  
 Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala  
 595 600 605  
 Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn  
 610 615 620  
 Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met  
 625 630 635 640  
 Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys

ES 2 742 133 T3

|     |      |      |      |     |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      |
|-----|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|
|     |      |      |      | 645 |      |      |      |      |      | 650  |      |      |     | 655  |      |
| Glu | Lys  | Asn  | Val  | Thr | Leu  | Leu  | Trp  | Lys  | Pro  | Leu  | Met  | Lys  | Asn | Asp  | Ser  |
|     |      |      | 660  |     |      |      |      | 665  |      |      |      |      | 670 |      |      |
| Leu | Cys  | Ser  | Val  | Gln | Arg  | Tyr  | Val  | Ile  | Asn  | His  | His  | Thr  | Ser | Cys  | Asn  |
|     |      | 675  |      |     |      |      | 680  |      |      |      |      | 685  |     |      |      |
| Gly | Thr  | Trp  | Ser  | Glu | Asp  | Val  | Gly  | Asn  | His  | Thr  | Lys  | Phe  | Thr | Phe  | Leu  |
|     | 690  |      |      |     |      | 695  |      |      |      |      | 700  |      |     |      |      |
| Trp | Thr  | Glu  | Gln  | Ala | His  | Thr  | Val  | Thr  | Val  | Leu  | Ala  | Ile  | Asn | Ser  | Ile  |
|     | 705  |      |      |     | 710  |      |      |      |      | 715  |      |      |     |      | 720  |
| Gly | Ala  | Ser  | Val  | Ala | Asn  | Phe  | Asn  | Leu  | Thr  | Phe  | Ser  | Trp  | Pro | Met  | Ser  |
|     |      |      | 725  |     |      |      |      |      |      | 730  |      |      |     | 735  |      |
| Lys | Val  | Asn  | Ile  | Val | Gln  | Ser  | Leu  | Ser  | Ala  | Tyr  | Pro  | Leu  | Asn | Ser  | Ser  |
|     |      | 740  |      |     |      |      |      | 745  |      |      |      |      | 750 |      |      |
| Cys | Val  | Ile  | Val  | Ser | Trp  | Ile  | Leu  | Ser  | Pro  | Ser  | Asp  | Tyr  | Lys | Leu  | Met  |
|     | 755  |      |      |     |      |      | 760  |      |      |      |      | 765  |     |      |      |
| Tyr | Phe  | Ile  | Ile  | Glu | Trp  | Lys  | Asn  | Leu  | Asn  | Glu  | Asp  | Gly  | Glu | Ile  | Lys  |
|     | 770  |      |      |     |      | 775  |      |      |      |      | 780  |      |     |      |      |
| Trp | Leu  | Arg  | Ile  | Ser | Ser  | Ser  | Val  | Lys  | Lys  | Tyr  | Tyr  | Ile  | His | Asp  | His  |
|     | 785  |      |      |     | 790  |      |      |      |      | 795  |      |      |     |      | 800  |
| Phe | Ile  | Pro  | Ile  | Glu | Lys  | Tyr  | Gln  | Phe  | Ser  | Leu  | Tyr  | Pro  | Ile | Phe  | Met  |
|     |      |      | 805  |     |      |      |      |      | 810  |      |      |      |     | 815  |      |
| Glu | Gly  | Val  | Gly  | Lys | Pro  | Lys  | Ile  | Ile  | Asn  | Ser  | Phe  | Thr  | Gln | Asp  | Asp  |
|     |      |      | 820  |     |      |      |      |      | 825  |      |      |      |     | 830  |      |
| Ile | Glu  | Lys  | His  | Gln | Ser  | Asp  | Ala  | Gly  | Leu  | Tyr  | Val  | Ile  | Val | Pro  | Val  |
|     | 835  |      |      |     |      |      | 840  |      |      |      |      | 845  |     |      |      |
| Ile | Ile  | Ser  | Ser  | Ser | Ile  | Leu  | Leu  | Leu  | Gly  | Thr  | Leu  | Leu  | Ile | Ser  | His  |
|     | 850  |      |      |     |      | 855  |      |      |      |      | 860  |      |     |      |      |
| Gln | Arg  | Met  | Lys  | Lys | Leu  | Phe  | Trp  | Glu  | Asp  | Val  | Pro  | Asn  | Pro | Lys  | Asn  |
|     | 865  |      |      |     | 870  |      |      |      | 875  |      |      |      |     |      | 880  |
