República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 122017015900-3 A2

(22) Data do Depósito: 07/05/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 12/11/2009

(54) Título: ÁCIDO NUCLEICO E CÉLULAS

(51) Int. Cl.: C07K 19/00; C07K 14/475.

(30) Prioridade Unionista: 07/05/2008 US 61/051,336; 12/01/2009 US 61/144,106.

(71) Depositante(es): BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC..

(72) Inventor(es): JONATHAN H. LEBOWITZ; JOHN MAGA.

(86) Pedido PCT: PCT US2009043207 de 07/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/137721 de 12/11/2009

(85) Data da Fase Nacional: 25/07/2017

(62) Pedido original do dividido: PI0912225-7 - 07/05/2009

(57) Resumo: ÁCIDO NUCLEICO E CÉLULAS A presente invenção refere-se a composições ainda melhores e a métodos para direcionamento lisossomal eficiente baseado na tecnolgia GILT. Entre outras coisas, a presente invenção refere-se a métodos e a composições para direcionar enzimas lisossomais usando peptídeos de direcionamento lisossomais resistentes à furina. A presente invenção também serefere a métodos e a composições para direcionar enzimas lisossomais a lisossomos usando um peptídeo de direcionamento lisossomal que reduziu ou diminuiu a afinidade de ligação pelo receptor de insulina.

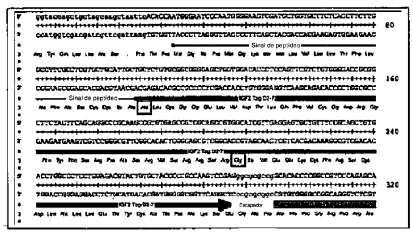


Fig. 1. Mapa do término N do ZC-701. Dois resíduos de aminoácidos em vermelho são locais de eventos de divisão. O primeiro é o local da divisão do peptídeo de sinal, o segundo é o local da divisão da furina.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ÁCIDO NUCLEICO E CÉLULAS".**

REFERÊNCIA A APLICAÇÕES RELACIONADAS

[001] Dividido do PI0912225-7, depositado em 07.05.2009.

[002] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 61/051.336, depositado em 7 de maio de 2008; e Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 61/144.106, depositado em 12 de janeiro de 2009, os conteúdos de cada um dos quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

ANTECEDENTE

[003] Normalmente, enzimas lisossomais de mamíferos são sintetizadas no citosol e atravessam o RE, onde são glicosiladas com carboidrato N-ligado, do tipo alto em manose. No complexo de Golgi, o carboidrato alto em manose é modificado em proteínas lisossomais pela adição de manose-6-fosfato (M6P), que direciona essas proteínas para o lisossomo. As proteínas M6-P modificadas são liberadas no lisossomo via interação com dois receptores M6P. A forma mais favorável de modificação é quando dois M6P são adicionados a um carboidrato alto em manose.

[004] Mais de quarenta doenças de armazenamento de lisossomos (LSDs) são causadas, diretamente ou indiretamente, pela ausência de uma ou mais enzimas lisossomais no lisossomo. A terapia de substituição de enzimas para LSDs está sendo buscada ativamente. A terapia geralmente requer que proteínas do LSD sejam tomadas e liberadas para os lisossomos de uma variedade de tipos celulares em uma tendência dependente do M6P. Uma abordagem possível envolve purificar uma proteína do LSD e modificá-la para incorporar uma porção de carboidrato com M6P. Este material modificado pode ser tomado pelas células mais eficientemente do que proteínas de LSD não modificado devido à interação com receptores de M6P na superfície celular.

[005] Os inventores do presente pedido previamente desenvolveram uma tecnologia de base direcionada que permite um fornecimento mais eficiente de enzimas terapêuticas aos lisossomos. Esta tecnologia de propriedade é denominada Glicosilação Independente de Direcionamento Lisossomal (GILT) porque um marcador de peptídeo substitui o M6P como a porção direcionada aos lisossomos. Detalhes da tecnologia GILT são descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. nºs 2003-0082176, 2004-0006008, 2003-0072761, 2005-0281805, 2005-0244400, e publicações internacionais WO 03/032913, WO 03/032727, WO 02/087510, WO 03/102583, WO 2005/078077, cujas descrições são aqui incorporadas por referência.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente invenção fornece composições e métodos mais aprimorados para direcionamento lisossomal eficiente baseado na tecnologia GILT. Entre outras coisas, a presente invenção fornece métodos e composições tendo como alvo enzimas lisossomais para lisossomos usando peptídeos de lisossomos resistentes à furina. A presente invenção também fornece métodos e composições para direcionar enzimas lisossomais para lisossomos usando um peptídeo de direcionamento lisossomal que reduziu ou diminuiu a afinidade de ligação pelo receptor de insulina. A presente invenção engloba descobertas inesperadas de que os peptídeos de direcionamento lisossomais resistentes à furina de acordo com a invenção reduziu a afinidade de ligação pelo receptor de insulina.

[007] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma muteína IGF-II resistente à furina. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma muteína IGF-II resistente à furina que possui uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica à IGF-II madura humana (SEQ ID NO:1) e uma mutação que elimina pelo menos um sítio de clivagem de furina protease.

[008] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma muteína IGF-II compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica a IGF-II madura humana (SEQ ID NO:1) e uma mutação que reduz ou diminui a afinidade de ligação pelo receptor de insulina como comparada a IGF-II humana do tipo selvagem.

[009] Em algumas modalidades, a muteína IGF-II resistente à furina diminuiu a afinidade de ligação pelo receptor IGF-I relativo à afinidade de IGF-II que ocorre naturalmente em seres humanos pelo receptor de IGF-I.

[0010] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma proteína de fusão terapêutica contendo uma enzima lisossomal; e uma muteína IGF-II que possui uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica à IGF-II humana madura (SEQ ID NO:1), em que a muteína IGF-II é resistente à clivagem de furina e se liga ao receptor humano independente de cátions manose-6-fosfato de maneira independente da manose-6-fosfato.

