



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0709793-0 A2**

(22) Data de Depósito: 05/04/2007
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/61 2006.01

(54) Título: **MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, POLIPEPTÍDEO, VETOR, CÉLULA, MÉTODOS PARA A FABRICAÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, PARA O TRATAMENTO DE UM ANIMAL, PARA A MODIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE UM POLIPEPTÍDEO, E PARA A CONCEPÇÃO RACIONAL DE MUTAÇÕES EM UM POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO POLIPEPTÍDEO, ANTAGONISTA DE POLIPEPTÍDEO VARIANTE, E, HOMODÍMERO**

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, POLIPEPTÍDEO, VETOR, CÉLULA, MÉTODOS PARA A FABRICAÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, PARA O TRATAMENTO DE UM ANIMAL, PARA A MODIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE UM POLIPEPTÍDEO, E PARA A CONCEPÇÃO RACIONAL DE MUTAÇÕES EM UM POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO POLIPEPTÍDEO, ANTAGONISTA DE POLIPEPTÍDEO VARIANTE, E, HOMODÍMEROs requerentes descrevem um antagonista de polipeptídeo de hormônio de crescimento circularmente permutado; composições compreendendo dito antagonista e métodos para tratar condições que iriam se beneficiar de administração de dito antagonista.

(30) Prioridade Unionista: 06/04/2006 GB 0606946.2

(73) Titular(es): Asterion Limited

(72) Inventor(es): John Sayers, Peter Artymiuk, Richard Ross, Sarbendra Pradhananga

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007001285 de 05/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/128979 de 15/11/2007

“MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, POLIPEPTÍDEO, VETOR, CÉLULA, MÉTODOS PARA A FABRICAÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, PARA O TRATAMENTO DE UM ANIMAL, PARA A MODIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE UM POLIPEPTÍDEO, E PARA A
5 CONCEPÇÃO RACIONAL DE MUTAÇÕES EM UM POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO POLIPEPTÍDEO, ANTAGONISTA DE POLIPEPTÍDEO VARIANTE, E, HOMODÍMERO”

A invenção se refere a um antagonista de polipeptídeo de hormônio de crescimento circularmente permutado; composições
10 compreendendo dito antagonista e métodos para tratar condições que iriam se beneficiar de administração de dito antagonista.

Um grande grupo de fatores de crescimento, referidos como citocinas, estão envolvidos em um número de diversas funções celulares. Estas incluem modulação do sistema imune, regulação do metabolismo energético e controle de crescimento e desenvolvimento. Citocinas mediam
15 seus efeitos através de receptores expressos na superfície celular em células alvo. Receptores de citocina podem ser divididos em quatro subgrupos separados. Receptores tipo 1 (família de hormônio de crescimento (GH)) são caracterizados por quatro resíduos conservados de cisteína na parte amino
20 terminal de seu domínio extracelular e a presença de um motivo conservado Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser na parte C-terminal. O motivo repetido Cys também está presente em Tipo 2 (família de interferon) e Tipo III (família de fator de necrose tumoral).

Sabe-se que muito ligantes de citocina interagem com seu
25 receptor cognato através de sítios específicos. Alguns receptores de citocina têm tanto sítios de ligação de ligante de alta afinidade como sítios de ligação de baixa afinidade.

Por exemplo, sabe-se que uma única molécula de GH se associa com duas moléculas de receptor (GHR) (Cunningham *et al.*, 1991; de

Vos *et al.*, 1992; Sundstrom *et al.*, 1996; Clackson *et al.*, 1998). Isto ocorre através de dois sítios de ligação de receptor exclusivos em GH e um sítio de ligação comum no domínio extracelular de dois receptores. Sítio 1 na molécula de GH tem uma afinidade maior do que sítio 2, e acredita-se que
5 dimerização de receptor ocorra seqüencialmente com um receptor se ligando a sítio 1 em GH seguido por recrutamento de um segundo receptor para sítio 2. O domínio extracelular do GHR existe como dois domínios ligados cada de aproximadamente 100 aminoácidos. É uma mudança conformacional nestes dois domínios que ocorre em ligação de hormônio com a formação do
10 complexo trimérico GHR-GH-GHR. Internalização do complexo GHR-GH-GHR é seguida por uma etapa de reciclagem através da qual a molécula de receptor é regenerada para uso posterior dentro da célula.

Uma variedade de diferentes estequiometrias são empregadas por diferentes citocinas e outros ligantes em ligação de receptor. Assim
15 eritropoetina, como GH, forma um complexo trimérico receptorhormônio-receptor. Interleucina-4 forma um complexo trimérico receptor-hormônio-receptor diferente. Outras citocinas, por exemplo, leptina e GCSF, formam complexo tetramérico receptor-hormônio-hormônio-receptor, e outras (eg interleucina 6) provavelmente formam complexos hexaméricos consistindo de
20 duas moléculas solúveis de receptor, duas moléculas de receptor transmembrana e duas moléculas de citocina. Em cada caso existe um sítio de ligação de alta afinidade primário que localiza a citocina para o complexo receptor, e sítios adicionais que desempenham papéis secundários na alteração da conformação ou recrutamento de outras moléculas e com isso iniciam
25 sinalização.

Polipeptídeos variantes de citocina são conhecidos. Por exemplo, variantes de GH são descritas em Patente Norte-Americana 5.849.535. A modificação para GH é tanto em sítios de ligação de sítio 1 como sítio 2. As modificações para sítio 1 produzem uma molécula de GH

que tem uma afinidade maior para GHR comparada com GH tipo selvagem. Estas moléculas modificadas de GH atuam como agonistas. Também existe descrição de modificações em sítio 2 que resultam na criação de antagonistas de GH. Exemplos adicionais de modificações a GH que alteram a afinidade de ligação de GH para sítio 1 são descritos em Patente Norte-Americana 5.854.026; Patente Norte-Americana 6.004.931; Patente Norte-Americana 6.022.711; Patente Norte-Americana 6.057.292; e Patente Norte-Americana 6.136.563. Estas modificações se referem a mutações pontuais em posições específicas em GH que produzem uma molécula com propriedades de sinalização alteradas.

Permutação circular é uma maneira para gerar variantes de polipeptídeos que retêm a estrutura geral de seqüência primária linear de um polipeptídeo nativo, mas re-ordena a seqüência formando novos terminos amino e carboxil. O processo gera moléculas com propriedades biológicas alteradas. O processo inclui a fusão dos terminos amino e carboxil naturais ou diretamente ou usando moléculas ligantes que são tipicamente ligantes peptídicos. A molécula circularizada é então conceitualmente cortada para criar novos terminos amino e carboxil. Polipeptídeos circularmente permutados podem ser gerados ou recombinantemente ou por síntese peptídica *in vitro*.

Permutação circular foi usada para gerar moléculas quiméricas com atividade biológica alterada.

Por exemplo, Patente Internacional 95/27732 descreve a criação de um ligante de IL-4 circularmente permutado fusionado a um agente citotóxico. O agente IL-4-permutado tem afinidade e citotoxicidade alteradas quando comparado a um agente IL-4-nativo e tem eficácia com respeito a matar células cancerosas que são expostas ao polipeptídeo conjugado.

Patente Internacional WO 99/51632 descreve o uso de permutação circular para gerar novas proteínas de ligação de estreptavidina

que têm afinidade reduzida para biotina. A estreptavidina circularmente permutada é fusionada a um segundo polipeptídeo para criar uma proteína de fusão que se liga diferencialmente a biotina. A afinidade reduzida da proteína de fusão de estreptavidina para biotina facilita liberação da proteína de fusão quando biotina é usada como um veículo de liberação de droga.

WO 01/51629 descreve β -lactamase bacteriana circularmente permutada e seu uso como uma proteína marcadora para a detecção de interações entre proteínas intracelulares e extracelulares que se unem com o polipeptídeo permutado.

Métodos para identificar polipeptídeos circularmente permutados também são conhecidos. Por exemplo, WO 00/18905, que é incorporada por referência em sua totalidade, descreve um método para identificar polipeptídeos permutados, referidos como "permutéínas", usando um vetor de apresentação em fago no qual uma biblioteca de genes permutados é inserida. A expressão da biblioteca na superfície do vetor de apresentação é detectada por exposição da biblioteca expressa para uma proteína de ligação que potencialmente interage com uma permutéína.

WO 01/30998, que é incorporada por referência em sua totalidade, descreve um método adicional para gerar e identificar proteínas circularmente permutadas. A invenção se refere à formação de proteínas de fusão compreendendo a parte amino terminal de uma primeira proteína fusionada à parte carboxil terminal de uma segunda proteína diferente a partir da qual permutações são sintetizadas. Uma biblioteca de proteínas de fusão é criada a qual pode ser triada por apresentação em fago.

Em pedido co-pendente de requerentes WO 2005/003165A2 são descritas, entre outras coisas, moléculas circularmente permutadas de hormônio de crescimento. São descritas a atividade agonista de uma tal molécula e a modificação desta molécula para um antagonista de atividade de receptor de hormônio de crescimento.

De acordo com um aspecto da invenção é fornecido uma molécula isolada de ácido nucleico compreendendo a seqüência de ácidos nucleicos caracterizada pelo fato de que dita seqüência de ácidos nucleicos é selecionada a partir do grupo consistindo de:

5 (i) uma molécula de ácido nucleico consistindo da seqüência como representado em Figura 1 (SEQ ID NO: 1);

(ii) uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma seqüência que hibridiza com a seqüência identificada em (i) caracterizada pelo fato de que dita molécula de ácido nucleico inclui uma modificação
10 compreendendo uma seqüência que codifica resíduo de aminoácido 176 como indicado em Figura 1, caracterizada pelo fato de que dita modificação resulta na adição, substituição ou deleção de pelo menos um resíduo de aminoácido e dita molécula de ácido nucleico codifica um polipeptídeo com atividade agonista de receptor de hormônio de crescimento;

15 (iii) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos como representado em Figura 2a (SEQ ID NO: 2).

Em uma forma de realização preferida da invenção é fornecido uma molécula isolada de ácido nucleico que se anela em condições de
20 hibridização estrigente com as seqüências descritas em (i) e (ii) acima.

Hibridização de uma molécula de ácido nucleico ocorre quando duas moléculas complementares de ácidos nucleicos passam por uma quantidade de ligação de hidrogênio uma com a outra. A estringência de hibridização pode variar de acordo com as condições ambientais circundando
25 os ácidos nucleicos, a natureza do método de hibridização, e a composição e comprimento das moléculas de ácido nucleico usadas. Cálculos considerando condições de hibridização requeridas para atingir graus particulares de estringência são discutidos em Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, NY, 2001); e Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York, 1993). A T_m é a temperatura na qual 50% de uma dada fita de uma molécula de ácido nucleico é hibridizada com sua fita complementar. O seguinte é um conjunto exemplar de condições de hibridização e não é limitante:

Estringência Muito Alta (permite que seqüências que compartilham pelo menos 90% de identidade hibridizem)

- 10 Hibridização: 5x SSC a 65°C por 16 horas
 Lavagem duas vezes: 2x SSC em temperatura ambiente (RT) por 15 minutos cada
 Lavagem duas vezes: 0,5x SSC a 65°C por 20 minutos cada

Estringência Alta (permite que seqüências que compartilham pelo menos 80% de identidade hibridizem)

- 15 Hibridização: 5x-6x SSC a 65°C-70°C por 16-20 horas
 Lavagem duas vezes: 2x SSC a RT por 5-20 minutos cada
 Lavagem duas vezes: 1x SSC a 55°C-70°C por 30 minutos cada

20 Estringência Baixa (permite que seqüências que compartilham pelo menos 50% de identidade hibridizem)

- Hibridização: 6x SSC a RT a 55°C por 16-20 horas
 Lavagem pelo menos duas vezes: 2x-3x SSC a RT a 55°C por 20-30 minutos cada.