| Cys | Ser  | Trp  | Ala  | Gln | Gly  | Leu  | Asn  | Phe  | Gln  | Lys  | Pro  | Glu  | Thr | Phe  | Glu  |
|     |      |      | 885  |     |      |      |      |      | 890  |      |      |      |     | 895  |      |
| His | Leu  | Phe  | Ile  | Lys | His  | Thr  | Ala  | Ser  | Val  | Thr  | Cys  | Gly  | Pro | Leu  | Leu  |
|     |      | 900  |      |     |      |      |      | 905  |      |      |      |      | 910 |      |      |
| Leu | Glu  | Pro  | Glu  | Thr | Ile  | Ser  | Glu  | Asp  | Ile  | Ser  | Val  | Asp  | Thr | Ser  | Trp  |
|     | 915  |      |      |     |      |      | 920  |      |      |      |      | 925  |     |      |      |
| Lys | Asn  | Lys  | Asp  | Glu | Met  | Met  | Pro  | Thr  | Thr  | Val  | Val  | Ser  | Leu | Leu  | Ser  |
|     | 930  |      |      |     |      | 935  |      |      |      |      | 940  |      |     |      |      |
| Thr | Thr  | Asp  | Leu  | Glu | Lys  | Gly  | Ser  | Val  | Cys  | Ile  | Ser  | Asp  | Gln | Phe  | Asn  |
|     | 945  |      |      |     |      | 950  |      |      |      | 955  |      |      |     |      | 960  |
| Ser | Val  | Asn  | Phe  | Ser | Glu  | Ala  | Glu  | Gly  | Thr  | Glu  | Val  | Thr  | Tyr | Glu  | Asp  |
|     |      |      | 965  |     |      |      |      |      | 970  |      |      |      |     | 975  |      |
| Glu | Ser  | Gln  | Arg  | Gln | Pro  | Phe  | Val  | Lys  | Tyr  | Ala  | Thr  | Leu  | Ile | Ser  | Asn  |
|     |      | 980  |      |     |      |      |      | 985  |      |      |      |      |     | 990  |      |
| Ser | Lys  | Pro  | Ser  | Glu | Thr  | Gly  | Glu  | Gln  | Gly  | Leu  | Ile  | Asn  | Ser | Ser  |      |
|     | 995  |      |      |     |      | 1000 |      |      |      |      | 1005 |      |     |      |      |
| Val | Thr  | Lys  | Cys  | Phe | Ser  | Ser  | Lys  | Asn  | Ser  | Pro  | Leu  | Lys  | Asp | Ser  | Phe  |
|     | 1010 |      |      |     |      | 1015 |      |      |      |      | 1020 |      |     |      |      |
| Ser | Asn  | Ser  | Ser  | Trp | Glu  | Ile  | Glu  | Ala  | Gln  | Ala  | Phe  | Phe  | Ile | Leu  | Ser  |
|     | 1025 |      |      |     | 1030 |      |      |      |      | 1035 |      |      |     |      | 1040 |
| Asp | Gln  | His  | Pro  | Asn | Ile  | Ile  | Ser  | Pro  | His  | Leu  | Thr  | Phe  | Ser | Glu  | Gly  |
|     |      |      | 1045 |     |      |      |      |      | 1050 |      |      |      |     | 1055 |      |
| Leu | Asp  | Glu  | Leu  | Lys | Leu  | Glu  | Gly  | Asn  | Phe  | Pro  | Glu  | Glu  | Asn | Asn  |      |
|     |      | 1060 |      |     |      |      | 1065 |      |      |      |      | 1070 |     |      |      |
| Asp | Lys  | Lys  | Ser  | Ile | Tyr  | Tyr  | Leu  | Gly  | Val  | Thr  | Ser  | Ile  | Lys | Lys  | Arg  |
|     | 1075 |      |      |     |      | 1080 |      |      |      |      |      | 1085 |     |      |      |
| Glu | Ser  | Gly  | Val  | Leu | Leu  | Thr  | Asp  | Lys  | Ser  | Arg  | Val  | Ser  | Cys | Pro  | Phe  |
|     | 1090 |      |      |     |      | 1095 |      |      |      |      | 1100 |      |     |      |      |
| Pro | Ala  | Pro  | Cys  | Leu | Phe  | Thr  | Asp  | Ile  | Arg  | Val  | Leu  | Gln  | Asp | Ser  | Cys  |
|     | 1105 |      |      |     | 1110 |      |      |      |      | 1115 |      |      |     |      | 1120 |
| Ser | His  | Phe  | Val  | Glu | Asn  | Asn  | Ile  | Asn  | Leu  | Gly  | Thr  | Ser  | Ser | Lys  | Lys  |
|     |      |      | 1125 |     |      |      |      |      | 1130 |      |      |      |     | 1135 |      |
| Thr | Phe  | Ala  | Ser  | Tyr | Met  | Pro  | Gln  | Phe  | Gln  | Thr  | Cys  | Ser  | Thr | Gln  | Thr  |
|     |      |      | 1140 |     |      |      |      | 1145 |      |      |      |      |     | 1150 |      |