[0011] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma proteína de fusão terapêutica contendo uma enzima lisossomal; e uma muteína IGF-II que possui uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO:1); e tendo afinidade de ligação diminuída pelo receptor de insulina relativo à afinidade de IGF-II humano ocorrendo naturalmente pelo receptor de insulina; em que a muteína IGF-II se liga ao receptor humano independente de cátions manose-6-fosfato de maneira independente da manose-6-fosfato.

[0012] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma proteína de fusão terapêutica contendo uma enzima lisossomal; e uma muteína IGF-II que possui uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO:1); e tendo afinidade de ligação diminuída pelo receptor de insulina relativo à afi-

nidade de IGF-II humano ocorrendo naturalmente pelo receptor de insulina; em que a muteína IGF-II se liga ao receptor humano independente de cátions manose-6-fosfato de maneira independente da manose-6-fosfato.

[0013] Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II adequada para a invenção inclui uma mutação dentro de uma região correspondendo aos aminoácidos 30-40 da SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II adequada para a invenção inclui uma mutação dentro de uma região correspondente aos aminoácidos 34-40 da SEQ ID NO:1 de forma que a mutação elimine pelo menos uma furina do sítio de clivagem da protease. Em algumas modalidades, uma mutação adequada é uma substituição, eliminação e/ou inserção de aminoácido. Em algumas modalidades, a mutação é uma substituição de aminoácido em uma posição correspondente a Arg37 ou Arg 40 da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a substituição de aminoácido é uma substituição de Lys ou Ala.

[0014] Em algumas modalidades, uma mutação adequada é uma eliminação ou substituição de resíduos de aminoácidos correspondendo às posições selecionadas do grupo consistindo em 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40 da SEQ ID NO:1, e combinações das mesmas.

[0015] Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II adequada para a invenção inclui uma eliminação ou substituição de aminoácidos correspondentes à posição 2-7 da SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II de acordo com a invenção ainda inclui uma eliminação ou substituição de aminoácidos correspondentes à posição 1-7 da SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II de acordo com a invenção ainda contém uma eliminação ou substituição de aminoácidos correspondentes à posição 62-67 da SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II de acordo com a

invenção ainda contém uma substituição de aminoácido em uma posição correspondente a Tyr27, Leu43, ou Ser26 da SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II de acordo com a invenção contém pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo consistindo em Tyr27Leu, Leu43Val, Ser26Phe e suas combinações. Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II de acordo com a invenção contém aminoácidos correspondentes à posição 48-55 da SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II de acordo com a invenção contém pelo menos três aminoácidos selecionados do grupo consistindo em aminoácidos correspondentes às posições 8, 48, 49 ,50, 54 e 55 da SEQ ID NO:1, Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II de acordo com a invenção contém, nas posições correspondentes às posições 54 e 55 da SEQ ID NO:1, aminoácidos cada um descarregado ou negativamente carregado em pH 7,4. Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II diminuiu afinidade de ligação para o receptor IGF-I relativo à afinidade de IGF-II humano de ocorrência natural para o receptor IGF-I.

[0016] Em algumas modalidades, uma enzima lisossomal adequada para invenção é alfa-glucosidase ácida humana (GAA), ou uma variante funcional da mesma. Em algumas modalidades, uma enzima lisossomal adequada para a invenção inclui os aminoácidos 70-952 da GAA humana.

[0017] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão terapêutica direcionada da invenção ainda inclui um espaçador entre a enzima lisossomal e a muteína IGF-II resistente à furina. Em algumas modalidades, o espaçador contém uma sequência de aminoácidos Gly-Ala-Pro.

[0018] A presente invenção também fornece ácidos nucleicos decodificando a muteína IGF-II ou a proteína de fusão terapêutica direcionada como descrito em várias modalidades acima. A presente inven-

ção ainda inclui várias células contendo o ácido nucleico da invenção.

[0019] A presente invenção fornece composições farmacêuticas adequadas para tratar a doença de armazenamento lisossomal contendo uma quantidade terapeuticamente eficiente de uma proteína de fusão terapêutica direcionada da invenção. A invenção ainda fornece métodos de tratamento de doenças de armazenamento lisossomal compreendendo administrar a um paciente em necessidade de tratamento uma proteína de fusão terapêutica direcionada de acordo com a invenção. Em algumas modalidades, a doença de armazenamento lisossomal é a Doença de Pompe. Em algumas modalidades, a doença de armazenamento lisossomal é a Doença de Fabry. Em algumas modalidades, a doença de armazenamento lisossomal é a Doença de Gaucher.

[0020] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de produzir uma proteína de fusão terapêutica direcionada incluindo uma etapa de cultura de células de mamíferos em meio de cultura celular, onde as células de mamíferos contem o ácido nucleico da invenção, em particular, como descrito em várias modalidades; e a cultura é realizada sob condições que permitem a expressão da proteína de fusão terapêutica direcionada.

[0021] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece um método de produzir uma proteína de fusão direcionada incluindo uma etapa de cultura de células deficientes em furina (por exemplo, células de mamíferos deficientes em furina) em um meio de cultura celular, onde as células deficientes em furina carregam um ácido nucleico decodificando uma proteína de fusão compreendendo uma enzima lisossomal e uma muteína IGF-II possuindo uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica a IGF-II madura humana (SEQ ID NO:1), em que a muteína IGF-II se liga ao receptor manose-6-fosfato cátion-independente humano de maneira manose-6-fosfato-independente; e

em que a cultura é realizada sob condições que permitem a expressão da proteína de fusão terapêutica direcionada.