25 Em uma forma de realização preferida da invenção dita molécula de ácido nucleico codifica um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos como representado em Figura 8 (SEQ ID NO: 9).

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos representada em

Figura 2 (SEQ ID NO: 2), cuja seqüência foi modificada por adição, deleção ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido caracterizado pelo fato de que dita modificação inclui resíduo de aminoácido 176 caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo é um antagonista de receptor de hormônio de crescimento.

O polipeptídeo da invenção pode diferir em seqüência de aminoácidos por uma ou mais substituições, adições, deleções, truncamentos que podem estar presentes em qualquer combinação que inclui resíduo de aminoácido 176.

Em uma forma de realização preferida da invenção dito polipeptídeo é modificado por substituição de glicina em posição 176 por um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de: histidina, ácido aspártico, valina, arginina, alanina, lisina, triptofano, tirosina, fenilalanina e ácido glutâmico.

Preferivelmente dita substituição é glicina 176 por arginina ou lisina ou alanina; preferivelmente dita modificação é glicina por arginina.

Em uma forma de realização preferida da invenção dito polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos como representado em Figura 8 (SEQ ID NO: 9)

Em adição, a invenção caracteriza seqüências de polipeptídeos tendo pelo menos 75% de identidade com as seqüências de polipeptídeos como descrito neste lugar, ou fragmentos e polipeptídeos funcionalmente equivalentes destes. Em uma forma de realização, os polipeptídeos têm pelo menos 85% de identidade, mais preferivelmente pelo menos 90% de identidade, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% de identidade, ainda mais preferivelmente pelo menos 97% de identidade, e mais preferivelmente pelo menos 99% de identidade com as seqüências de aminoácidos ilustradas neste lugar.

Em uma forma de realização adicional da invenção é fornecido

um polipeptídeo de acordo com a invenção ligado a pelo menos um domínio de ligação extracelular de receptor de hormônio de crescimento para formar uma proteína de fusão; preferivelmente dito domínio de ligação consiste do domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

5 Em uma forma de realização preferida da invenção ditos domínios são ligados através de uma molécula de ligação de peptídeo.

Em uma forma de realização preferida da invenção dita molécula de ligação de peptídeo é um ligante peptídico flexível.

10 Preferivelmente o ligante é um peptídeo que compreende 5 a 30 resíduos de aminoácidos. Mais preferivelmente o ligante compreende 10 a 20 resíduos de aminoácidos.

Mais preferivelmente o ligante compreende pelo menos uma cópia do peptídeo:

15 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (referidos como "Gly4Ser") (SEQ ID NO: 3).

Em uma forma de realização da invenção o ligante é de 10 aminoácidos de comprimento e compreende duas cópias do ligante Gly4Ser. Em uma forma de realização alternativa da invenção, o ligante é 15 aminoácidos de comprimento e compreende três cópias do ligante Gly4Ser.

20 Em uma forma de realização ainda alternativa, o ligante é de 20 aminoácidos de comprimento e compreende quatro cópias do ligante Gly4Ser.

Em pedido co-pendente de requerentes, Patente Internacional 01/096565, que é incorporado por referência em sua totalidade, são descritas proteínas de fusão que fundem traducionalmente o domínio de ligação de
25 ligante de uma citocina ao domínio de ligação de receptor extracelular de dito ligante através de ligantes peptídicos. Estas proteínas de fusão têm depuração atrasada e atividade agonista. Ligantes peptídicos que ligam o polipeptídeo da invenção com outro para formar polipeptídeos oligoméricos (dímeros, trímeros etc) e para domínios de ligação de receptor extracelulares de

hormônio de crescimento são ou flexíveis ou inflexíveis (e.g. helicoidais) ou de flexibilidade intermediária (e.g. um ligante combinacional que é parcialmente helicoidal) como descrito em pedido co-pendente de requerentes Patente Internacional 2006/010891, que é incorporado por referência em sua
5 totalidade. Ligantes também podem conter sítios de clivagem, por exemplo, sítios de clivagem de protease para fornecer polipeptídeos de fusão com características de liberação atrasada; estes são descritos em pedido co-pendente de requerentes Patente Internacional 03/062276 que é incorporado por referência em sua totalidade.

10 De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um polipeptídeo de fusão compreendendo pelo menos dois polipeptídeos de acordo com a invenção ligados em tandem.

Em uma forma de realização preferida da invenção é fornecido um polipeptídeo de fusão compreendendo uma pluralidade de polipeptídeos de acordo com a invenção.
15

Em uma forma de realização preferida adicional da invenção é fornecido um polipeptídeo de fusão consistindo de dois polipeptídeos de acordo com a invenção ligados em tandem.

Em uma forma de realização preferida alternativa da invenção é fornecido um polipeptídeo de fusão compreendendo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 polipeptídeos de acordo com a invenção.
20

Em uma forma de realização preferida ainda adicional da invenção dito polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou pelo menos dois polipeptídeos de acordo com a invenção que são ligados juntos por uma molécula ligante. Preferivelmente dita molécula ligante é como descrito
25 acima.

De acordo com um aspecto ainda adicional da invenção é fornecido um polipeptídeo de fusão compreendendo pelo menos dois polipeptídeos de acordo com a invenção compreendendo adicionalmente pelo

menos um domínio de ligação de hormônio de crescimento de um receptor de hormônio de crescimento.

Preferivelmente dito polipeptídeo de fusão consiste de dois polipeptídeos de acordo com a invenção e um domínio de ligação de hormônio de crescimento de um receptor de hormônio de crescimento.

Em uma forma de realização preferida da invenção dito domínio de ligação compreende um domínio de ligação extracelular de receptor de hormônio de crescimento; preferivelmente dito domínio consiste do domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um polipeptídeo de fusão quimérico compreendendo um polipeptídeo de acordo com a invenção ligado, ou diretamente ou indiretamente, a um polipeptídeo de prolactina.

Em uma forma de realização preferida da invenção dito polipeptídeo de prolactina compreende uma seqüência de aminoácidos caracterizada pelo fato de que dita seqüência de aminoácidos é modificada em posição 129 de prolactina humana como representado em Figura 3 (SEQ ID NO: 7).

Em uma forma de realização preferida da invenção dita modificação em posição 129 como representada em Figura 3 (SEQ ID NO: 7) é uma substituição de aminoácido. Preferivelmente dita substituição substitui resíduo de aminoácido de glicina por resíduo de aminoácido de arginina. Preferivelmente dita modificação compreende adicionalmente a deleção de pelo menos 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 resíduos de aminoácidos amino terminais de prolactina.

Em uma forma de realização preferida adicional da invenção dito polipeptídeo quimérico compreende adicionalmente um domínio de ligação de um receptor de citocina. Preferivelmente dito receptor de citocina é um receptor de hormônio de crescimento.

Em uma forma de realização preferida da invenção dito domínio de ligação compreende um domínio de ligação extracelular de receptor de hormônio de crescimento; preferivelmente dito domínio consiste do domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

5 Em uma forma de realização preferida alternativa da invenção dito receptor é um receptor de prolactina.

Em uma forma de realização preferida da invenção dito domínio de ligação compreende um domínio de ligação extracelular de receptor de prolactina; preferivelmente dito domínio consiste do domínio
10 extracelular de receptor de prolactina.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de fusão ou fusão quimérica de acordo com a invenção.

De acordo com um aspecto da invenção é fornecido um vetor
15 compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a invenção.

Em uma forma de realização preferida da invenção dito vetor é adaptado para a expressão recombinante de dita molécula de ácido nucleico.

Um vetor incluindo ácido(s) nucleico(s) de acordo com a invenção não precisa incluir um promotor ou outra seqüência reguladora,
20 particularmente se o vetor é para ser usado para introduzir o ácido nucleico em células para recombinação no genoma para transfecção estável.

Preferivelmente o ácido nucleico no vetor é operacionalmente ligado a um promotor apropriado ou outros elementos reguladores para transcrição em uma célula hospedeira. O vetor pode ser um vetor de
25 expressão bifuncional que funciona em múltiplos hospedeiros.

Por "promotor" é pretendido uma seqüência de nucleotídeos antes do sítio de início de transcrição e que contém todas as regiões reguladoras requeridas para transcrição. Promotores adequados incluem promotores constitutivos, tecido específicos, induzíveis, de desenvolvimento

ou outros para expressão em células eucarióticas ou procarióticas.

"Operacionalmente ligado" significa unido como parte da mesma molécula de ácido nucleico, adequadamente posicionada e orientada para transcrição a ser iniciado a partir do promotor. DNA operacionalmente
5 ligado a um promotor está "sob regulação de início transcricional" do promotor.

Em uma forma de realização preferida o promotor é um promotor constitutivo, um induzível ou regulável.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido
10 uma célula transfectada ou transformada com uma molécula de ácido nucleico ou vetor de acordo com a invenção.

Preferivelmente dita célula é uma célula eucariótica. Alternativamente dita célula é uma célula procariótica.

Em uma forma de realização preferida da invenção dita célula
15 é selecionada a partir do grupo consistindo de; uma célula fúngica (e.g. *Pichia spp*, *Saccharomyces spp*, *Neurospora spp*); célula de inseto (e.g. *Spodoptera spp*); uma célula de mamífero (e.g. célula COS, célula CHO); uma célula vegetal.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido
20 um método para fabricar um polipeptídeo de acordo com a invenção compreendendo:

- i) fornecer uma célula de acordo com a invenção;
- ii) incubar dita célula em condições conducentes para a produção de dito polipeptídeo; e opcionalmente
- 25 iii) isolar dito polipeptídeo de dita célula ou do meio de crescimento circundando dita célula.

Em um método preferido da invenção dito polipeptídeo é fornecido com uma etiqueta de afinidade de aminoácido para facilitar o isolamento de dito polipeptídeo.

Etiquetas de afinidade são conhecidas na arte e incluem proteína de ligação de maltose, glutathione S transferase, proteína de ligação de calmodulina e a manipulação de trechos de polihistidina em proteínas que são então purificadas por purificação por afinidade em matrizes contendo níquel.