ES 2 742 133 T3

His Lys Ile Met Glu Asn Lys Met Cys Asp Leu Thr Val  
1155 1160 1165

<210> 7  
<211> 958  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<221> FUENTE  
10 <222> 1..958  
<223> /mol\_tipo="proteína" /nota="Receptor de leptina isoforma C" /organismo="Homo sapiens"  
  
<400> 7

ES 2 742 133 T3

Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile  
1 5 10 15  
Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg  
20 25 30  
Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu  
35 40 45  
Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr  
50 55 60  
Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser  
65 70 75 80  
Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp  
85 90 95  
Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val  
100 105 110  
Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn  
115 120 125  
Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val  
130 135 140  
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His  
145 150 155 160  
Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro  
165 170 175  
Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu  
180 185 190  
Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr  
195 200 205  
Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser  
210 215 220  
Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro  
225 230 235 240  
Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser  
245 250 255  
Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys  
260 265 270  
Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val  
275 280 285  
Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr  
290 295 300  
Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser  
305 310 315 320  
Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe  
325 330 335  
Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys  
340 345 350  
Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp  
355 360 365  
Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val

ES 2 742 133 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 370 |     |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |
| Ser | Asp | His | Val | Ser | Lys | Val | Thr | Phe | Phe | Asn | Leu | Asn | Glu | Thr | Lys |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Pro | Arg | Gly | Lys | Phe | Thr | Tyr | Asp | Ala | Val | Tyr | Cys | Cys | Asn | Glu | His |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |
| Glu | Cys | His | His | Arg | Tyr | Ala | Glu | Leu | Tyr | Val | Ile | Asp | Val | Asn | Ile |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |
| Asn | Ile | Ser | Cys | Glu | Thr | Asp | Gly | Tyr | Leu | Thr | Lys | Met | Thr | Cys | Arg |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Trp | Ser | Thr | Ser | Thr | Ile | Gln | Ser | Leu | Ala | Glu | Ser | Thr | Leu | Gln | Leu |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     | 460 |     |     |     |
| Arg | Tyr | His | Arg | Ser | Ser | Leu | Tyr | Cys | Ser | Asp | Ile | Pro | Ser | Ile | His |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Pro | Ile | Ser | Glu | Pro | Lys | Asp | Cys | Tyr | Leu | Gln | Ser | Asp | Gly | Phe | Tyr |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |
| Glu | Cys | Ile | Phe | Gln | Pro | Ile | Phe | Leu | Leu | Ser | Gly | Tyr | Thr | Met | Trp |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     |     | 510 |     |
| Ile | Arg | Ile | Asn | His | Ser | Leu | Gly | Ser | Leu | Asp | Ser | Pro | Pro | Thr | Cys |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Val | Leu | Pro | Asp | Ser | Val | Val | Lys | Pro | Leu | Pro | Pro | Ser | Ser | Val | Lys |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Ala | Glu | Ile | Thr | Ile | Asn | Ile | Gly | Leu | Leu | Lys | Ile | Ser | Trp | Glu | Lys |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Pro | Val | Phe | Pro | Glu | Asn | Asn | Leu | Gln | Phe | Gln | Ile | Arg | Tyr | Gly | Leu |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     |     | 570 |     |     |     | 575 |     |
| Ser | Gly | Lys | Glu | Val | Gln | Trp | Lys | Met | Tyr | Glu | Val | Tyr | Asp | Ala | Lys |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     |     | 585 |     |     |     | 590 |     |     |
| Ser | Lys | Ser | Val | Ser | Leu | Pro | Val | Pro | Asp | Leu | Cys | Ala | Val | Tyr | Ala |
|     | 595 |     |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Val | Gln | Val | Arg | Cys | Lys | Arg | Leu | Asp | Gly | Leu | Gly | Tyr | Trp | Ser | Asn |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Trp | Ser | Asn | Pro | Ala | Tyr | Thr | Val | Val | Met | Asp | Ile | Lys | Val | Pro | Met |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Arg | Gly | Pro | Glu | Phe | Trp | Arg | Ile | Ile | Asn | Gly | Asp | Thr | Met | Lys | Lys |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     | 655 |     |
| Glu | Lys | Asn | Val | Thr | Leu | Leu | Trp | Lys | Pro | Leu | Met | Lys | Asn | Asp | Ser |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     |     | 665 |     |     |     | 670 |     |     |
| Leu | Cys | Ser | Val | Gln | Arg | Tyr | Val | Ile | Asn | His | His | Thr | Ser | Cys | Asn |
|     | 675 |     |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Gly | Thr | Trp | Ser | Glu | Asp | Val | Gly | Asn | His | Thr | Lys | Phe | Thr | Phe | Leu |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Trp | Thr | Glu | Gln | Ala | His | Thr | Val | Thr | Val | Leu | Ala | Ile | Asn | Ser | Ile |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Gly | Ala | Ser | Val | Ala | Asn | Phe | Asn | Leu | Thr | Phe | Ser | Trp | Pro | Met | Ser |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     |     | 730 |     |     |     | 735 |     |
| Lys | Val | Asn | Ile | Val | Gln | Ser | Leu | Ser | Ala | Tyr | Pro | Leu | Asn | Ser | Ser |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |
| Cys | Val | Ile | Val | Ser | Trp | Ile | Leu | Ser | Pro | Ser | Asp | Tyr | Lys | Leu | Met |
|     | 755 |     |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |
| Tyr | Phe | Ile | Ile | Glu | Trp | Lys | Asn | Leu | Asn | Glu | Asp | Gly | Glu | Ile | Lys |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| Trp | Leu | Arg | Ile | Ser | Ser | Ser | Val | Lys | Lys | Tyr | Tyr | Ile | His | Asp | His |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |
| Phe | Ile | Pro | Ile | Glu | Lys | Tyr | Gln | Phe | Ser | Leu | Tyr | Pro | Ile | Phe | Met |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     |     | 810 |     |     |     | 815 |     |
| Glu | Gly | Val | Gly | Lys | Pro | Lys | Ile | Ile | Asn | Ser | Phe | Thr | Gln | Asp | Asp |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     |     | 825 |     |     |     | 830 |     |     |
| Ile | Glu | Lys | His | Gln | Ser | Asp | Ala | Gly | Leu | Tyr | Val | Ile | Val | Pro | Val |
|     | 835 |     |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     |     | 845 |     |     |
| Ile | Ile | Ser | Ser | Ser | Ile | Leu | Leu | Leu | Gly | Thr | Leu | Leu | Ile | Ser | His |
|     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |
| Gln | Arg | Met | Lys | Lys | Leu | Phe | Trp | Glu | Asp | Val | Pro | Asn | Pro | Lys | Asn |
| 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     | 875 |     |     |     |     | 880 |

ES 2 742 133 T3

```

Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Met Leu Glu Gly Ser
      885                               890           895
Met Phe Val Lys Ser His His His Ser Leu Ile Ser Ser Thr Gln Gly
      900                               905           910
His Lys His Cys Gly Arg Pro Gln Gly Pro Leu His Arg Lys Thr Arg
      915                               920           925
Asp Leu Cys Ser Leu Val Tyr Leu Leu Thr Leu Pro Pro Leu Leu Ser
      930                               935           940
Tyr Asp Pro Ala Lys Ser Pro Ser Val Arg Asn Thr Gln Glu
      945                               950           955

```

<210> 8

<211> 906

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FUENTE

10 <222> 1..906

<223> /mol\_tipo="proteína" /nota" /note="Receptor de leptina isoforma D" /organismo="Homo sapiens"

<400> 8

ES 2 742 133 T3

Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg  
 20 25 30  
 Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu  
 35 40 45  
 Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr  
 50 55 60  
 Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp  
 85 90 95  
 Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val  
 100 105 110  
 Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn  
 115 120 125  
 Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val  
 130 135 140  
 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro  
 165 170 175  
 Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu  
 180 185 190  
 Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr  
 195 200 205  
 Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser  
 210 215 220  
 Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser  
 245 250 255  
 Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys  
 260 265 270  
 Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val  
 275 280 285  
 Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr  
 290 295 300  
 Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser



ES 2 742 133 T3

```

Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp
      820                      825                      830
Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val
      835                      840                      845
Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His
      850                      855                      860
Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
865                      870                      875                      880
Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Lys Met Pro Gly Thr
      885                      890                      895
Lys Glu Leu Leu Gly Gly Gly Trp Leu Thr
      900                      905

```

<210> 9

<211> 839

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FUENTE

10 <222> 1..839

<223> /mol\_tipo="proteína" /nota="Receptor de leptina isoforma E" /organismo="Homo sapiens"