[0022] Outras características, objetos e vantagens da presente invenção estão aparentes na descrição detalhada a seguir. Deve-se entender, porém, que a descrição detalhada, enquanto indica modalidades da presente invenção, é fornecida como meio de ilustração apenas, não limitação. Várias mudanças e modificações dentro do escopo da invenção serão aparentes para os versados na tecnologia a partir da descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0023] Os desenhos são apenas para fins de ilustração, não para limitação.

[0024] A figura 1 ilustra um mapa do término-N do ZC-701. Dois resíduos de aminoácidos são sítios de eventos de clivagem. O primeiro é o sítio da clivagem do peptídeo de sinal, o segundo é o sítio da clivagem da furina.

[0025] A figura 2 ilustra uma análise exemplar de SDS-PAGE do ZC-701 após tratamento com PNGase F. A fileira da direita foi adicionalmente tratada com furina.

[0026] A figura 3 esquerda: ilustração esquemática dos mutantes ZC-701 exemplares nos quais a furina de clivagem da furina é modificado. Centro: análise exemplar SDS-PAGE dos mutantes tratados com PNGase após 3-7 dias de cultura celular. Direita: Análise exemplar SDS-PAGE dos mutantes tratados com PNGase tratados com furina.

[0027] A figura 4 ilustra resultados de ligação competitiva ao receptor IGF-II.

[0028] A figura 5 ilustra resultados adicionais de ligação competitiva ao receptor IGF-II.

[0029] A figura 6 ilustra exemplos de resultados de ensaio de

competição pelo receptor de insulina.

[0030] A figura 7 ilustra exemplos de resultados de ensaios de competição pelo receptor de insulina.

[0031] A figura 8 ilustra exemplos de resultados de certo ensaio de ligação ao receptor de insulina.

[0032] A figura 9 ilustra exemplos de resultados de certo ensaio de ligação ao receptor de insulina.

[0033] A figura 10 ilustra análise exemplar de GAA marcado com GILT parcialmente purificado de transfecções transitórias. Células HEK293 foram transfectadas com construções 1479, 1487 ou ZC701. Após a coleta, os sobrenadantes da cultura foram parcialmente purificados por Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC). Todas as amostras foram tratadas com PNGase antes da eletroforese. Painéis à esquerda: SDS-PAGE de proteínas parcialmente purificadas. A B12 ZC-701 purificada é mostrada como controle. Painéis à direita: Análise de imunoblot das proteínas parcialmente purificadas. O anticorpo primário indicado foi usado. Os painéis inferiores foram adicionalmente tratados com furina exógena. A proteína decodificada pelo construto 1487 é idêntica em sequência à decodificada pelo construto 1461 (R37A).

A proteína decodificada pelo construto 1479 é idêntica em sequência à decodificada pelo construto 1459 (R37K).

[0034] A figura 11 ilustra resultados de absorção da GAA marcada com GILT resistente à furina em mioblastos L6 de rato. As Kabsorções para as proteínas 1479, 1487 e ZC-701, e ZC-701 purificada são 4,5 nM, 4,4 nM, 5,0 nM e 2,6 nM, respectivamente. A proteína decodificada pelo construto 1487 é idêntica em sequência à decodificada pelo construto 1461 na figura 3 (R37A). A proteína decodificada pelo construto 1479 é idêntica em sequência à decodificada pela 1459 na figura 3 (R37K).

DEFINIÇÕES

[0035] *Melhoramento:* Como aqui usado, o termo "melhoramento" significa a prevenção, redução ou paliação de um estado, ou melhoria do estado de um paciente. O melhoramento inclui, mas não exige, completa recuperação ou completa prevenção de uma condição de doença. Em algumas modalidades, o melhoramento inclui redução de materiais acumulados dentro de lisossomos de tecidos de doenças relevantes.

[0036] *Muteína IGF-H resistente à furina:* Como aqui usado, o termo "muteína IGF-II resistente à furina" refere-se a um peptídeo de base IGF-II contendo uma sequência de aminoácidos alterados que elimina pelo menos um sítio de clivagem de protease de furina nativa de forma que a clivagem da furina é prevenida, inibida, reduzida, ou desacelerada quando comparada com um peptídeo IGF-II humano tipo selvagem. Como aqui usado, uma muteína IGF-II resistente à furina também é referido como uma muteína IGF-II que é resistente à furina.

[0037] *Sítio de clivagem da furina protease:* Como aqui usado, o termo "sítio de clivagem da furina protease" (também referido como "sítio de clivagem da furina" ou "sequência de clivagem da furina") refere-se à sequência de aminoácidos de um peptídeo ou proteína que serve como sequência de reconhecimento para clivagem de protease enzimática pela furina ou proteases semelhantes à furina. Tipicamente, um sítio de clivagem de furina protease possui uma sequência de consenso Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 2), X é um aminoácido. O sítio da clivagem é posicionado após o resíduo da arginina carboxi-terminal (Arg) na sequência. Em algumas modalidades, o sítio de clivagem da furina pode possuir uma sequência de consenso Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 3), X é um aminoácido. O sítio da clivagem é posicionado após o resíduo da arginina carboxi-terminal (Arg) na sequência.

[0038] *Furina:* Como aqui usado, o termo "furina" refere-se a qualquer protease que possa reconhecer e dividir o sítio de clivagem da furina protease como aqui definido, incluindo a furina ou protease semelhante à furina. A furina também é conhecida como a enzima de clivagem de aminoácidos básicos em pares (PACE). A furina pertence à família de convertases de proproteínas como a subtilisina. A furina decodificando o gene foi conhecida como FUR (Região a Jusante FES).

[0039] *Células deficientes em furina:* Como aqui usado, o termo "células deficientes em furina" refere-se a quaisquer células cuja atividade de furina protease é inibida, reduzida ou eliminada. Células deficientes em furina incluem células de mamíferos e não mamíferos que não produzem furina ou produzem quantidade reduzida de furina ou protease de furina defeituosa.