5 Em muitos casos vetores e/ou kits comercialmente disponíveis podem ser usados para fundir uma proteína de interesse a uma etiqueta de afinidade adequada que é subseqüentemente transfectada em uma célula hospedeira para expressão e subseqüente extração e purificação em uma matriz de afinidade.

10 De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um polipeptídeo de acordo com a invenção para uso como produto farmacêutico.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um ácido nucleico de acordo com a invenção para uso como produto
15 farmacêutico.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo de acordo com a invenção.

20 De acordo com um aspecto ainda adicional da invenção é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a invenção. Preferivelmente dita molécula de ácido nucleico é parte de um vetor; preferivelmente um vetor de expressão adaptado para expressão eucariótica.

25 Em uma forma de realização preferida da invenção dito produto farmacêutico ou composição farmacêutica inclui um excipiente ou carreador.

Em uma forma de realização preferida da invenção dito produto farmacêutico ou composição farmacêutica é combinada com um agente terapêutico adicional.

Quando administrados os produtos farmacêuticos/composições da presente invenção é administrado em preparações farmacêuticamente aceitáveis. Tais preparações podem conter rotineiramente concentrações farmacêuticamente aceitáveis de sal, agentes tamponantes, conservantes, 5 carreadores compatíveis, e opcionalmente outros agentes terapêuticos.

Os produtos farmacêuticos/composições da invenção podem ser administrados por qualquer via convencional, incluindo injeção. A administração e aplicação podem, por exemplo, ser oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidade, intra-articular, subcutânea, tópica 10 (olhos), dérmica (e.g um lipídio cremoso solúvel inserido em pele ou membrana mucosa), transdérmica, ou intranasal.

Produtos farmacêuticos/composições da invenção são administrados em quantidades eficazes. Uma "quantidade eficaz" é aquela quantidade de produtos farmacêuticos/composições que sozinha, ou junto 15 com doses adicionais ou drogas sinérgicas, produz a resposta desejada. Isto pode envolver apenas tornar mais lenta a progressão da doença temporariamente, embora mais preferivelmente, isto envolve interromper a progressão da doença permanentemente. Isto pode ser monitorado por métodos de rotina ou pode ser monitorado de acordo com métodos 20 diagnósticos.

As doses dos produtos farmacêuticos/composições administradas a um sujeito podem ser escolhidas em conformidade com diferentes parâmetros, em particular em conformidade com o modo de administração usado e o estado do sujeito (i.e. idade, sexo). Quando 25 administrados, os produtos farmacêuticos/composições da invenção são aplicados em quantidades farmacêuticamente aceitáveis e em composições farmacêuticamente aceitáveis. Tais preparações podem conter rotineiramente sais, agentes tamponantes, conservantes, carreadores compatíveis, e opcionalmente outros agentes terapêuticos. Quando usados em medicina, os

sais devem ser farmacologicamente aceitáveis, mas sais não farmacologicamente aceitáveis podem ser convenientemente usados para preparar sais farmacologicamente aceitáveis destes e não são excluídos do escopo da invenção. Tais sais farmacologicamente e farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, aqueles preparados a partir dos seguintes ácidos: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malônico, succínico, e os semelhantes. Também, sais farmacologicamente aceitáveis podem ser preparados como sais de metal alcalino ou alcalino terroso, tal como sais de sódio, potássio ou cálcio.

Os produtos farmacêuticos/composições podem ser combinados, se desejado, com um carreador farmacologicamente aceitável. O termo "carreador farmacologicamente aceitável" como usado neste lugar significa um ou mais cargas sólidas ou líquidas compatíveis, diluentes ou substâncias encapsulantes que são adequadas para administração em um humano. O termo "carreador" significa um ingrediente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual o ingrediente ativo é combinado para facilitar a aplicação. Os componentes das composições farmacêuticas também são capazes de ser fusionados com as moléculas da presente invenção, e um com o outro, de uma maneira tal que não existe interação que prejudique substancialmente a eficácia farmacêutica desejada.

Os produtos farmacêuticos/composições podem conter agentes tamponantes adequados, incluindo: ácido acético em um sal; ácido cítrico em um sal; ácido bórico em um sal; e ácido fosfórico em um sal.

Os produtos farmacêuticos/composições também podem conter, opcionalmente, conservantes adequados, tal como: cloreto de benzalcônio; clorobutanol; parabenos e timerosal.

As composições farmacêuticas podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer dos métodos bem conhecidos na arte de farmácia. Todos os métodos

incluem a etapa de colocar o agente ativo em associação com um carreador que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as composições são preparadas colocando uniformemente e intimamente o composto ativo em associação com um carreador líquido, um carreador sólido finamente dividido, ou ambos, e então, se necessário, modelando o produto

Composições adequadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades discretas, tal como cápsulas, comprimidos, pastilhas, cada contendo uma quantidade pré-determinada do composto ativo. Outras composições incluem suspensões em líquidos aquosos ou líquidos não aquosos tal como xarope, elixir ou uma emulsão.

Composições adequadas para administração parenteral convenientemente compreendem uma preparação aquosa ou não aquosa estéril que é preferivelmente isotônica com o sangue do destinatário. Esta preparação pode ser formulada de acordo com métodos conhecidos usando agentes dispersantes ou umectantes adequados e agentes suspensores. A preparação injetável estéril também pode ser uma solução injetável estéril ou suspensão em um diluente ou solvente parenteralmente aceitável não tóxico, por exemplo, como uma solução em 1, 3-butanodiol. Entre os solventes aceitáveis que podem ser empregados são água, solução de Ringer, e solução isotônica de cloreto de sódio. Em adição, óleos fixos estéreis são convencionalmente empregados como um solvente ou meio suspensor. Para este propósito qualquer óleo fixo brando pode ser empregado incluindo mono ou diglicerídeos sintéticos. Em adição, ácidos graxos tal como ácido oléico podem ser usados na preparação de injetáveis. Formulação de carreador adequada para administração oral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, etc. pode ser encontrada em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Polipeptídeos/moléculas de ácidos nucleicos etc de acordo com a invenção podem ser incorporadas em lipossomos. Lipossomos são

vesículas baseadas em lipídio que encapsulam um agente terapêutico selecionado que é então introduzido em um paciente. O lipossomo é fabricado a partir ou de fosfolipídio puro ou uma mistura de fosfolipídio e fosfoglicerídeo.

5 Tipicamente lipossomos podem ser fabricados com diâmetros de menos do que 200nm; isto possibilita que eles sejam intravenosamente injetados e capazes de passar através da camada capilar pulmonar. Além disso, a natureza bioquímica de lipossomos confere permeabilidade através de membranas de vasos sanguíneos para ganhar acesso a tecidos selecionados.

10 Lipossomos têm uma meia-vida relativamente curta. Lipossomos assim chamados STEALTH^R foram desenvolvidos que compreendem lipossomos revestidos em polietileno glicol (PEG). Os lipossomos tratados com PEG têm uma meia-vida significativamente aumentada quando administrados intravenosamente a um paciente. Em adição, lipossomos STEALTH^R

15 mostram absorção reduzida no sistema reticuloendotelial e tecidos selecionados de acumulação acentuada. Em adição, assim chamados imunolipossomos foram desenvolvidos que combinam vesículas baseadas em lipídio com um anticorpo ou anticorpos, para aumentar a especificidade da liberação do agente para uma célula/tecido selecionado.

20 O uso de lipossomos como meio de liberação é descrito em Patente Norte-Americana 5580575 e Patente Norte-Americana 5542935.

 De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido o uso do polipeptídeo de acordo com a invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma condição selecionada a partir do

25 grupo consistindo de: gigantismo, acromegalia; câncer (e.g. tumor de Wilm, sarcoma osteogênico, mama, colo, próstata, tireóide); retinopatia diabética; nefropatia diabética e outras complicações de diabetes e excesso de GH.

 De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um método de tratamento de um animal, preferivelmente um humano,

compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um polipeptídeo de acordo com a invenção a dito animal com necessidade de tratamento de uma doença ou condição que iria se beneficiar de inibição de hormônio de crescimento ou atividade prolactina.

5 Exemplos de doenças que iriam se beneficiar da administração do antagonista de polipeptídeo devem ser evidentes para a pessoa versada e podem ser qualquer doença ou condição que envolve a ativação ou ativação aumentada de hormônio de crescimento ou transdução de sinal de receptor prolactina.

10 Em um método preferido da invenção dita doença ou condição é selecionada a partir do grupo consistindo de: gigantismo, acromegalia; câncer (e.g. tumor de Wilm, sarcoma osteogênico, mama, colo, próstata, tireóide); retinopatia diabética; nefropatia diabética e outras complicações de diabetes e excesso de GH.

15 Como usado neste lugar, o termo "câncer" se refere a células tendo a capacidade para crescimento autônomo, i.e., um estado ou condição anormal caracterizada por crescimento celular rapidamente proliferante. O termo é pretendido para incluir todos os tipos de crescimentos cancerosos ou processos oncogênicos, tecidos metastáticos ou células, tecidos, ou órgãos

20 malignamente transformados, independente de tipo histopatológico ou estágio de invasão. O termo "câncer" inclui malignidades dos vários sistemas de órgãos, tal como aquelas afetando, por exemplo, pulmão, mama, tireóide, linfóide, gastrointestinal, e trato geniturinário, assim como adenocarcinomas que incluem malignidades tal como a maioria dos cânceres de colo, carcinoma

25 de célula renal, câncer de próstata e/ou tumores testiculares, carcinoma de célula não pequena do pulmão, câncer do intestino delgado e câncer do esôfago. O termo "carcinoma" é reconhecido na arte e se refere a malignidades de tecidos epiteliais ou endócrinos incluindo carcinomas de sistema respiratório, carcinomas de sistema gastrointestinal, carcinomas de

sistema geniturinário, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas de sistema endócrino, e melanomas. Carcinomas exemplares incluem aqueles que se formam a partir de tecido da

5 “carcinoma” também inclui carcinosarcomas, e.g., o que inclui tumores malignos compostos de tecidos carcinomatosos e sarcomatosos. Um “adenocarcinoma” se refere a um carcinoma derivado de tecido glandular ou no qual as células de tumor formam estruturas glandulares reconhecíveis. O termo “sarcoma” é reconhecido na arte e se refere a tumores malignos de

10 derivação mesenquimal.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um método para modificar a atividade antagonista de um polipeptídeo de acordo com a invenção compreendendo as etapas de:

15 i) fornecer um polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucleico selecionada a partir do grupo consistindo de:

a) uma molécula de ácido nucleico consistindo de a seqüência como representado em Figura 1 (SEQ ID NO: 1);

20 b) uma molécula de ácido nucleico compreendendo seqüências que hibridizam com a seqüência identificada em (a) caracterizada pelo fato de que dita molécula de ácido nucleico inclui uma modificação compreendendo uma seqüência que codifica resíduo de aminoácido 176 caracterizada pelo fato de que dita modificação resulta na adição, substituição ou deleção de pelo menos um resíduo de aminoácido e dita molécula de ácido nucleico codifica um polipeptídeo com atividade agonista de receptor de hormônio de

25 crescimento

ii) mutar um códon que codifica um primeiro resíduo de aminoácido de dito polipeptídeo para produzir um polipeptídeo variante;

iii) determinar a atividade inibidora do polipeptídeo variante com respeito a ativação de receptor de hormônio de crescimento com isso

identificando uma variante funcional de dito polipeptídeo.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um antagonista de polipeptídeo variante obtido ou viável pelo método de acordo com a invenção.