<400> 9

ES 2 742 133 T3

Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg  
 20 25 30  
 Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu  
 35 40 45  
 Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr  
 50 55 60  
 Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp  
 85 90 95  
 Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val  
 100 105 110  
 Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn  
 115 120 125  
 Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val  
 130 135 140  
 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro  
 165 170 175  
 Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu  
 180 185 190  
 Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr  
 195 200 205  
 Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser  
 210 215 220  
 Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser  
 245 250 255  
 Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys  
 260 265 270  
 Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val  
 275 280 285  
 Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr



ES 2 742 133 T3

Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met  
805 810 815  
Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp  
820 825 830  
Ile Glu Lys His Gln Ser Asp  
835

<210> 10  
<211> 820  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<221> FUENTE  
10 <222> 1..820  
<223> /mol\_tipo="proteína" /nota="Receptor de leptina isoforma B fragmento Thr20 - Asp839" /organismo="Homo sapiens"  
  
<400> 10  
15

ES 2 742 133 T3

Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala  
 20 25 30  
 Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala  
 35 40 45  
 Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser Asn Leu Ser  
 50 55 60  
 Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val  
 85 90 95  
 Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys  
 100 105 110  
 Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu  
 115 120 125  
 Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr  
 130 135 140  
 Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Cys Cys Glu  
 165 170 175  
 Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met  
 180 185 190  
 Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met  
 195 200 205  
 Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu  
 210 215 220  
 His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu  
 245 250 255  
 Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr  
 260 265 270  
 Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln  
 275 280 285  
 Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser  
 290 295 300  
 Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys  
 305 310 315 320  
 Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys  
 325 330 335  
 Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp Trp Met Asn

ES 2 742 133 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Leu | Ala | Glu | Lys | Ile | Pro | Gln | Ser | Gln | Tyr | Asp | Val | Val | Ser | Asp | His |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Val | Ser | Lys | Val | Thr | Phe | Phe | Asn | Leu | Asn | Glu | Thr | Lys | Pro | Arg | Gly |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Lys | Phe | Thr | Tyr | Asp | Ala | Val | Tyr | Cys | Cys | Asn | Glu | His | Glu | Cys | His |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| His | Arg | Tyr | Ala | Glu | Leu | Tyr | Val | Ile | Asp | Val | Asn | Ile | Asn | Ile | Ser |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Cys | Glu | Thr | Asp | Gly | Tyr | Leu | Thr | Lys | Met | Thr | Cys | Arg | Trp | Ser | Thr |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Ser | Thr | Ile | Gln | Ser | Leu | Ala | Glu | Ser | Thr | Leu | Gln | Leu | Arg | Tyr | His |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Arg | Ser | Ser | Leu | Tyr | Cys | Ser | Asp | Ile | Pro | Ser | Ile | His | Pro | Ile | Ser |
|     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Glu | Pro | Lys | Asp | Cys | Tyr | Leu | Gln | Ser | Asp | Gly | Phe | Tyr | Glu | Cys | Ile |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Phe | Gln | Pro | Ile | Phe | Leu | Leu | Ser | Gly | Tyr | Thr | Met | Trp | Ile | Arg | Ile |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Asn | His | Ser | Leu | Gly | Ser | Leu | Asp | Ser | Pro | Pro | Thr | Cys | Val | Leu | Pro |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Asp | Ser | Val | Val | Lys | Pro | Leu | Pro | Pro | Ser | Ser | Val | Lys | Ala | Glu | Ile |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Thr | Ile | Asn | Ile | Gly | Leu | Leu | Lys | Ile | Ser | Trp | Glu | Lys | Pro | Val | Phe |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Pro | Glu | Asn | Asn | Leu | Gln | Phe | Gln | Ile | Arg | Tyr | Gly | Leu | Ser | Gly | Lys |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Glu | Val | Gln | Trp | Lys | Met | Tyr | Glu | Val | Tyr | Asp | Ala | Lys | Ser | Lys | Ser |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Val | Ser | Leu | Pro | Val | Pro | Asp | Leu | Cys | Ala | Val | Tyr | Ala | Val | Gln | Val |
|     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Arg | Cys | Lys | Arg | Leu | Asp | Gly | Leu | Gly | Tyr | Trp | Ser | Asn | Trp | Ser | Asn |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Pro | Ala | Tyr | Thr | Val | Val | Met | Asp | Ile | Lys | Val | Pro | Met | Arg | Gly | Pro |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Glu | Phe | Trp | Arg | Ile | Ile | Asn | Gly | Asp | Thr | Met | Lys | Lys | Glu | Lys | Asn |
| 625 |     |     |     |     |     | 630 |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Val | Thr | Leu | Leu | Trp | Lys | Pro | Leu | Met | Lys | Asn | Asp | Ser | Leu | Cys | Ser |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Val | Gln | Arg | Tyr | Val | Ile | Asn | His | His | Thr | Ser | Cys | Asn | Gly | Thr | Trp |
|     |     |     | 660 |     |     |     | 665 |     |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Ser | Glu | Asp | Val | Gly | Asn | His | Thr | Lys | Phe | Thr | Phe | Leu | Trp | Thr | Glu |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Gln | Ala | His | Thr | Val | Thr | Val | Leu | Ala | Ile | Asn | Ser | Ile | Gly | Ala | Ser |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Val | Ala | Asn | Phe | Asn | Leu | Thr | Phe | Ser | Trp | Pro | Met | Ser | Lys | Val | Asn |
| 705 |     |     |     |     |     | 710 |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Ile | Val | Gln | Ser | Leu | Ser | Ala | Tyr | Pro | Leu | Asn | Ser | Ser | Cys | Val | Ile |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Val | Ser | Trp | Ile | Leu | Ser | Pro | Ser | Asp | Tyr | Lys | Leu | Met | Tyr | Phe | Ile |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Ile | Glu | Trp | Lys | Asn | Leu | Asn | Glu | Asp | Gly | Glu | Ile | Lys | Trp | Leu | Arg |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |
| Ile | Ser | Ser | Ser | Val | Lys | Lys | Tyr | Tyr | Ile | His | Asp | His | Phe | Ile | Pro |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| Ile | Glu | Lys | Tyr | Gln | Phe | Ser | Leu | Tyr | Pro | Ile | Phe | Met | Glu | Gly | Val |
| 785 |     |     |     |     |     | 790 |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |
| Gly | Lys | Pro | Lys | Ile | Ile | Asn | Ser | Phe | Thr | Gln | Asp | Asp | Ile | Glu | Lys |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |
| His | Gln | Ser | Asp |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento in vitro para la detección de leptina mutada,  
**caracterizado porque**  
 5 el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- determinar la unión de la leptina no mutada que proviene del suero o plasma al receptor de leptina humano, que se une a la leptina no mutada, pero no se une a la leptina mutada, o se une con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada, obteniendo un primer valor de enlace, en el que en la secuencia de aminoácidos, la leptina
  - 10 mutada presenta al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: D100Y, N103K, L72S, R105W, G133V, S141C y/o L161G, preferentemente D100Y, N103K y/o L72S, más preferentemente D100Y,
  - determinar la unión tanto de la leptina mutada como de la leptina no mutada que proviene del suero o plasma a un anticuerpo policlonal o monoclonal, en la que el anticuerpo policlonal o monoclonal se une tanto a la leptina mutada como a la leptina no mutada, obteniendo un segundo valor de enlace,
  - 15 en el que la leptina mutada está presente cuando el primer valor de enlace es inferior al segundo valor de enlace, y en el que los valores de enlace se determinan mediante ELISA, RIA, FIA o LIA.
2. Procedimiento según la reivindicación 1,  
 20 **caracterizado porque**  
 el receptor de leptina humano comprende la isoforma A, la isoforma B, la isoforma C, la isoforma D y/o la isoforma E.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2,  
**caracterizado porque**  
 25 el receptor de leptina es una isoforma soluble y presenta preferentemente los aminoácidos Thr20 a Asp839 de la isoforma B del receptor de leptina humano.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,  
**caracterizado porque**  
 30 el primer valor de enlace y el segundo valor de enlace se determinan en una muestra de medición.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,  
**caracterizado porque**  
 el primer valor de enlace y el segundo valor de enlace se determinan en diferentes muestras de medición,  
 35 preferentemente en diferentes puntos en el tiempo y, opcionalmente, mediante diferentes procedimientos de determinación.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,  
**caracterizado porque**  
 40 el primer valor de enlace y el segundo valor de enlace se determinan mediante diferentes procedimientos de determinación.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,  
**caracterizado porque**  
 45 un cociente Q obtenido del primer y segundo valor de enlace:
- $$Q = (\text{primer valor de enlace})/(\text{segundo valor de enlace})$$
- está entre 0,8 y 1,2, preferentemente entre 0,9 y 1,1, o  
 50 está entre 0,3 y 0,7, preferentemente entre 0,4 y 0,6, o es inferior a 0,2, preferentemente inferior a 0,1.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,  
**caracterizado porque**  
 55 un cociente Q obtenido del primer y segundo valor de enlace:
- $$Q = (\text{primer valor de enlace})/(\text{segundo valor de enlace})$$
- es 0,8 o inferior.
- 60 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,  
**caracterizado porque**  
 para el diagnóstico in vitro de la obesidad, un cociente Q obtenido del primer y segundo valor de unión:
- 65 
$$Q = (\text{primer valor de enlace})/(\text{segundo valor de enlace})$$