[0040] *Direcionamento Lisossomal Independente de Glicosilação:* Como aqui usado, o termo "direcionamento lisossomal independente de glicosilação" (também referido como "GILT") refere-se ao direcionamento lisossomal que é manose-6-fosfato-independente.

[0041] *Alfa-glicosidase ácida humana:* Como aqui usado, o termo "alfa-glicosidase ácida humana" (também referido como "GAA") refere-se à forma humana da GAA tipo selvagem ou uma variante funcional que é capaz de reduzir os níveis de glicogênio em lisossomos de mamíferos ou pode resgatar ou melhorar um ou mais sintomas da doença de Pompe.

[0042] *Melhorar, aumentar ou reduzir:* Como aqui usado, os termos "melhorar", "aumentar" ou "reduzir", ou equivalentes gramaticais, indicam valores que são relativos a uma medição de base, como uma medição no mesmo indivíduo antes do início do tratamento aqui descrito, ou uma medição em um indivíduo controle (ou múltiplos indivíduos controles) na ausência do tratamento aqui descrito. Um "indiví-

duo controle" é um indivíduo afetado com a mesma forma de doença de armazenamento lisossomal (por exemplo, doença de Pompe) do indivíduo sendo tratado, que é mais ou menos da mesma idade do indivíduo sendo tratado (para assegurar que os estágios da doença no indivíduo tratado e no indivíduo controle são comparáveis).

[0043] *Indivíduo, sujeito, paciente:* Como aqui usado, os termos "sujeito", "indivíduo" ou "paciente" refere-se a sujeito mamífero humano ou não humano. O indivíduo (também referido como "paciente" ou "sujeito") sendo tratado é um indivíduo (feto, bebê, criança, adolescente ou adulto humano) sofrendo de doença de armazenamento lisossomal, por exemplo, doença de Pompe (por exemplo., doença de Pompe de início infantil, juvenil, ou adulto) ou tendo o potencial de desenvolver uma doença de armazenamento lisossomal (por exemplo, doença de Pompe).

[0044] *Doenças de armazenamento lisossomal:* Como aqui usado, "doenças de armazenamento lisossomal" referem-se a um grupo de doenças genéticas que resultam da deficiência de pelo menos uma das enzimas (por exemplo, hidrolases ácidas) que são necessárias para quebrar macromoléculas em peptídeos, aminoácidos, monossacarídeos, ácidos nucleicos e ácidos graxos em lisossomos. Como resultado, os indivíduos que sofrem de doenças de armazenamento lisossomal acumulam materiais nos lisossomos. Doenças de armazenamento lisossomal exemplares estão listadas na Tabela 1.

[0045] *Enzima lisossomal:* Como aqui usado, o termo "enzima lisossomal" refere-se a qualquerenzima que é capaz de reduzir materiais acumulados em lisossomos de mamíferos ou que podem resgatar ou melhorar um ou mais sintomas de doença de armazenamento lisossomal. Enzimas lisossomais adequadas para a invenção incluem enzimas lisossomais do tipo selvagem ou modificado e podem ser produzidas usando métodos recombinantes e sintéticos ou purificadas

a partir de fontes naturais. Enzimas lisossomal exemplares estão listadas na Tabela 1.

[0046] *Espaçador:* Como aqui usado, o termo "espaçador" (também referido como "ligante") refere-se a uma sequência de peptídeos entre duas porçãos proteicas em uma proteína de fusão. Um espaçador é geralmente projetado para ser flexível ou interpor uma estrutura, como uma alfa-hélice, entre as duas porções proteicas. Um espaçador pode ser relativamente curto, como a sequência Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 4) ou Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ **ID** NO: 5), ou pode ser mais comprido, como, por exemplo, 10-25 aminoácidos em comprimento.

[0047] *Quantidade terapeuticamente eficaz:* Como aqui usado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de uma proteína de fusão terapêutica direcionada que confere o efeito terapêutico no paciente tratado, a uma taxa risco/benefício razoável aplicável a qualquer tratamento médico. O efeito terapêutico pode ser objetivo (por exemplo, mensurável por algum teste ou marcador) ou subjetivo (por exemplo, o paciente fornece indicação ou sente um efeito). Em particular, a "quantidade terapeuticamente eficiente" refere-se à quantidade de uma proteína de fusão terapêutica ou composição eficiente para tratar, melhorar ou prevenir uma doença ou condição desejada, ou exibir um efeito terapêutico detectável ou de prevenção, como melhorando sintomas associados com a doença, prevenindo ou atrasando o início da doença, e/ou também diminuindo a severidade ou frequência dos sintomas da doença. Uma quantidade terapeuticamente eficiente é comumente administrada em um regime de dosagem que pode compreender múltiplas unidades de doses. Para qualquer proteína de fusão terapêutica em particular, uma quantidade terapeuticamente eficiente (e/ou uma dose de unidade apropriada dentro do regime de dosagem eficiente) pode variar, por exemplo, dependendo da via de administração, em combinação com outros agentes farma-

cêuticos. Da mesma forma, a quantidade terapeuticamente eficiente (e/ou unidade de dose) para qualquer paciente em particular pode depender de uma variedade de fatores incluindo a doença sendo tratada e a severidade da doença; a atividade do agente farmacêutico específico empregado; a composição específica empregada; a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; a hora de administração, via de administração, e/ou taxa de excreção ou metabolismo da proteína de fusão específica empregada; a duração do tratamento; e fatores semelhantes como bem conhecido na tecnologia médica.