5 De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um método para a concepção racional de mutações em um polipeptídeo compreendendo as etapas de:

i) fornecer um modelo 3D de um primeiro polipeptídeo como representado pela seqüência de aminoácidos em Figura 2 (SEQ ID NO: 2);

10 ii) fornecer um modelo 3D de um polipeptídeo variante caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo variante é uma variante de seqüência modificada de dito primeiro polipeptídeo que é modificado por adição, deleção ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido em Figura 2 (SEQ ID NO: 2);

15 iii) comparar o efeito da mutação no modelo 3D de dito segundo polipeptídeo quando comparado ao modelo 3D de dito primeiro polipeptídeo; e opcionalmente

20 iv) testar os efeitos de dita modificação na ativação de receptor de hormônio de crescimento de dito segundo polipeptídeo quando comparado a dito primeiro polipeptídeo.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é fornecido um homodímero compreendendo polipeptídeos compreendendo primeiro e segundo polipeptídeo caracterizados pelo fato de que ditos polipeptídeos compreendem uma primeira parte que inclui um polipeptídeo de acordo com a
25 invenção, ligada ou diretamente ou indiretamente, a uma segunda parte caracterizada pelo fato de que dita segunda parte compreende o domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

Em uma forma de realização preferida da invenção dita primeira parte compreende a seqüência de aminoácidos como representado

em Figura 2a (SEQ ID NO: 2) caracterizada pelo fato de que dita seqüência de aminoácidos é modificada por adição, deleção ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido em posição 176 e dita segunda parte compreendendo o domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento como representado pela seqüência de aminoácidos em Figura 2b (SEQ ID NO: 4), 2c (SEQ ID NO: 5) ou 2d (SEQ ID NO: 6).

Ao longo da descrição e reivindicações deste relatório, as palavras "compreendem" e "contêm" e variações das palavras, por exemplo, "compreendendo" e "compreende", significa "incluindo mas não limitado a", e não é pretendido para (e não o faz) excluir outras unidades, aditivos, componentes, números inteiros ou etapas.

Ao longo da descrição e reivindicações deste relatório, o singular abrange o plural a menos que de outra maneira requerido pelo contexto. Em particular, onde o artigo indefinido é usado, o relatório deve ser entendido como contemplando pluralidade assim como singularidade, a menos que de outra maneira requerido pelo contexto.

Traços, números inteiros, características, compostos, unidades ou grupos químicos descritos em conjunção com um aspecto, forma de realização ou exemplo particular da invenção devem ser entendidos como sendo aplicáveis a qualquer outro aspecto, forma de realização ou exemplo descrito neste lugar a menos que incompatível com tal.

Uma forma de realização da invenção será agora descrita para exemplo apenas e com referência às figuras seguintes

Figura 1 (SEQ ID NO: 1) é a seqüência de ácidos nucleicos de permutação circular de hormônio de crescimento GHCP07;

Figura 2a (SEQ ID NO: 2) é a seqüência de aminoácidos de permutação circular de hormônio de crescimento GHCP07; Figura 2b (SEQ ID NO: 4) é a seqüência de aminoácidos do domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento; Figura 2c (SEQ ID NO: 5) é a seqüência de

aminoácidos do domínio A de receptor de hormônio de crescimento; Figura 2d (SEQ ID NO: 6) é a seqüência de aminoácidos do domínio B de receptor de hormônio de crescimento.

Figura 3 é a seqüência de aminoácidos de prolactina humana
5 (SEQ ID NO: 7);

Figura 4 é a estratégia usada para permutar circularmente hormônio de crescimento;

Figura 5 (SEQ ID NO: 8) As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos (código de aminoácido de 3 letras) de GHCP07BHis. A mutação de sítio de ligação 2 é mostrada em negrito. A mudança de aminoácido atingida pela mutação é mostrada à direita da seqüência (usando código de aminoácido de 1 letra);
10

Figura 6 SDS-PAGE gel mostrando a purificação de GHCP07BHis; os conteúdos das linhas são mostrados abaixo do gel e a concentração de proteína, em mg/ml, se medida por ensaio de Bradford é mostrada abaixo de cada poço;
15

Figura 7 A) Bioensaio de GHCP07BHis mostrando sua resposta a dose na ausência e presença de 0,5 nmol de rhGH. GHCP07BHis não tem nenhuma atividade por si só e ele antagoniza o efeito de rhGH. B) Comparação da atividade antagonística de GHCP07BHis contra GH.G120R. As atividades de GHCP07BHis e GH.G120R são similares;
20

Figura 8 (SEQ ID NO: 9): As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos (código de aminoácido de 3 letras) de GHCP07CHis. As mutações de sítio de ligação 1 são mostradas sublinhadas e a mutação de sítio de ligação 2 é mostrada em negrito. As mudanças de aminoácidos atingidas pelas mutações são mostradas à direita da seqüência (usando código de aminoácido de 1 letra);
25

Figura 9 SDS-PAGE gel mostrando a purificação de GHCP07CHis; os conteúdos das linhas são mostrados abaixo do gel e a

concentração de proteína, em mg/ml, se medida por ensaio de Bradford é mostrada abaixo de cada poço; e

Figura 10 A) Bioensaio de GHCP07CHis mostrando sua resposta a dose na ausência e presença de 1 nmol de rhGH. GHCP07CHis não tem nenhuma atividade por si só e ele antagoniza o efeito de rhGH. B) Comparação da atividade antagonística de GHCP07CHis contra B2036. As atividades de GHCP07CHis e B2036 são similares.

Definições

Molécula de ácido nucleico: Um nucleotídeo é um monômero de inclui a base ligada a um açúcar, tal como a pirimidina, purina ou análogos sintéticos destes, que quando ligados juntos formam uma molécula de ácido nucleico. Uma seqüência de ácidos nucleicos se refere à seqüência de bases em uma molécula de ácido nucleico.

Polipeptídeo: Um polímero no qual os monômeros são resíduos de aminoácidos que são unidos através de ligações amida. Os termos "polipeptídeo" ou "proteína" como usados neste lugar são pretendidos para abranger qualquer seqüência de aminoácidos e incluir seqüências modificadas tal como glicoproteínas. O termo "polipeptídeo" é especificamente pretendido para abranger proteínas naturalmente ocorrentes, assim como aquelas que são recombinantemente ou sinteticamente produzidas.

Polipeptídeo variante: Uma variante, i.e. um polipeptídeo e polipeptídeo de referência pode diferir em seqüência de aminoácidos por uma ou mais substituições, adições, deleções, truncamentos que podem estar presentes em qualquer combinação. Entre as variantes preferidas estão aquelas que variam de um polipeptídeo de referência por substituições conservativas de aminoácidos. Tais substituições são aquelas que substituem um dado aminoácido por outro aminoácido de caracteres similares. A seguinte lista não limitante de aminoácidos são consideradas substituições conservativas (similares): a) alanina, serina, e treonina; b) ácido glutâmico e

ácido aspártico; c) asparagina e glutamina d) arginina e lisina; e) isoleucina, leucina, metionina e valina e f) fenilalanina, tirosina e triptofano. Mais altamente preferidas são variantes que retêm a mesma função biológica que o polipeptídeo de referência do qual ela varia. Em adição, a invenção caracteriza seqüências de polipeptídeos tendo pelo menos 75% de identidade com as seqüências de polipeptídeos ilustradas em Figura 2, ou fragmentos e polipeptídeos funcionalmente equivalentes destes. Em uma forma de realização, os polipeptídeos têm pelo menos 85% de identidade, mais preferivelmente pelo menos 90% de identidade, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% de identidade, ainda mais preferivelmente pelo menos 97% de identidade, e mais preferivelmente pelo menos 99% de identidade com as seqüências de aminoácidos ilustradas em Figura 2.

Ácido nucleico recombinante: Um ácido nucleico recombinante é um que tem uma seqüência que não é naturalmente ocorrente ou tem uma seqüência que é feita por uma combinação artificial de dois segmentos de outra maneira separados de seqüência. Esta combinação artificial freqüentemente é realizada por síntese química ou, mais comumente, pela manipulação artificial de segmentos isolados de ácidos nucleicos, e.g., por técnicas de engenharia genética. Similarmente, uma proteína recombinante é uma codificada por uma molécula de ácido nucleico recombinante.

Polipeptídeo de fusão: a fusão traducional de pelo menos dois polipeptídeos para formar único polipeptídeo tipicamente fabricado como um polipeptídeo recombinante.

Ligante peptídico: um peptídeo tipicamente curto que pode ser helicoidal e, portanto fornece uma conexão rígida entre polipeptídeos ligados ou flexível e, portanto fornece um grau de movimento rotacional entre polipeptídeos ligados; ou uma combinação de helicoidal e não helicoidal para fornecer algum movimento rotacional entre polipeptídeos ligados. Enquanto

que o fornecimento de uma região helicoidal inflexível mantém a separação especial dos domínios o fornecimento de uma região não helicoidal flexível possibilita que os domínios se orientem nos sítios de ligação do(s) receptor(es) de citocina. Um peptídeo é tipicamente um polímero curto de
5 resíduos de aminoácidos.

Agente terapêutico: Este é usado em um sentido genérico e inclui agentes de tratamento, agentes profiláticos, e agentes de substituição, por exemplo, agentes que aumentam ou acentuam o efeito terapêutico de uma condição que iria se beneficiar da administração dos polipeptídeos da
10 invenção, por exemplo, agentes imunomoduladores ou agentes quimioterapêuticos.

Domínio de ligação extracelular: se refere a uma parte de um receptor de superfície celular que entra em contato com um ligante para efetuar transdução de sinal mediada por receptor. Por exemplo, o domínio
15 extracelular de receptor de hormônio de crescimento existe como dois domínios ligados cada de aproximadamente 100 aminoácidos, o SD-100 C-terminal (domínio B) estando mais perto da superfície celular e o domínio SD-100 N-terminal (domínio A) estando mais afastado. É uma mudança conformacional nestes dois domínios que ocorre em ligação de hormônio de
20 crescimento ou prolactina com a formação do complexo trimérico. Internalização do complexo é seguido por uma etapa de reciclagem através da qual a molécula de receptor é regenerada para uso posterior dentro da célula.