- entre 0,8 y 1,2, preferentemente entre 0,9 y 1,1, indica homocigosidad en el gen de la obesidad con respecto a la leptina no mutada;

- entre 0,3 y 0,7, preferentemente entre 0,4 y 0,6, indica heterocigosidad en el gen de la obesidad con respecto a la leptina mutada y no mutada; e

- inferior a 0,2, preferentemente inferior a 0,1 indica homocigosidad en el gen de la obesidad con respecto a la leptina mutada.

10. El uso del receptor de leptina humano, que se une a la leptina no mutada con un primer valor de enlace pero no se une a la leptina mutada, o se une con un máximo del 50 % del valor de enlace de la leptina no mutada en el diagnóstico in vitro de obesidad, en el que en la secuencia de aminoácidos, la leptina mutada presenta al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: D100Y, N103K, L72S, R105W, G133V, S141C y/o L161G, preferentemente D100Y, N103K y/o L72S, más preferentemente D100Y.

15 11. El uso según la reivindicación 10 en la determinación in vitro de homocigosidad o heterocigosidad con respecto al gen de la obesidad de un mamífero, preferentemente un ser humano, que codifica para leptina mutada y/o leptina no mutada.

12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que el receptor de leptina humano comprende la isoforma A, la isoforma B, la isoforma C, la isoforma D y/o la isoforma E.

13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el receptor de leptina es una isoforma soluble y presenta preferentemente los aminoácidos Thr20 a Asp839 de la isoforma B del receptor de leptina humano.

Figura 1a:

Precursor de la leptina (Homo sapiens)

```

1  MHWGTLGFL WLWPYLFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS VSSKQKVTGL 60
61 DFIPGLHPIL TLSKMDQTLA VYQQILTSMR SRNVIQISND LENLRDLLHV LAFSKSCHLP 120
121 WASGLETLDL LGGVLEASGY STEVVALSRL QGSLQDMLWQ LDLSPGC 167
    
```

Figura 1b:

Precursor de la leptina, variante D100Y (Homo sapiens)

```

1  MHWGTLGFL WLWPYLFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS VSSKQKVTGL 60
61 DFIPGLHPIL TLSKMDQTLA VYQQILTSMR SRNVIQISND YLENLRDLLHV LAFSKSCHLP 120
121 WASGLETLDL LGGVLEASGY STEVVALSRL QGSLQDMLWQ LDLSPGC 167
    
```

Figura 1c:

Precursor de la leptina, variante N103K (Homo sapiens)

```

1  MHWGTLGFL WLWPYLFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS VSSKQKVTGL 60
61 DFIPGLHPIL TLSKMDQTLA VYQQILTSMR SRNVIQISND KLENLRDLLHV LAFSKSCHLP 120
121 WASGLETLDL LGGVLEASGY STEVVALSRL QGSLQDMLWQ LDLSPGC 167
    
```

Figura 1d:

Precursor de la leptina, variante L72S (Homo sapiens)

```

1  MHWGTLGFL WLWPYLFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS VSSKQKVTGL 60
61 DFIPGLHPIL SLSKMDQTLA VYQQILTSMR SRNVIQISND LENLRDLLHV LAFSKSCHLP 120
121 WASGLETLDL LGGVLEASGY STEVVALSRL QGSLQDMLWQ LDLSPGC 167
    
```

Figura 2a:

Isoforma A del receptor de leptina (Homo sapiens)

```

1  MICQKFCVVL LHWEFIYVIT AFNLSYPITP WRFKLSCMPP NSTYDYFLLP AGLSKNTSNS 60
61 NGHYETAVEP KFNSSGTHFS NLSKTTFHCC FRSEQDRNCS LCADNIEGKT FVSTVNSLVF 120
121 QQIDANWNIQ CWLKGDLKLF ICYVESLFKN LFRNYNYKVH LLYVLPEVLE DSPLVPQKGS 180
181 FQMVHCNCSV HECCECLVPV PTAKLNDTLL MCLKITSGGV IFQSPLMSVQ PINMVKPDPP 240
241 LGLHMEITDD GNLKISWSSP PLVPFPLOQYQ VKYSENSTTV IREADKIVSA TSLLVDSILP 300
301 GSSYEYVQVRG KRLDGPPIWS DWSTPRVFTT QDVIYFPPKI LTSVGSNVSF HCIYKKNKI 360
361 VPSKEIVWWM NLAEKIPQSQ YDVVSDHVSX VTFNLNETH PRGKFTYDAV YCCNEHECHH 420
421 RYAEYVIDV NINISCETDG YLTKMTCRWS TSTIQSLAES TLQLRYHRSS LYCSDIPSIH 480
481 PISEPKDCYL QSDGFYECIF QPIFLLSGYT MWIRINHSLG SLDSPPTCVL PDSVVKPLPP 540
541 SSVKAEITIN IGLLKISWEK PVFPENNLQF QIRYGLSGKE VQWKMYEYVD AKSKSVSLPV 600
601 PDLCAVYAVQ VRCKRLDGLG YWSNWSNPAY TVVMDIKVPM RGPFWRIIN GDTMKKEKNV 660
661 TLLWKPLMKN DSLCSVQRYV INHHTSCNGT WSEDVGNHTK FTFLWTEQAH TVTVLAINSI 720
721 GASVANFNLT FSWPMSKVNI VQSL SAYPLN SSCVIVSWIL SPSDYKLMYF IIEWKNLNEE 780
781 GEIKWLRISV SVKKYYIHDH FIPIEKYQFS LYPIFMEGVG KPFIINSFTQ DDIEKHQSDA 840
841 GLYVIVPVII SSSILLGLTL LISHQRMKKL FWEDVNPKN CSWAQGLNFQ KRTDIL 896
    
```

Figura 2b:

Isoforma B del receptor de leptina (Homo sapiens)

```

1  MICQKFCVVL LHWEFIYVIT AFNLSYPITP WRFKLSCMPP NSTYDYFLLP AGLSKNTSNS 60
61 NGHYETAVEP KFNSSGTHFS NLSKTTFHCC FRSEQDRNCS LCADNIEGKT FVSTVNSLVF 120
121 QQIDANWNIQ CWLKGDLKLF ICYVESLFKN LFRNYNYKVH LLYVLPEVLE DSPLVPQKGS 180
181 FQMVHCNCSV HECCECLVPV PTAKLNDTLL MCLKITSGGV IFQSPLMSVQ PINMVKPDPP 240
241 LGLHMEITDD GNLKISWSSP PLVPFPLOQYQ VKYSENSTTV IREADKIVSA TSLLVDSILP 300
301 GSSYEYVQVRG KRLDGPPIWS DWSTPRVFTT QDVIYFPPKI LTSVGSNVSF HCIYKKNKI 360
361 VPSKEIVWWM NLAEKIPQSQ YDVVSDHVSX VTFNLNETH PRGKFTYDAV YCCNEHECHH 420
421 RYAEYVIDV NINISCETDG YLTKMTCRWS TSTIQSLAES TLQLRYHRSS LYCSDIPSIH 480
    
```

## ES 2 742 133 T3

|      |             |            |            |             |            |             |      |
|------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| 481  | PISEPKDCYL  | QSDGFYECIF | QPIFLLSGYT | MWIRINHSLG  | SLDSPPTCVL | PDSVVKPLPP  | 540  |
| 541  | SSVKAELITIN | IGLLKISWEK | PVFPENNLQF | QIRYGLSGKE  | VQWKMYEVYD | AKSKSVSLPV  | 600  |
| 601  | PDLCAVYAVQ  | VRCKRLDGLG | YWSNWSNPAY | TVVMDIKVPM  | RGPEFWRIIN | GDTMKKEKNV  | 660  |
| 661  | TLLWKPLMKN  | DSLCSVQRYV | INHHTSCNGT | WSEDEVGNHTK | FTFLWTEQAH | TVTVLAINSI  | 720  |
| 721  | GASVANFNLT  | FSWPMSKVNI | VQSLSAYPLN | SSCVIVSWIL  | SPSDYKLMYF | IIEWKNLNED  | 780  |
| 781  | GEIKWLRISS  | SVKYYIHDH  | FIPIEKYQFS | LYPIFMEGVG  | KPKIINSFTQ | DDIEKHQSDA  | 840  |
| 841  | GLYVIVPVII  | SSSILLLGTL | LISHQRMKKL | FWEDVNPKN   | CSWAQGLNFQ | KPETFEHLFI  | 900  |
| 901  | KHTASVTCGP  | LLEPETISE  | DISVDTSWKN | KDEMPPTTV   | SLSTTDLEK  | GSVCISDQFN  | 960  |
| 961  | SVNFSEAEGT  | EVTYEDESQR | QPFVKYATLI | SNSKPSETGE  | EQGLINSSVT | KCFSSKNSPL  | 1020 |
| 1021 | KDSFNSSSWE  | IEAQAFFILS | DQHPNIIISP | LTFSEGLDEL  | LKLEGNFPPE | NNDKKSIIYYL | 1080 |
| 1081 | GVTSIKKRES  | GVLLTDKSRV | SCFPFAPCLF | TDIRVLQDSC  | SHFVENNINL | GTSSKKTFFAS | 1140 |
| 1141 | YMPQFQTCST  | QTHKIMENKM | CDLTV      |             |            |             | 1165 |