[0048] *Tratamento:* Como aqui usado, o termo "tratamento" (também "tratar" ou "tratando") refere-se a qualquer administração de uma proteína de fusão terapêutica que alivie parcialmente ou completamente, melhores, diminua, iniba, atrase o início, reduza a severidade de e/ou reduza a incidência de um ou mais sintomas ou características de uma doença, distúrbio e/ou condição em particular. Tal tratamento pode ser de um paciente que não exiba sinais da doença relevante, distúrbio e/ou condição e/ou de um paciente que exiba apenas sinais iniciais da doença, distúrbio e/ou condição. Alternativamente ou adicionalmente, tal tratamento pode ser de um paciente que exibe um ou mais sinais estabelecidos da doença relevante, distúrbio e/ou condição. Por exemplo, o tratamento pode se referir à melhora do status cardíaco (por exemplo, aumento de volumes de final sistólico e/ou final diastólico, ou redução, melhoramento ou prevenção da cardiomiopatia progressiva que é tipicamente encontrada na doença de Pompe) ou de função pulmonar (por exemplo, aumento na capacidade vital de chorar sobre a capacidade de linha de base, e/ou normalização da desaturação de oxigênio durante o choro); melhoria do neurodesenvolvimento e/ou habilidades motoras (por exemplo, aumento no escore AIMS); redução dos níveis de glicogênio no tecido de um indivíduo afetado pela doença; ou qualquer combinação desses efeitos. Em algumas

modalidades, o tratamento inclui melhora da excreção de glicogênio, particularmente na redução ou prevenção da cardiomiopatia associada a doença de Pompe.

[0049] Como usado neste pedido, os termos "cerca de" e "aproximadamente" são usados como equivalentes. Quaisquer numerais usados neste pedido com ou sem cerca de/aproximadamente são significantes para cobrir quaisquer flutuações normais apreciadas por aqueles de habilidade comum na tecnologia relevante.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0050] A presente invenção fornece composições e métodos mais aprimorados para direcionar enzimas lisossomais baseado na tecnologia de direcionamento lisossomal independente da glicosilação (GILT). Entre outras coisas, a presente invenção fornece muteínas IGF-II que são resistentes à furina e/ou reduziram ou diminuíram a afinidade de ligação pelo receptor de insulina e proteínas de fusão terapêutica direcionadas contendo uma muteína IGF-II da invenção. A presente invenção também fornece métodos de fazer e usar as mesmas.

[0051] Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas seguintes seções. O uso de seções não pretende limitar a invenção. Cada seção pode aplicar-se a qualquer aspecto da invenção. Nesta aplicação, o uso de "ou" significa "e/ou" a não ser quando afirmado o contrário.

Enzimas Lisossomais

[0052] Uma enzima lisossomal adequada para a invenção inclui qualquer enzima que seja capaz de reduzir materiais acumulados em lisossomos de mamíferos ou que podem resgatar ou melhorar um ou mais sintomas de doença de armazenamento lisossomal. Enzimas lisossomais adequadas para a invenção incluem enzimas lisossomais do tipo selvagem ou modificado e podem ser produzidas usando métodos recombinantes e sintéticos ou purificadas a partir de fontes natu-

rais. Enzimas lisossomais exemplares estão listadas na Tabela 1.

[0053] Tabela 1. Doenças de Armazenamento Lisossomal e defeitos enzimáticos associados

A. Distúrbios da Glicogenose		
Nome da Doença	Distúrbio Enzimático	Substância Armazenada
Doença de Pompe	4-Glucosidase ácida-al	Oligossacarídeos alfa1-4 ligados ao glicogênio
B. Distúrbios da Glicolipidose		
Nome da Doença	Distúrbio Enzimático	Substância Armazenada
GM1 Gangliodsidose	β-Galactosidase	GM_1 Gangliosídeos
Doença de Tay-Sachs	β-Hexosaminidase A	GM2 Gangliosídeo
GM2 Gangliosidose: Variante AB	Proteína Ativadora de GM2	GM2 Gangliosídeo
Doença de Sandhoff	β-Hexosaminidase A&B	GM2 Gangliosídeo
Doença de Fabry	alfa-Galactosidase A	Globosídeos
Doença de Gaucher	Glucocerebrosidase	Glucosilceramida
Leucodistrofia Metacromática	Arilsulfatase A	Sulfatídeos
Doença de Krabbe	Galactosilceramidase	Galactocerebrosídeo
Niemann-Pick, Tipos A e B	Esfingomielinase ácida	Esfingomielina
Niemann-Pick, Tipo C	Distúrbio de Esterificação do Colesterol	Esfingomielina
Niemann-Pick, Tipo D	Desconhecido	Esfingomielina
Doença de Farber	Ceramidase ácida	Ceramida
Doença de Wolman	Lipase ácida	Colesteril ésteres
C. Distúrbios de Mucopolissacarídeos		
Nome da Doença	Distúrbio Enzimático	Substância Armazenada
Síndrome de Hurler (MPS IH)	alfa-L-Iduronidase	Sulfatos de Heparano e Dermatano

Síndrome de Scheie (MPS IS)	alfa-L-Iduronidase	Sulfatos de Heparano e Dermatano
Hurler-Scheie (MPS IH/S)	alfa-L-Iduronidase	Sulfatos de Heparano e Dermatano
Síndrome de Hunter (MPS II)	Iduronato Sulfatase	Síndrome de Hunter (MPS II)
Sanfilippo A (MPS IIIA)	Heparano N-Sulfatase	Sanfilippo A (MPS IIIA)
Sanfilippo B (MPS IIIB)	alfa-N- Acetilglucosaminidase	Sanfilippo B (MPS IIIB)
Sanfilippo C (MPS IIIC)	Acetil-CoA- GlucosaminidaAce-tiltransferase	Sanfilippo C (MPS IIIC)
Sanfilippo D (MPS IIID)	N-Acetilglucosamina -6-Sulfatase	Sanfilippo D (MPS IIID)
Morquio A (MPS IVA)	Galactosamina-6- Sulfatase	Morquio A (MPS IVA)
Morquio B (MPS IVB)	β-Galactosidase	Morquio B (MPS IVB)
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arilsulfatase B	Maroteaux-Lamy (MPS VI)
Síndrome de Sly (MPS VII)	β-Glucuronidase	Síndrome de Sly (MPS VII)