Materiais e Métodos

O antagonista de permutação circular foi sintetizado usando
25 uma estratégia de dois PCRs (Figura 4); o modelo para o PCR foi hormônio de crescimento que havia sido mutado em sítio de ligação 2 (G120R) ou hormônio de crescimento que havia sido mutado tanto em sítio de ligação 1 como 2 (H18D, H21N, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S e I179T). Os iniciadores FOR, LINK e REV usados nas reações de PCR foram

GHPermLink- (5'- tggataaggggaatggtgctgccaccacagag-3' SEQ ID NO: 10), N
de-GHCP07F (5'- aattaattcatatgagccccggactg ggcag-3' SEQ ID NO: 11) e
GHCP07-XhoR (5'-aattctcgagatcttccagcctccccatc-3' SEQ ID NO: 12),
respectivamente. As reações de PCR foram realizadas usando o kit EXPAND
5 PCR (Roche) e as instruções acompanhantes foram seguidas; as temperaturas
de anelamento para o primeiro e segundo PCR foram 55°C e 45°C,
respectivamente. O produto final de PCR foi ligado em pET2 1 a+ (Novagen)
entre os sítios *NdeI* e *XhoI*. O plasmídeo ligado foi então transformado em
células XL1 Blue de *E. coli* quimicamente competentes. Plasmídeos feitos a
10 partir de colônias geradas pela transformação foram inicialmente verificados
por análise de restrição usando *NdeI* e *XhoI*. Clones que produziram
resultados positivos na análise de restrição foram submetidos a
seqüenciamento usando iniciadores de seqüenciamento de promotor T7 e
terminador T7.

15 Um único plasmídeo, com a seqüência correta, foi escolhido e
transformado em BL21 (DE3) de *E. coli*) quimicamente competente. Uma
colônia de BL21 (DE3) de *E. coli* transformada com o plasmídeo foi
escolhida e usada para inocular 20ml de meio LB suplementado com
carbenicilina (100m/m1). Depois de uma incubação com agitação durante a
20 noite a 37°C a cultura foi usada para fornecer um inóculo de 2% para 500ml
de LB suplementado com carbenicilina (100ug/ml); este então foi cultivado
agitando a temperatura ambiente. Quando o OD600 da cultura atingiu ~0,4 a
cultura foi induzida com IPTG, 1mM de concentração final, e então deixada
agitando durante a noite a temperatura ambiente. A cultura foi então
25 centrifugada para pelotizar as células e o sobrenadante descartado.

A pelota celular foi ressuspensa em 15ml de tampão de
Equilíbrio (20mM de Tampão Fosfato, 0,5M de NaCl, 20% de glicerol,
20mM de imidazol, e pH8) e então as células lisadas usando um tratamento de
lisozima/deoxicolato de sódio/sonicação. As células lisadas foram

centrifugadas em alta velocidade para peletizar os componentes insolúveis e o sobrenadante então decantado para um novo tubo. O sobrenadante foi constituído para 20ml usando tampão de Equilíbrio e então passado através de uma seringa de 0,2ml para purificar adicionalmente a amostra.

5 A proteína rotulada com His foi purificada usando cromatografia iônica em metal imobilizado, Resina Probond (Invitrogen) carregada com Ni²⁺ foi usada. 1ml de resina foi carregado em uma coluna e equilibrado com 10 volumes de coluna (CV) de tampão de Equilíbrio. A amostra de proteína purificada foi então carregada na coluna. A coluna foi
10 lavada com tampão de Equilíbrio para 20CV e então com tampão de Lavagem (20mM de Tampão Fosfato, 0,5M de NaCl, 20% de glicerol, pH6) até que o A280 do eluente fosse abaixo de 0,01. Proteína ligada foi então eluída fora da coluna usando tampão de Eluição (20mM de Tampão Fosfato, 0,5M de NaCl, 20% de glicerol, 0,5M de imidazol, pH6), seis frações de 1ml foram coletadas.
15 As frações eluídas foram verificadas para conteúdo por análise em gel SDS-PAGE e por ensaio protéico de Bradford.

Proteína purificada foi submetida ao bioensaio GH; atividade antagonística foi testada considerando estimulação pela proteína de teste apenas e atividade antagonística foi testada considerando a atividade de GH
20 na presença da proteína de teste.

Exemplo

Antagonista de hormônio de crescimento circularmente permutado, GHCP07B (GHCP07 com a mutação em sítio 2), foi gerados por duas reações de PCR, a primeira produziu um produto de -200bp e este foi
25 usado como um 'megainiciador' em uma segunda reação de PCR para produzir o gene de antagonista de hormônio de crescimento circularmente permutado (GHCP07B) de -600bp. O fragmento de DNA de gene GHCP07B foi digerido *NdeI* e *XhoI* e então ligado em pET2 1 a+ que havia sido digerido pelas mesmas enzimas de restrição. Transformação deste em células XL1

Blue de *E. coli* gerou ~500 colônias, sem nenhuma colônia aparecendo na placa de controle negativo (transformada com água apenas).

Três clones foram escolhidos para processamento adicional; minipreps de plasmídeos foram feitos a partir destes clones e o plasmídeo analisado por análise de restrição, todos os três clones geraram um padrão de digestão correto. Estes plasmídeos foram então seqüenciados e a seqüência resultante comparada com a seqüência desejada (Figura 5); dois dos três plasmídeos geraram a seqüência correta. Um destes plasmídeos foi então escolhido para expressar e purificar GHCP07BHis.

O plasmídeo foi transformado em BL21 (DE3) de *E. coli* e cultivado. As células resultantes foram lisadas e proteína rotulada com His purificada a partir da fração solúvel usando uma coluna de Ni-quelado. A proteína eluídas foi analisada por SDS-PAGE e Ensaio Protéico de Bradford (Figura 6); um total de ~25mg de proteína foi purificado para >90% pura.

Eluição 3 da purificação foi usada no bioensaio e um intervalo de dose da atividade de GHCP07BHis foi medido sozinho e também na presença de 0,5nmol de rhGH. Isto mostrou que GHCP07BHis não teve nenhuma atividade agonística e que ele teve atividade antagonística (Figura 7A). A atividade de GHCP07BHis foi comparável com aquela de GH.G12OR (Figura 7B).

Antagonista de hormônio de crescimento circularmente permutado, GHCP07C (GHCP07 com as mutações em sítio 1 e sítio 2), foi gerado e analisado da mesma maneira que GHCP07B. A seqüência de GHCP07C é mostrada em Figura 8; a purificação da proteína é mostrada em Figura 9. Eluição 1 da proteína purificada foi usada no bioensaio. Isto mostrou que GHCP07C não teve nenhuma atividade agonística e era um potente antagonista (Figura 10A) com atividade comparável a B2036 (hormônio de crescimento tanto com as mutações em sítio 1 como sítio 2) (Figura 10B).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Asterion Limited
 <120> Antagonista de polipeptídeo
 <130> 0313P/WO
 <140> PCT/GB2007/001285
 <141> 2007-04-05
 <150> 0606946.2
 <151> 2006-04-06
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 566
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> Hormônio de crescimento permutado circularmente
 <400> 1
 atgagccccg gactgggcag atcttcaagc agacctacag caagttcgac acaaactcac 60
 acaacgatga cgactactc aagaactacg ggctgctcta ctgcttcagg aaggacatgg 120
 acaaggtcga gacattcctg cgatcgtgca gtgccgctct gtggagggca gcaccattcc 180
 cttatccagg ctttttgaca acgctagtct ccgccccat cgtctgcacc agctggcctt 240
 tgacacctac caggagtttg aagaagccta tatcccaaag gaacagaagt attcattcct 300
 gcagaacccc cagacctccc tctgtttctc agagtctatt ccgacacct ccaacagggga 360
 ggaaacacaa cagaaatcca acctagagct gctccgcata tccctgctgc tcatccagtc 420
 gtggctggag cccgtgcagt tcctcaggag tgtcttcgcc aacagcctgg tgtacggcgc 480
 ctctgacagc aacgtctatg acctcctaaa ggacctagag gaagggcatc caaacgctga 540
 tggggaggct ggaagatctc gactga 566
 <210> 2
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Hormônio de crescimento permutado circular
 <400> 2
 Met Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe
 1 5 10 15

Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu
 20 25 30

Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg
 35 40 45

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

Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala
 65 70 75 80

Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln
 85 90 95

Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu
 100 105 110

Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn
 115 120 125

Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu
 130 135 140

Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly
 145 150 155 160

Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly
 165 170 175

Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Leu Glu
 180 185

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> peptideo ligador

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 4
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala Pro Trp
 1 5 10 15

Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser Lys Glu
 20 25 30

Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys
 35 40 45

His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile
 50 55 60

Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp
 65 70 75 80

Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe
 85 90 95

Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr
 100 105 110

Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile
 115 120 125

Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val
 130 135 140

Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro
 145 150 155 160

Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu
 165 170 175

Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile
 180 185 190

Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr
 195 200 205

Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu
 210 215 220

Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln Phe Thr
 225 230 235 240

Cys Glu Glu Asp Phe Tyr
245

<210> 5
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala Pro Trp
1 5 10 15

Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser Lys Glu
20 25 30

Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys
35 40 45

His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile
50 55 60

Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp
65 70 75 80

Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe
85 90 95

Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr
100 105 110

Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp
115 120 125

<210> 6
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu
1 5 10 15

Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu
20 25 30

Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr
35 40 45

Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que compreende uma seqüência como representado em SEQ ID NO: 1 que codifica um polipeptídeo como representado em SEQ ID NO: 2, em que a seqüência de aminoácidos é modificada para incluir uma adição, deleção ou substituição de aminoácido de resíduo de aminoácido 176.

2. Molécula de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que compreende uma seqüência como representado em SEQ ID NO: 1 que codifica um polipeptídeo como representado em SEQ ID NO: 2.

3. Molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que codifica um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos como representado em SEQ ID NO: 9.

4. Molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizada pelo fato de que dita molécula codifica um polipeptídeo antagonista de hormônio de crescimento.

5. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende a seqüência de aminoácidos representada em SEQ ID NO: 2, cuja seqüência foi modificada por adição, deleção ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido, em que dita modificação inclui resíduo de aminoácido 176 e em que dito polipeptídeo é um antagonista de receptor de hormônio de crescimento.

6. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo é modificado por substituição de glicina em posição 176 com um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de: histidina, ácido aspártico, valina, arginina, alanina, lisina, triptofano, tirosina, fenilalanina e ácido glutâmico.

7. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que arginina ou lisina ou alanina são substituídas por resíduo de glicina 176.

8. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que dita modificação é glicina por arginina.

9. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-8, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo é representado pela seqüência de aminoácidos em SEQ ID NO: 9.

10. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-9, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo é ligado a um segundo polipeptídeo compreendendo o domínio de ligação extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

11. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que dito segundo polipeptídeo consiste do domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

12. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que dito segundo polipeptídeo consiste da seqüência de aminoácidos como representado em SEQ ID NO: 4.

13. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que dito domínio extracelular é o domínio A do domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento consistindo da seqüência de aminoácidos como representado em SEQ ID NO: 5.

14. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que dito domínio extracelular é o domínio B do domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento consistindo da seqüência de aminoácidos como representado em SEQ ID NO: 6.

15. Polipeptídeo de fusão, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos dois polipeptídeos como definidos em qualquer uma das reivindicações 5-9 ligados em tandem.

16. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo de fusão consiste de dois polipeptídeos ligados em tandem.