**Figura 2c:**  
Isoforma C del receptor de leptina (Homo sapiens)

|     |             |            |            |             |            |            |     |
|-----|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| 1   | MICQKFCVVL  | LHWEFIYVIT | AFNLSYPITP | WRFKLSMPP   | NSTYDYFLLP | AGLSKNTSNS | 60  |
| 61  | NGHYETAVEP  | KFNSSGTHFS | NLSKTTFHCC | FRSEQDRNCS  | LCADNIEGKT | FVSTVNSLVF | 120 |
| 121 | QQIDANWNIQ  | CWLKGDCLKF | ICYVESLFKN | LFRNYNYKVH  | LLYVLPEVLE | DSPLVPQKGS | 180 |
| 181 | FQMVHCNCSV  | HECCECLVPV | PTAKLNDTLL | MCLKITSGGV  | IFQSPLMSVQ | PINMVKPDP  | 240 |
| 241 | LGLHMEITDD  | GNLKISWSSP | PLVPFPLOQY | VKYSNSTTV   | IREADKIVSA | TSLLVDSILP | 300 |
| 301 | GSSYEVQVRG  | KRLDGPPIWS | DWSTPRVFTT | QDVIYFPPKI  | LTSVGSNSVF | HCIYKKNKI  | 360 |
| 361 | VPSKEIVWWM  | NLAEKIPQSQ | YDVVSDHVS  | VTFNLNETH   | PRGKFTYDAV | YCCNEHECHH | 420 |
| 421 | RYAELYVIDV  | NINISCETDG | YLTGMTCRWS | TSTIQSLAES  | TLQLRYHRSS | LYCSDIPSIH | 480 |
| 481 | PISEPKDCYL  | QSDGFYECIF | QPIFLLSGYT | MWIRINHSLG  | SLDSPPTCVL | PDSVVKPLPP | 540 |
| 541 | SSVKAELITIN | IGLLKISWEK | PVFPENNLQF | QIRYGLSGKE  | VQWKMYEVYD | AKSKSVSLPV | 600 |
| 601 | PDLCAVYAVQ  | VRCKRLDGLG | YWSNWSNPAY | TVVMDIKVPM  | RGPEFWRIIN | GDTMKKEKNV | 660 |
| 661 | TLLWKPLMKN  | DSLCSVQRYV | INHHTSCNGT | WSEDEVGNHTK | FTFLWTEQAH | TVTVLAINSI | 720 |
| 721 | GASVANFNLT  | FSWPMSKVNI | VQSLSAYPLN | SSCVIVSWIL  | SPSDYKLMYF | IIEWKNLNED | 780 |
| 781 | GEIKWLRISS  | SVKYYIHDH  | FIPIEKYQFS | LYPIFMEGVG  | KPKIINSFTQ | DDIEKHQSDA | 840 |
| 841 | GLYVIVPVII  | SSSILLLGTL | LISHQRMKKL | FWEDVNPKN   | CSWAQGLNFQ | KMLEGSMFVK | 900 |
| 901 | SHHSLISS    | QGHKHCGRPQ | GPLHRKTRDL | CSLVYLLTLP  | PLLSYDPAKS | PSVRNTQE   | 958 |

**Figura 2d:**  
Isoforma D del receptor de leptina (Homo sapiens)

|     |             |            |            |             |            |            |     |
|-----|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| 1   | MICQKFCVVL  | LHWEFIYVIT | AFNLSYPITP | WRFKLSMPP   | NSTYDYFLLP | AGLSKNTSNS | 60  |
| 61  | NGHYETAVEP  | KFNSSGTHFS | NLSKTTFHCC | FRSEQDRNCS  | LCADNIEGKT | FVSTVNSLVF | 120 |
| 121 | QQIDANWNIQ  | CWLKGDCLKF | ICYVESLFKN | LFRNYNYKVH  | LLYVLPEVLE | DSPLVPQKGS | 180 |
| 181 | FQMVHCNCSV  | HECCECLVPV | PTAKLNDTLL | MCLKITSGGV  | IFQSPLMSVQ | PINMVKPDP  | 240 |
| 241 | LGLHMEITDD  | GNLKISWSSP | PLVPFPLOQY | VKYSNSTTV   | IREADKIVSA | TSLLVDSILP | 300 |
| 301 | GSSYEVQVRG  | KRLDGPPIWS | DWSTPRVFTT | QDVIYFPPKI  | LTSVGSNSVF | HCIYKKNKI  | 360 |
| 361 | VPSKEIVWWM  | NLAEKIPQSQ | YDVVSDHVS  | VTFNLNETH   | PRGKFTYDAV | YCCNEHECHH | 420 |
| 421 | RYAELYVIDV  | NINISCETDG | YLTGMTCRWS | TSTIQSLAES  | TLQLRYHRSS | LYCSDIPSIH | 480 |
| 481 | PISEPKDCYL  | QSDGFYECIF | QPIFLLSGYT | MWIRINHSLG  | SLDSPPTCVL | PDSVVKPLPP | 540 |
| 541 | SSVKAELITIN | IGLLKISWEK | PVFPENNLQF | QIRYGLSGKE  | VQWKMYEVYD | AKSKSVSLPV | 600 |
| 601 | PDLCAVYAVQ  | VRCKRLDGLG | YWSNWSNPAY | TVVMDIKVPM  | RGPEFWRIIN | GDTMKKEKNV | 660 |
| 661 | TLLWKPLMKN  | DSLCSVQRYV | INHHTSCNGT | WSEDEVGNHTK | FTFLWTEQAH | TVTVLAINSI | 720 |
| 721 | GASVANFNLT  | FSWPMSKVNI | VQSLSAYPLN | SSCVIVSWIL  | SPSDYKLMYF | IIEWKNLNED | 780 |
| 781 | GEIKWLRISS  | SVKYYIHDH  | FIPIEKYQFS | LYPIFMEGVG  | KPKIINSFTQ | DDIEKHQSDA | 840 |
| 841 | GLYVIVPVII  | SSSILLLGTL | LISHQRMKKL | FWEDVNPKN   | CSWAQGLNFQ | KKMPGTKELL | 900 |
| 901 | GGGWLT      |            |            |             |            |            | 906 |