D. Distúrbios de Oligossacarídeos/Glicoproteínas		
Nome da Doença	Distúrbio Enzimático	Substância Armazenada
a -Manosidose	a -Manosidase	Manose/Oligossacarídeos
ß-Manosidose	f3-Manosidase	Manose/Oligossacarídeos
Fucosidose	a -L-Fucosidase	Fucosil oligossacarídeos
Aspartilglucosaminúria	N-Aspartil- 3-Glucosaminidase	Aspartilglucosamina Aspa-raginas
Sialidose (Mucolipidose I)	a -Neuraminidase	Sialiloligossacarídeos
Galactosialidose (Sín-drome de Goldberg)	Deficiência de Proteína Proteto-ra Lisossomal	Sialiloligossacarídeos
Doença de Schindler	a -N-AcetilGalactosaminidase	
E. Distúrbios de Transporte de Enzimas Lisossomais		
Nome da Doença	Distúrbio Enzimático	Substância Armazenada
Mucolipidose II (I-	N-Acetilglucosamina-	Sulfato de heparano

Doença celular)	1- Fosfotransferase	
Mucolipidose III (polidistrofia de Pseudo-Hurler)	O mesmo do ML II	
F. Distúrbios de Transporte de Membranas Lisossomais		
Nome da Doença	Distúrbio Enzimático	Substância Armazenada
Cistinose	Proteína de Transporte de Cistina	Cistina livre
Doença de Salla	Proteína de Transporte de Ácido Siálico	Ácido siálico livre e ácido glucurônico
Doença de Armazenamento de Ácido Siálico Infantil	Proteína de Transporte de Ácido Siálico	Ácido siálico livre e ácido glucurônico

G. Outros		
Nome da Doença	Distúrbio Enzimático	Substância Armazenada
Doença de Batten (Lipofuscinose Ceroide Neuronal Juvenil)	Desconhecido	Lipofuscinas
Lipofuscinose Ceroide Neuronal Infantil	Palmitoil-Proteína Tioesterase	Lipofuscinas
Mucolipidose IV	Desconhecido	Gangliosídeos e ácido hialurônico
Prosaposina	Saposinas A, B, C ou D	

[0055] Em algumas modalidades, uma enzima lisossomal adequada para a invenção inclui uma sequência de polipeptídeos tendo 50-100%, incluindo 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 e 100%, de identidade de sequência à sequência de polinucleotídeos que ocorre naturalmente de uma enzima humana mostrada na Tabela 1, enquanto ao mesmo tempo codificam a proteína que é capaz de reduzir materiais acumulados em lisossomos de mamíferos ou que podem resgatar ou melhorar um ou mais sintomas de doenças de

armazenamento lisossomal.

[0056] "Porcentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos" com relação às sequências de enzimas lisossomais é definida como a porcentagem de resíduos de aminoácido em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência de enzimas humanas ocorrendo naturalmente, após alinhar as sequências e introduzir vãos, se necessário, para atingir a identidade percentual máxima de sequência, e não considerando nenhuma substituição conservadora como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinar a porcentagem da identidade de sequência de aminoácidos pode ser alcançado em várias maneiras dentro da habilidade na tecnologia, usando software disponível em computadores públicos como BLAST, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os habilitados na tecnologia podem determinar parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para atingir um alinhamento máximo sobre o comprimento total das sequências sendo comparadas. Preferencialmente, o software WU-BLAST-2 é usado para determinar a identidade da sequência de aminoácidos (Altschul *et al.,* Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996); http://blast.wustlledu/blast/README.html). O WU-BLAST-2 usa vários parâmetros de busca, a maioria dos quais são definidos com os valores padrões. Os parâmetros ajustáveis são definidos com os seguintes valores: abertura de sobreposição = 1, fração de sobreposição = 0,125, limiar mundial (T) = 11. Os parâmetros de escore HSP (S) e HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo próprio programa, dependendo da composição da sequência em particular, porém, os valores mínimos podem ser ajustados e são definidos como indicado acima.

[0057] Doença de PompeUm exemplo de doença de armazenamento lisossomal é a doença de Pompe. A doença de Pompe é uma

doença genética rara causada por uma deficiência na enzima ácida alfa-glucosidase (GAA), que é necessária para quebrar o glicogênio, uma forma armazenada de açúcar usada para energia. A doença de Pompe também é conhecida como doença de armazenamento de glicogênio, GSD II, glicogenólise tipo II, deficiência de maltase ácida, deficiência de alfa-1,4-glucosidase, cardiomegalia glicogênica difusa, e forma cardíaca de glicogenólise generalizada. A formação do glicogênio causa enfraquecimento muscular progressivo (miopatia) no corpo e afeta vários tecidos corporais, particularmente no coração, músculos esqueléticos, fígado, sistema nervoso e respiratório.

[0058] A apresentação das manifestações clínicas da doença de Pompe pode variar amplamente dependendo da idade do início da doença e atividade do GAA residual. A atividade do GAA residual correlaciona-se com a quantidade e distribuição tecidual do acúmulo de glicogênio assim como a severidade da doença. A doença de Pompe de início infantil (menos de 1% da atividade normal de GAA) é a forma mais severa e é caracterizada por hipotonia, fraqueza muscular generalizada, e cardiomiopatia hipertrófica, e massivo acúmulo de glicogênio em tecidos cardíacos e outros músculos. A morte normalmente ocorre dentro de um ano do nascimento devido a insuficiência cardiorespiratória. Hirschhorn *et al.* (2001) "Glycogen Storage Disease Type II: Acid Alpha-glucosidase (Acid Maltase) Deficiency," in Scriver *et al.,* eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8th Ed., New York: McGraw-Hill, 3389-3420. Início juvenil (1-10% da atividade da GAA normal) e início adulto (10-40% da atividade de GAA normal). A doença de Pompe é mais clinicamente heterogênea, com maior variação na idade de início, apresentação clínica, e progressão da doença. A doença de Pompe com início juvenil e adulto é geralmente caracterizada por falta de envolvimento cardíaco severo, idade tardia de início, e progressão mais lenta da doença, mas o eventual envolvimento

respiratório ou dos membros resulta em morbidade e mortalidade significantes. Enquanto a expectativa de vida pode variar, a morte geralmente ocorre devido à insuficiência respiratória. Hirschhorn *et al.* (2001) "Glycogen Storage Disease Type II: Acid Alpha-glucosidase (Acid Maltase) Deficiency," in Scriver *et al.,* eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8th Ed., New York: McGraw-Hill, 3389-3420.