17. Polipeptídeo de fusão, caracterizado pelo fato de que compreende uma pluralidade de polipeptídeos como definido em qualquer uma das reivindicações 5-9.

5 18. Polipeptídeo de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-17, caracterizado pelo fato de que ditos polipeptídeos são ligados juntos por uma molécula ligante peptídico.

19. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que dita molécula de ligação de peptídeo é um ligante peptídico flexível.

10 20. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que o ligante é um peptídeo que consiste de 5 a 30 resíduos de aminoácidos.

15 21. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o ligante peptídico consiste de 10 a 20 resíduos de aminoácidos.

22. Polipeptídeo de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 18-20, caracterizado pelo fato de que o ligante compreende pelo menos uma cópia do peptídeo:

20 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (referidos como Gly4Ser) (SEQ ID NO: 3).

23. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o ligante peptídico é de 10 aminoácidos de comprimento e compreende duas cópias do Gly4Ser.

25 24. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o ligante peptídico é de 15 aminoácidos de comprimento e compreende três cópias do Gly4Ser.

25. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o ligante peptídico é de 20 aminoácidos de comprimento e compreende quatro cópias do ligante Gly4Ser.

26. Polipeptídeo de fusão, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos dois polipeptídeos como definidos em qualquer uma das reivindicações 5-9, em que dito polipeptídeo compreende adicionalmente pelo menos um domínio de ligação extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

27. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo de fusão consiste de dois polipeptídeos como definidos em qualquer uma das reivindicações 5-9 e um domínio de ligação extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

28. Polipeptídeo de fusão quimérico, caracterizado pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 5-9 ligado, ou diretamente ou indiretamente, a um polipeptídeo de prolactina.

29. Polipeptídeo de fusão quimérico de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo de prolactina compreende uma seqüência de aminoácidos em que dita seqüência de aminoácidos é modificada em posição 129 de prolactina humana como representado em SEQ ID NO 7, ou um aminoácido equivalente em um polipeptídeo de prolactina alternativo.

30. Polipeptídeo de fusão quimérico de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que dita modificação em posição 129 como representado em SEQ ID NO: 7 é uma substituição de aminoácido.

31. Polipeptídeo de fusão quimérico de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que dita substituição substitui resíduo de aminoácido de glicina com resíduo de aminoácido de arginina.

32. Polipeptídeo de fusão quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações 28-31, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo de prolactina compreende adicionalmente a deleção de pelo menos 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 resíduos de aminoácidos amino terminais.

33. Polipeptídeo de fusão quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações 29-32, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo compreende adicionalmente um domínio de ligação de ligante de um receptor de citocina.

5 34. Polipeptídeo de fusão quimérico de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que dito receptor de citocina compreende um domínio de ligação extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

10 35. Polipeptídeo de fusão quimérico de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que dito receptor de citocina compreende um domínio de ligação extracelular de receptor de prolactina.

36. Polipeptídeo de fusão quimérico de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que dito receptor de citocina consiste do domínio extracelular de receptor de hormônio de crescimento.

15 37. Polipeptídeo de fusão quimérico de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que dito receptor de citocina consiste do domínio extracelular de receptor de prolactina.

20 38. Molécula de ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica um polipeptídeo de fusão ou quimérico como definido em qualquer uma das reivindicações 10-37.

39. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 ou 38.

25 40. Vetor de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que dito vetor é adaptado para a expressão recombinante de dita molécula de ácido nucleico.

41. Célula, caracterizada pelo fato de ser transfectada com uma molécula de ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 ou 38, ou um vetor como definido na reivindicação 39 ou

40.

42. Célula, caracterizada pelo fato de ser transformada com uma molécula de ácido nucleico como definida em qualquer uma das reivindicações 1-3 ou 38, ou um vetor como definido na reivindicação 39 ou
5 40.

43. Célula de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que dita célula é uma célula eucariótica.

44. Célula de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que dita célula é uma célula procariótica.

10 45. Método para a fabricação de um polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende:

i) fornecer uma célula como definida em qualquer uma das reivindicações 41-44;

15 ii) incubar dita célula em condições conducentes para a produção de dito polipeptídeo; e opcionalmente

iii) isolar dito polipeptídeo de dita célula ou do meio de crescimento circundando dita célula.

20 46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo é fornecido com uma etiqueta de afinidade de aminoácido para facilitar o isolamento de dito polipeptídeo.

47. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-37, caracterizado pelo fato de ser para uso como produto farmacêutico.

25 48. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3 ou 38, caracterizado pelo fato de ser para uso como produto farmacêutico.

49. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 3-36 e incluindo um excipiente ou carreador.

50. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma molécula de ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 ou 38 e incluindo um excipiente ou carreador.

51. Composição de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de que dita molécula de ácido nucleico é parte de um vetor.

52. Composição de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de que dito vetor é um vetor de expressão adaptado para expressão eucariótica.

53. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 49-52, caracterizada pelo fato de que dita composição é combinada com um agente terapêutico adicional.

54. Uso do polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 5-37, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma condição selecionada a partir do grupo consistindo de: gigantismo, acromegalia, câncer; retinopatia diabética; nefropatia diabética e outras complicações de diabetes e excesso de GH.

55. Método para o tratamento de um animal, caracterizado pelo fato de compreender administrar uma quantidade eficaz de um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 5-37 a dito animal com necessidade de tratamento de uma doença ou condição que iria se beneficiar de inibição de hormônio de crescimento ou atividade prolactina.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que dita doença ou condição é selecionada a partir do grupo consistindo de: gigantismo, acromegalia, câncer; retinopatia diabética; nefropatia diabética e outras complicações de diabetes e excesso de GH.

57. Método para a modificação da atividade antagonista de um polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

i) fornecer um polipeptídeo codificado por uma molécula de

ácido nucleico compreendendo a seqüência de ácidos nucleicos como representado em SEQ ID NO: 1; e

ii) mutar um códon que codifica um primeiro resíduo de aminoácido de dito polipeptídeo para produzir um polipeptídeo variante.

5 58. Antagonista de polipeptídeo variante, caracterizado pelo fato de ser obtido ou viável pelo método como definido na reivindicação 57.

59. Método para a concepção racional de mutações em um polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

10 i) fornecer um modelo 3D de um primeiro polipeptídeo como representado pela seqüência de aminoácidos em SEQ ID NO: 2;

ii) fornecer um modelo 3D de um polipeptídeo variante em que dito polipeptídeo variante é uma variante de seqüência modificada de dito primeiro polipeptídeo que é modificado por adição, deleção ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido como representado em SEQ ID NO: 2;

15 iii) comparar o efeito da mutação no modelo 3D de dito segundo polipeptídeo quando comparado ao modelo 3D de dito primeiro polipeptídeo; e opcionalmente; e

20 iv) testar os efeitos de dita modificação em ativação de receptor de hormônio de crescimento pelo segundo polipeptídeo quando comparado ao primeiro polipeptídeo.

60. Homodímero, caracterizado pelo fato de que compreende dois polipeptídeos como definido em qualquer uma das reivindicações 10-14

FIGURA 1

GH132 → GH130.

ATGAGCCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACA
CAAACCTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTG
CTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGC
CGCTCTGTGGAGGGCAGCACCATTCCCTTATCCAGGCTTTTTGACAACGCTAG
TCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTG
AAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCCTGCAGAACCCCA
GACCTCCCTCTGTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAA
CACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCA
GTCGTGGCTGGAGCCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTG
GTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGG
AAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATCTCGAGTGA

FIGURA 2a

MSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRS
VEGSTIPLSRLFDNASLRAHRLHQLAFDQYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCF
SESIPTPSNREETQOKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVY
DLLKDLEEGIQTLMGRLEDLE

176

FIGURA 2b

Domínio extracelular de GHR

FSGSEATAAAILSRAPWSLQSVNPGLKTNSSKEPKFTKCRSPERETF SCHWTDEVHHGTKNLGPIQLFYT
RRNTQEW TQEWKECPDYVSAGENSCYFNSSFTSIWIPYCIKLT SNGGTVDEKCF SVDEIVQDPPIALN
WTLNVS LTGIHADIQVRWEAPRNADIQKGW MVLEYELQYKEVNETKWKMDPILTT SVPVYSLKVDKE
YEVVR SKQRNSGNYGEFSEVLYV TLPQMSQFTCEEDFY

FIGURA 2c

Domínio A de GHReX

FSGSEATAAAILSRAPWSLQSVNPGLKTNSSKEPKFTKCRSPERETF SCHWTDEVHHGTKNLGPIQLFYT
RRNTQEW TQEWKECPDYVSAGENSCYFNSSFTSIWIPYCIKLT SNGGTVDEKCF SV D

FIGURA 2d

Domínio B de GHReX

EIVQDPPIALN WTLNVS LTGIHADIQVRWEAPRNADIQKGW MVLEYELQYKEVNETKWKMDPILTT
SVPVYSLKVDKEYEVVR SKQRNSGNYGEFSEVLYV TLPQMSQFTCEEDFY

FIGURA 3

Seqüência de Aminoácidos Nativa

LPICPGGAARCQVTLRDLFDRAVVL~~SHYIHNLSSEMFSEFDKRYTHGRGFITKAINSCHTSSLATPEDKEQ~~
AQMNQKDFLSLIVSILRSWNEPLYHLVTEVRGMQEAP~~EAILSKAVEIEEQTKRLL~~EGMELIVSQVHPETK
ENEIYPVWSGLPSLQMADEESRLSAYYNLLHCLRRDSHKIDNYLKLLKCR~~IIHNNNC~~

Seqüência de Aminoácidos Modificada

LRDLFDRAVVL~~SHYIHNLSSEMFSEFDKRYTHGRGFITKAINSCHTSSLATPEDKEQ~~AQMNQKDFLSLIV
SILRSWNEPLYHLVTEVRGMQEAP~~EAILSKAVEIEEQTKRLL~~ERMELIVSQVHPETKENEIYPVWSGLPSL
QMADEESRLSAYYNLLHCLRRDSHKIDNYLKLLKCR~~IIHNNNC~~

HisMetSer ProArgThrGly GlnIlePhe LysGlnThr TyrSerLysPhe·
 CATATGAGC CCCC GGACTG GGCAGATCTT CAAGCAGACC TACAGCAAGT

·PAspThrAsn SerHisAsn AspAspAlaLeu LeuLysAsn TyrGlyLeu
 TCGACACAAA CTCACACAAC GATGACGCAC TACTCAAGAA CTACGGGCTG

LeuTyrCysPhe ArgLysAsp MetAspLys ValGluThrPhe LeuArgIle·
 CTCTACTGCT TCAGGAAGGA CATGGACAAG GTCGAGACAT TCCTGCGCAT

·ValGlnCys ArgSerValGlu GlySerThr IleProLeu SerArgLeuPhe·
 CGTGCACTGC CGCTCTGTGG AGGGCAGCAC CATTCCCTTA TCCAGGCTTT