**Figura 2e:**  
Isoforma E del receptor de leptina (Homo sapiens)

|     |            |            |            |            |            |            |     |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 1   | MICQKFCVVL | LHWEFIYVIT | AFNLSYPITP | WRFKLSMPP  | NSTYDYFLLP | AGLSKNTSNS | 60  |
| 61  | NGHYETAVEP | KFNSSGTHFS | NLSKTTFHCC | FRSEQDRNCS | LCADNIEGKT | FVSTVNSLVF | 120 |
| 121 | QQIDANWNIQ | CWLKGDCLKF | ICYVESLFKN | LFRNYNYKVH | LLYVLPEVLE | DSPLVPQKGS | 180 |
| 181 | FQMVHCNCSV | HECCECLVPV | PTAKLNDTLL | MCLKITSGGV | IFQSPLMSVQ | PINMVKPDP  | 240 |

ES 2 742 133 T3

|     |             |            |            |             |            |             |     |
|-----|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-----|
| 241 | LGLHMEITDD  | GNLKISWSSP | PLVPPFLQYQ | VKYSENSTTV  | IREADKIVSA | TSLLVDSILP  | 300 |
| 301 | GSSYEVQVRG  | KRLDGPPIWS | DWSTPRVFVT | QDVIYFPPKI  | LTSVGSNVSF | HCIYKKENKI  | 360 |
| 361 | VPSKEIVVWM  | NLAEKIPQSQ | YDVVSDHVS  | VTFNINLNETK | PRGKFTYDAV | YCCNEHECHH  | 420 |
| 421 | RYAELYVIDV  | NINISCETDG | YLTKMTCRWS | TSTIQSLAES  | TLQLRYHRSS | LYCSDIPSIH  | 480 |
| 481 | PISEPKDCYL  | QSDGFYECIF | QPIFLLSGYT | MWIRINHSLG  | SLDSPPTCVL | PDSVVKPLPP  | 540 |
| 541 | SSVKAIEITIN | IGLLKISWEK | PVFPENNLQF | QIRYGLSGKE  | VQWKMYEVYD | AKSKSVSLPV  | 600 |
| 601 | PDLCAVYAVQ  | VRCKRLDGLG | YWSNWSNPAY | TVVMDIKVPM  | RGPEFWRIIN | GDTRMKKEKNV | 660 |
| 661 | TLLWKPLMKN  | DSLCSVQRYV | INHHTSCNGT | WSEDVGNHTK  | FTFLWTEQAH | TVTFLAINSI  | 720 |
| 721 | GASVANFNLT  | FSWPMSKVIN | VQSLSAYPLN | SSCVIVSWIL  | SPSDYKLMYF | IIIEWKNLNE  | 780 |
| 781 | GEIKWLRIS   | SVKYYIHDH  | FIPIEKYQFS | LYPIFMIEGVG | KPKIINSFTQ | DDIEKHQSD   | 839 |

Figura 2f:

Fragmento Thr20-Asp839 del la Isoforma B del receptor de leptina (Homo sapiens)

|     |            |             |            |            |             |            |     |
|-----|------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| 1   | TAFNLSYPIT | PWRFKLSCMP  | PNSTYDYFLL | PAGLSKNTSN | SNGHYETAVE  | PKFNSSGTHF | 60  |
| 61  | SNLSKTTFHC | CFRSEQDRNC  | SLCADNIEGK | TFVSTVNSLV | FQQIDANWNI  | QCWLKGDCLK | 120 |
| 121 | FICYVESLTK | NLFRNYNYKV  | HLLYVLPEVL | EDSPLVPQKG | SFQMVHCNCS  | VHECCECLVP | 180 |
| 181 | VPTAKLNDTL | LMCLKITSGG  | VIFQSPLMVS | QPINMVKPDP | PLGLHMEITD  | DGNLKISWSS | 240 |
| 241 | PPLVPPFLQY | QVKYSENSTT  | VIREADKIVS | ATSLLVDSIL | PGSSYEVQVR  | GKRLDGPPIW | 300 |
| 301 | SDWSTPRVFT | TQDVIYFPPK  | ILTSVGSNVS | FHCIYKKENK | IVPSKEIVVW  | MNLAEKIPQS | 360 |
| 361 | QYDVVSDHVS | KVTFNINLNET | KPRGKFTYDA | VYCCNEHECH | HRYAELYVID  | VNINISCETD | 420 |
| 421 | GYLTKMTCRW | STSTIQSLAE  | STLQLRYHRS | SLYCSDIPSI | HPISEPKDCY  | LQSDGFYECI | 480 |
| 481 | FQPIFLLSGY | TMWIRINHSL  | GSLDSPPTCV | LPDSVVKPLP | PSSVKAIEITI | NIGLLKISWE | 540 |
| 541 | KPVFPENNLQ | FQIRYGLSGK  | EVQWKMYEVY | DAKSKSVSLP | VPDLCAVYAV  | QVRCKRLDGL | 600 |
| 601 | GYWSNWSNPA | YTVVMDIKVP  | MRGPEFWRII | NGDTMKKEKN | VTLLWKPLMK  | NDSLCSVQRY | 660 |
| 661 | VINHHTSCNG | TWSEDVGNHT  | KFTFLWTEQA | HTVTVLAINS | IGASVANFNLT | TFSWPMSKVN | 720 |
| 721 | IVQSLSAYPL | NSSCVIVSWI  | LSPSDYKLMY | FIIEWKNLNE | DGEIKWLRIS  | SSVKKYYIHD | 780 |
| 781 | HFIPIEKYQF | SLYPIFMIEGV | GKPKIINSFT | QDDIEKHQSD |             |            | 820 |