[0059] Uma enzima GAA adequada para tratar doença de Pompe inclui uma GAA humana do tipo selvagem, ou um fragmento ou sequência variante, que mantém a habilidade de dividir ligações 1-4 em oligossacarídeos lineares.

Terapia de substituição de enzimas

[0060] A terapia de substituição de enzimas (ERT) é uma estratégia terapêutica para corrigir uma deficiência de enzima por infusão da enzima faltante na corrente sanguínea. À medida em que o sangue perfunde os tecidos dos pacientes, a enzima é tomada pelas células e transportada para o lisossomo, onde a enzima age para eliminar material que se acumulou nos lisossomos devido à insuficiência da enzima. Para a terapia de substituição de enzima lisossomal ser eficiente, a enzima terapêutica deve ser fornecida aos lisossomos nas células apropriadas nos tecidos onde o defeito de armazenamento se manifesta. A terapia convencional de substituição de enzima lisossomal é fornecida usando carboidratos naturalmente anexados à proteína para desencadear receptores específicos na superfície das células alvo. Um receptor, o receptor cátion-independente M6P (CI-MPR), é particularmente útil para enzimas lisossomais de de substituição de direcionamento porque o CI-MPR está presente na superfície da maioria dos tipos celulares.

[0061] Os termos "receptor manose-6-fosfato cátion-independente (CI-MPR)," "receptor M6P/IGF-II", "receptor CI-MPR/IGF-II" ou "recep-

tor IGF2", ou suas abreviações, são usados aqui intercaladamente, referindo-se ao receptor celular que se liga ao M6P e IGF-II.

Direcionamento Lisossomal Independente de Glicosilação

[0062] Foi desenvolvida uma tecnologia de Direcionamento Lisossomal Independente de Glicosilação (GILT) para direcionar as enzimas terapêuticas para os lisossomos. Especificamente, a tecnologia GILT usa um marcador de peptídeo ao invés do M6P para envolver o CI-MPR para o alvo lisossomal. Tipicamente, um marcador GILT é uma proteína, peptídeo, ou outra porção que se liga ao CI-MPR em uma maneira manose-6-fosfato-independente. Com vantagem, esta tecnologia imita o mecanismo biológico normal para o consumo de enzimas lisossomais, e o faz de maneira independente da manose-6-fosfato.

[0063] Um marcador GILT preferido é derivado do fator II de crescimento semelhante à insulina humana (IGF- II). A IGF-II humana é um ligante de alta afinidade para o CI-MPR, que também é referido como receptor de IGF-II. A ligação das enzimas terapêuticas marcadas com GILT aos receptores M6P/IGF-II direciona a proteína para o lisossomo através da via endocítica. Este método possui numerosas vantagens sobre os métodos envolvendo glicosilação, incluindo simplicidade e economia, porque uma vez que a proteína é isolada, nenhuma outra modificação precisa ser feita.

[0064] A descrição detalhada da tecnologia GILT e o marcador GILT podem ser encontrados na Publicação U.S. Nos. 20030082176, 20040006008, 20040005309, e 20050281805, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência em suas totalidades.

Marcador GILT resistente à furina

[0065] No decorrer do desenvolvimento das enzimas lisossomais marcadas com GILT para tratar a doença de armazenamento lisossomal, tornou-se aparente que o marcador GILT derivada de IGF-II pode ser sujeita a clivagem proteolítica por furina durante a produção em

células de mamíferos (ver a seção de exemplos). A furina protease tipicamente reconhece e divide um sítio de clivagem que possui uma sequência de consenso Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 2), X é um aminoácido. O sítio da clivagem é posicionado após o resíduo da arginina carboxi-terminal (Arg) na sequência. Em algumas modalidades, o sítio de clivagem da furina pode possuir uma sequência de consenso Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 3), X é um aminoácido. O sítio da clivagem é posicionado após o resíduo da arginina carboxi-terminal (Arg) na sequência. Como aqui usado, o termo "furina" refere-se a qualquer protease que possa reconhecer e dividir o sítio da clivagem da furina protease como aqui definido, incluindo furina ou protease semelhante à furina. A furina também é conhecida como a enzima de clivagem de aminoácidos básicos em pares (PACE). A furina é um membro da família de pró hormônio convertases que inclui o PC3, uma protease responsável pela maturação da pró insulina em células de ilhotas pancreáticas. A furina decodificando o gene foi conhecida como FUR (Região a Jusante FES).

[0066] A sequência de peptídeo IGF-II humano maduro é mostrada abaixo.

AYRP SETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYF SRPAS**RVSRRSR**GIVEECCFRSCDLALLETYC ATPAKSE (SEQ ID NO:1)

[0067] Como pode ser visto, a IGF-II humana madura contem dois sítios potenciais sobrepostos de clivagem de furina entre os resídusos 34-40 (em destaque). As setas apontam para duas posições de clivagem potencial da furina.