·PAspAsnAla SerLeuArg AlaHisArgLeu HisGlnLeu AlaPheAsp
 TTGACAACGC TAGTCTCCGC GCCCATCGTC TGCACCAGCT GGCCTTTGAC

ThrTyrGlnGlu PheGluGlu AlaTyrIle ProLysGluGln LysTyrSer·
 ACCTACCAGG AGTTTGAAGA AGCCTATATC CCAAAGGAAC AGAAGTATTC

·PheLeuGln AsnProGlnThr SerLeuCys PheSerGlu SerIleProThr·
 ATTCTGCAG AACCCCCAGA CCTCCCTCTG TTTCTCAGAG TCTATTCCGA

·TProSerAsn ArgGluGlu ThrGlnGlnLys SerAsnLeu GluLeuLeu
 CACCCTCCAA CAGGGAGGAA ACACAACAGA AATCCAACCT AGAGCTGCTC

ArgIleSerLeu LeuLeuIle GlnSerTrp LeuGluProVal GlnPheLeu·
 CGCATCTCCC TGCTGCTCAT CCAGTCGTGG CTGGAGCCCG TGCAGTTCCT

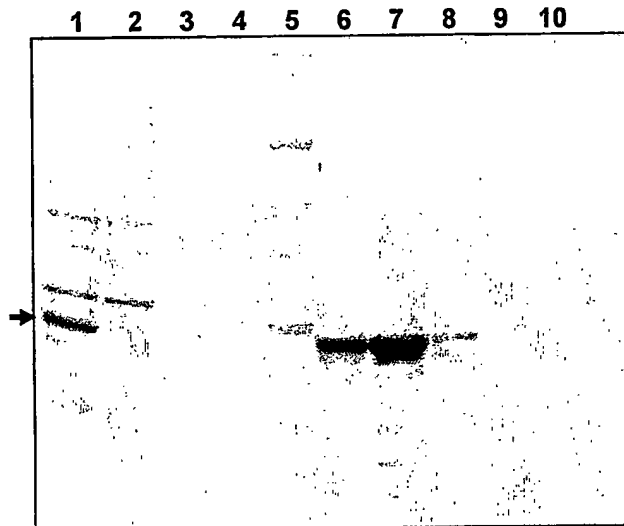
·ArgSerVal PheAlaAsnSer LeuValTyr GlyAlaSer AspSerAsnVal·
 CAGGAGTGTC TTCGCCAACA GCCTGGTGTA CGGCGCCTCT GACAGCAACG

·VTyrAspLeu LeuLysAsp LeuGluGluArg IleGlnThr LeuMetGly
 TCTATGACCT CCTAAAGGAC CTAGAGGAAC GCATCCAAAC GCTGATGGGG

ArgLeuGluAsp LeuGluHis HisHisHis HisHis***
 AGGCTGGAAG ATCTCGAGCA CCACCACCAC CACCACTGA

G>R

FIGURA 5

FIGURA 6

- 6 4 0.01 0 4 21 0.7 0.1 0.04
- 1 GHSP07BHis Solúvel/LOAD (2,5µl de 20ml)
 - 2 GHSP07BHis FT (2,5µl de 20ml)
 - 3 Lavagem pH8 (10µl de 20ml)
 - 4 Lavagem pH6 (10µl de 20ml)
 - 5 Marcadores 250,150,100,75,50,37,25, 20,15,10 kDa
 - 6 Eluição 1 (2,5µl de 1ml)
 - 7 Eluição 2 (2,5µl de 1ml)
 - 8 Eluição 3 (2,5µl de 1ml)
 - 9 Eluição 4 (2,5µl de 1ml)
 - 10 Eluição 5 (2,5µl de 1ml)

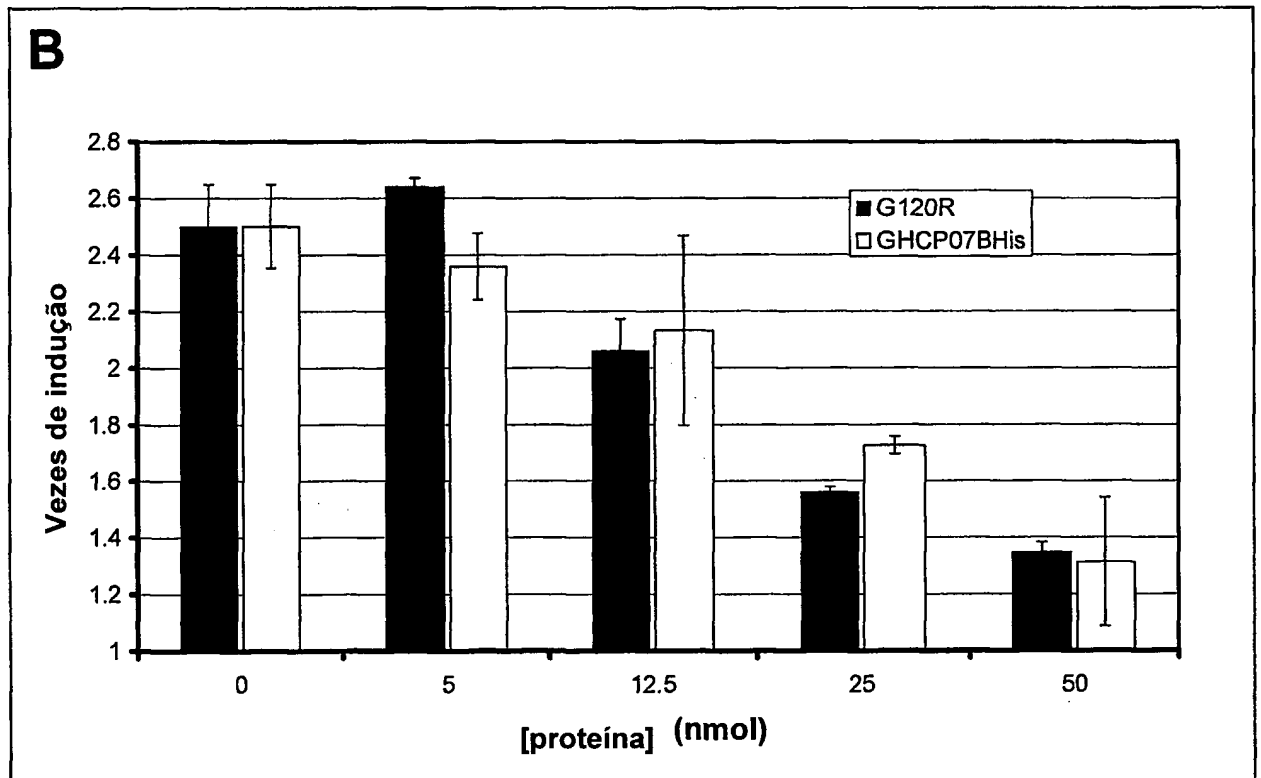
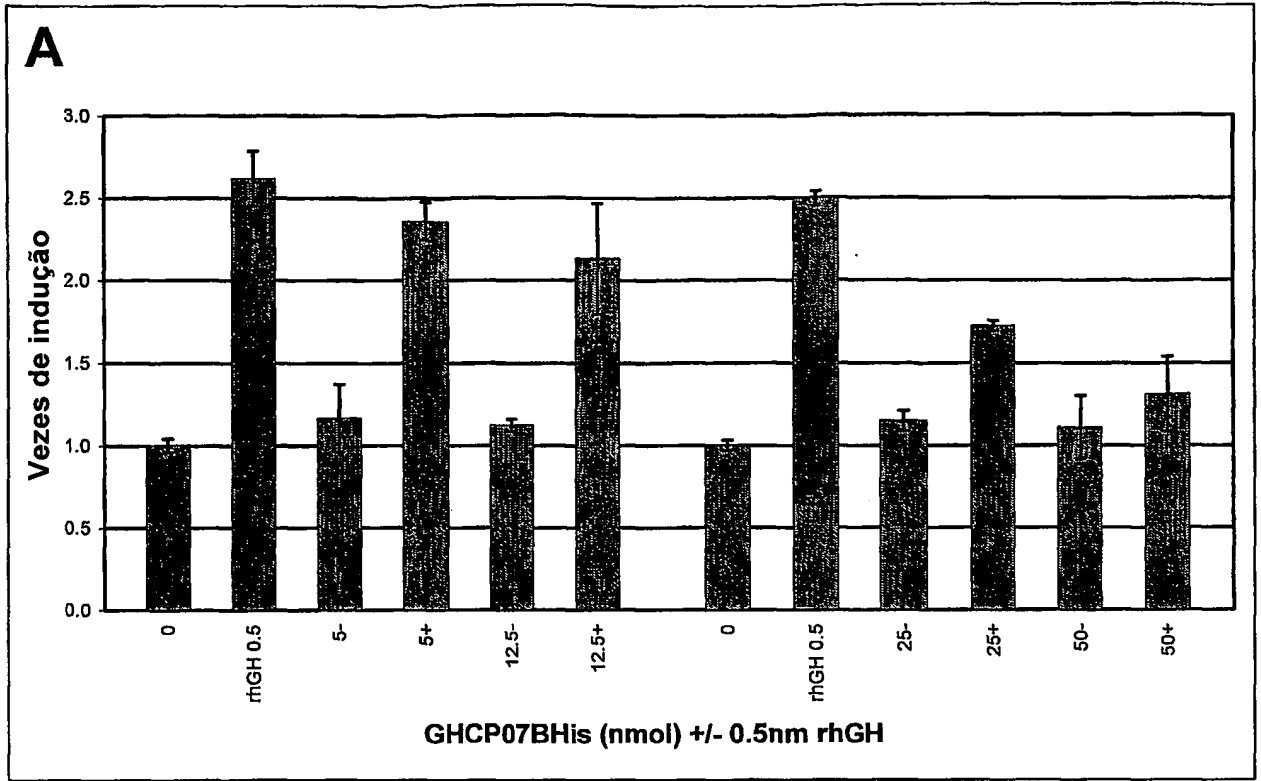


FIGURA 7

MetSer ProArgThrGly GlnIlePhe LysGlnThr TyrSerLysPhe·
 ATGAGC CCCC GGACTG GGCAGATCTT CAAGCAGACC TACAGCAAGT

·PAspThrAsn SerHisAsn AspAspAlaLeu LeuLysAsn TyrGlyLeu
 TCGACACAAA CTCACACAAC GATGACGCAC TACTCAAGAA CTACGGGCTG

LeuTyrCysPhe GlnAlaAsp MetSerArg ValSerThrPhe LeuArgThr· R>N; K>A; D>S
 CTCTACTGCT TCAACGCCGA CATGTCAAGG GTCTCAACAT TCCTGCGCAC K>R; E>S; I>T

·ValGlnCys ArgSerValGlu GlySerThr IleProLeu SerArgLeuPhe·
AGTGCAGTGC CGCTCTGTGG AGGGCAGCAC CATTCCCTTA TCCAGGCTTT

·PAspAsnAla SerLeuArg AlaAspArgLeu GlnGlnLeu AlaPheAsp H>D; H>N
 TTGACAACGC TAGTCTCCGC GCCGACCGTC TGAACCAGCT GGCCTTTGAC

ThrTyrGlnGlu PheGluGlu AlaTyrIle ProLysGluGln LysTyrSer·
 ACCTACCAGG AGTTTGAAGA AGCCTATATC CCAAAGGAAC AGAAGTATTC

·PheLeuGln AsnProGlnThr SerLeuCys PheSerGlu SerIleProThr·
 ATTCTGCAG AACCCCAGA CCTCCCTCTG TTTCTCAGAG TCTATTCCGA

·TProSerAsn ArgGluGlu ThrGlnGlnLys SerAsnLeu GluLeuLeu
 CACCCTCCAA CAGGGAGGAA ACACAACAGA AATCCAACCT AGAGCTGCTC

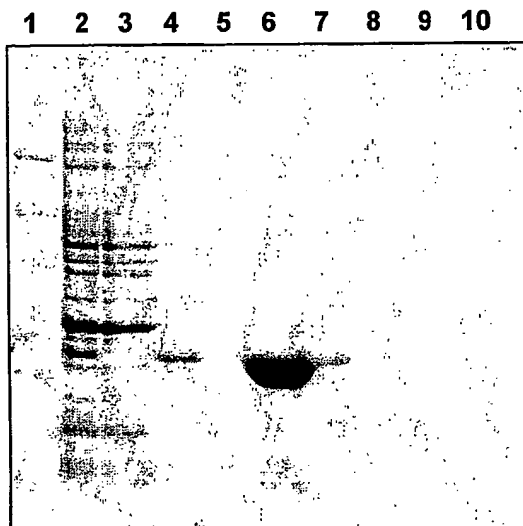
ArgIleSerLeu LeuLeuIle GlnSerTrp LeuGluProVal GlnPheLeu·
 CGCATCTCCC TGCTGCTCAT CCAGTCGTGG CTGGAGCCCG TGCAGTTCCT

·ArgSerVal PheAlaAsnSer LeuValTyr GlyAlaSer AspSerAsnVal·
 CAGGAGTGTC TTCGCCAACA GCCTGGTGTA CGGCGCCTCT GACAGCAACG

·VTyrAspLeu LeuLysAsp LeuGluGluArg IleGlnThr LeuMetGly G>R
 TCTATGACCT CCTAAAGGAC CTAGAGGAAC GCATCCAAAC GCTGATGGGG

ArgLeuGluAsp LeuGlu***
 AGGCTGGAAG ATCTCGAGTGA

FIGURA 4

FIGURA 9

15 14.7 0.5 0 12.4 0.55 0 0 0

1 Marcadores 250,150,100,75,50,37,25,
20,15,10 kDa

2 GHSP07BHis Solúvel/LOAD (2,5 μ l de 20ml)

3 GHSP07BHis FT (2,5 μ l de 20ml)

4 Lavagem pH8 (10 μ l de 20ml)

5 Lavagem pH6 (10 μ l de 20ml)

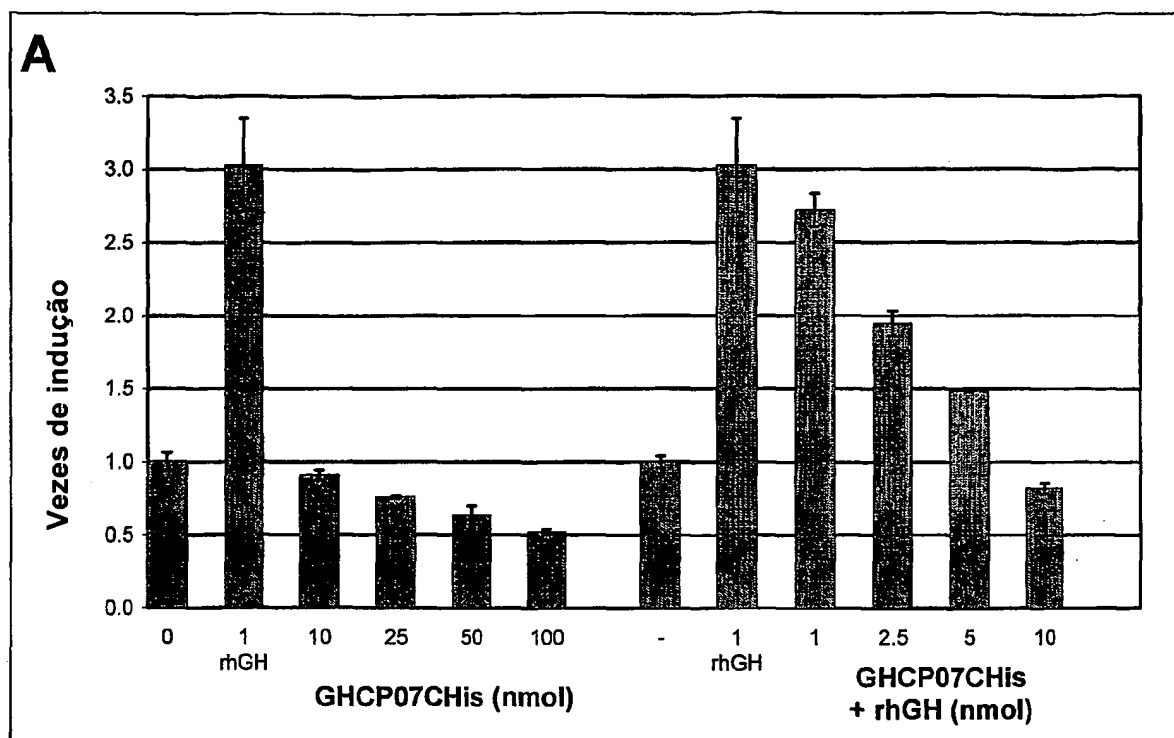
6 Eluição 1 (2,5 μ l de 1ml)

7 Eluição 2 (2,5 μ l de 1ml)

8 Eluição 3 (2,5 μ l de 1ml)

9 Eluição 4 (2,5 μ l de 1ml)

10 Eluição 5 (2,5 μ l de 1ml)



B

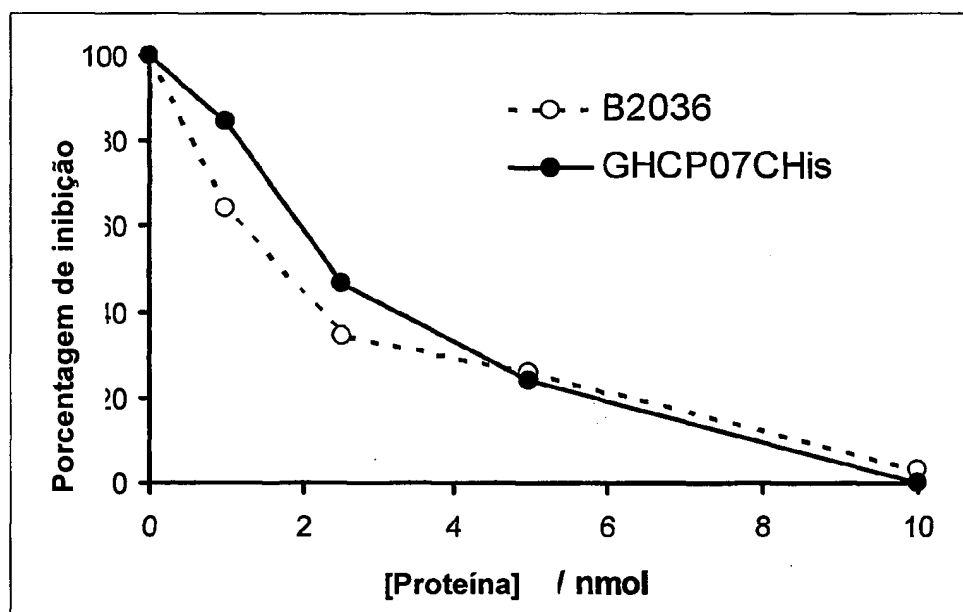


FIGURA 10

RESUMO

“MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, POLIPEPTÍDEO, VETOR, CÉLULA, MÉTODOS PARA A FABRICAÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, PARA O TRATAMENTO DE UM ANIMAL, PARA A MODIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE UM POLIPEPTÍDEO, E PARA A CONCEPÇÃO RACIONAL DE MUTAÇÕES EM UM POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO POLIPEPTÍDEO, ANTAGONISTA DE POLIPEPTÍDEO VARIANTE, E, HOMODÍMERO”

Os requerentes descrevem um antagonista de polipeptídeo de hormônio de crescimento circularmente permutado; composições compreendendo dito antagonista e métodos para tratar condições que iriam se beneficiar de administração de dito antagonista.

A requerente apresenta novas vias da página 26 do relatório descritivo e também da listagem de seqüência para melhor esclarecer e definir o presente pedido.

GHPermLink- (5'- tggataagggaatggtgctgccctccacagag-3' SEQ ID NO: 12), N de-GHCP07F (5'- aattaattcatatgagccccggactgggcag-3' SEQ ID NO: 13) e GHCP07-XhoR (5'-aattctcgagatcttccagcctcccatc-3' SEQ ID NO: 14), respectivamente. As reações de PCR foram realizadas usando o kit EXPAND
5 PCR (Roche) e as instruções acompanhantes foram seguidas; as temperaturas de anelamento para o primeiro e segundo PCR foram 55°C e 45°C, respectivamente. O produto final de PCR foi ligado em pET2 1 a+ (Novagen) entre os sítios *NdeI* e *XhoI*. O plasmídeo ligado foi então transformado em células XL1 Blue de *E. coli* quimicamente competentes. Plasmídeos feitos a
10 partir de colônias geradas pela transformação foram inicialmente verificados por análise de restrição usando *NdeI* e *XhoI*. Clones que produziram resultados positivos na análise de restrição foram submetidos a seqüenciamento usando iniciadores de seqüenciamento de promotor T7 e terminador T7.

15 Um único plasmídeo, com a seqüência correta, foi escolhido e transformado em BL21 (DE3) de *E. coli*) quimicamente competente. Uma colônia de BL21 (DE3) de *E. coli* transformada com o plasmídeo foi escolhida e usada para inocular 20ml de meio LB suplementado com carbenicilina (100m/m1). Depois de uma incubação com agitação durante a
20 noite a 37°C a cultura foi usada para fornecer um inóculo de 2% para 500ml de LB suplementado com carbenicilina (100ug/m1); este então foi cultivado agitando a temperatura ambiente. Quando o OD600 da cultura atingiu -0,4 a cultura foi induzida com IPTG, 1mM de concentração final, e então deixada agitando durante a noite a temperatura ambiente. A cultura foi então
25 centrifugada para pelotizar as células e o sobrenadante descartado.

A pelota celular foi ressuspensa em 15ml de tampão de Equilíbrio (20mM de Tampão Fosfato, 0,5M de NaCl, 20% de glicerol, 20mM de imidazol, e pH8) e então as células lisadas usando um tratamento de lisozima/deoxicolato de sódio/sonicação. As células lisadas foram