[0068] Foram desenvolvidos marcadores GILT modificados que são resistentes à clivagem por furina e ainda mantêm a habilidade de se ligarem a CI-MPR de maneira manose-6-fosfato-independente. Especificamente, marcadores GILT resistentes à furina podem ser projetados mudando a sequência de aminoácidos em um ou mais sítios de

clivagem de furina de forma que a mutação elimine pelo menos um sítio de clivagem de furina. Assim, em algumas modalidades, um marcador GILT resistente à furina é uma muteína IGF-II resistente à furina contendo uma mutação que elimina pelo menos um sítio de clivagem da furina protease ou mude uma sequência adjacente ao sítio de clivagem da furina de forma que a clivagem da furina seja impedida, inibida, reduzida ou desacelerada como comparada ao peptídeo IGF-II do tipo selvagem (por exemplo, IGF-II maduro humano do tipo selvagem). Tipicamente, uma mutação adequada não afeta a habilidade do marcador GILT resistente à furina de se ligar ao receptor manose-6-fosfato humano cátion-independente. Em particular, uma muteína IGF-II resistente à furina adequada para a invenção se liga ao receptor manose-6-fosfato humano cátion-independente de maneira manose-6-fosfato-independente com uma dissociação constante de 1 mM ou menos (por exemplo, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, ou menos) em pH 7.4. Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II resistente à furina contém uma mutação dentro de uma região correspondente aos aminoácidos 30-40 (por exemplo, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 3339, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40) da SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades, uma mutação adequada elimina pelo menos um sítio de clivagem da furina protease. Uma mutação pode ser substituições de aminoácidos, eliminações, inserções. Por exemplo, qualquer aminoácido dentro da região correspondente aos resíduos 30-40 (por exemplo, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33¬39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40) da SEQ ID NO:1 pode ser substituído com qualquer outro aminoácido ou eliminado. Por exemplo, substituições na posição 34 podem afetar o reconhecimento de furina do primeiro sítio de clivagem. A inserção de um ou mais aminoácidos adicionais dentro de cada sítio de reconhecimento pode eliminar um ou mais sítios de clivagem da furina. A eli-

minação de um ou mais resíduos nas posições degeneradas também pode eliminar dois sítios de clivagem da furina.Em algumas modalidades, uma muteína IGF-II resistente à furina contém uma substituição Lys ou Ala nas posições Arg37 ou Arg40. Outras substituições são possíveis, incluindo combinações de mutações Lys e/ou Ala nas posições 37 e 40, ou substituições de aminoácidos além de Lys ou Ala.

[0069] Em algumas modalidades, a muteína IGF-II resistente à furina adequada para a invenção pode conter mutações adicionais. Por exemplo, até 30% ou mais dos resíduos da SEQ ID NO:1 podem ser mudados (por exemplo, até 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%,13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30% ou mais resíduos podem ser mudados). Assim, uma muteína IGF-II resistente à furina adequada para a invenção pode possuir uma sequência de aminoácidos de pelo menos 70%, incluindo pelo menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, idêntico à SEQ ID NO:I.

[0070] Em algumas modalidades, a muteína IGF-II resistente à furina adequada para a invenção é direcionada especificamente para o CI-MPR. Particularmente uteis são mutações no polipeptídeo IGF-II que resultam em uma proteína que se liga ao CI-MPR com alta afinidade (por exemplo, com uma dissociação constante de 1 mM ou menos em pH 7.4) enquanto se liga a outros receptores conhecidos por se ligarem ao IGF-II com afinidade relativa a IGF-II nativa. Por exemplo, uma muteína IGF-II resistente à furina adequada para a invenção pode ser modificada para possuir menor afinidade de ligação pelo receptor IGF-I relativo à afinidade de IGF-II humana ocorrendo naturalmente pelo receptor IGF-I. Por exemplo, a substituição de resíduos IGF-II Tyr27 com Leu, Leu43 com Val ou Ser26 com Phe diminui a afinidade de IGF-II pelo receptor IGF-I em 94-, 56- e 4-, respectivamente

(Torres *et aL* (1995) J. Mol. Biol. 248(2):385-401). A eliminação de resíduos 1-7 da IGF-II humana resultou em uma diminuição 30 vezes na afinidade pelo receptor IGF-I humano e um aumento 12 vezes concomitante na afinidade pelo receptor IGF-II de rato (Hashimoto et al. (1995) J. Biol. Chem. 270(30):18013-8).A estrutura RMN do IGF-II mostra que Thr7 está sítioizado próximo aos resíduos 48 Phe e 50 Ser assim como próximo à ponte de dissulfeto 9 Cys-47 Cys. Imagina-se que a interação do Thr7 com estes resíduos pode estabilizar o hexapeptídeo N-terminal flexível necessário para a ligação com o receptor IGF-I (Terasawa *et al.* (1994) EMBO J. 13(23)5590-7). Ao mesmo tempo, esta interação pode modular a ligação ao receptor IGF-II. A truncação do término C do IGF-II (resíduos 62-67) também parece diminuir a afinidade do IGF-II pelo receptor IGF-I em 5 vezes (Roth *et al.* (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181(2):907-14).

[0071] As superfícies de ligação para o IGF-I e receptores M6P cátion-independentes estão em faces separadas do IGF-II. Baseado em dados estruturais e mutacionais, a ligação funcional cátion-independente M6P nos domínios pode ser construída de forma substancialmente menor do que a IGF-II humana. Por exemplo, os aminoácidos amino terminais (por exemplo, 1-7 ou 2-7) e/ou os resíduos carbóxi terminais 62-67 podem ser eliminados ou substituídos. Adicionalmente, os aminoácidos 29-40 podem ser eliminados ou substituídos sem alterar o restante dos polipeptídeos ou ligando-se ao receptor M6P cátion-independente. Assim, uma porção direcionada incluindo aminoácidos 8-28 e 41-61 pode ser construída. Estas partes de aminoácidos podem talvez serem unidas diretamente ou separadas por um ligante. Alternativamente, os aminoácidos 8-28 e 41-61 podem ser fornecidos em cadeias separadas de polipeptídeos. Domínios comparáveis de insulina, que é homóloga ao IGF-II e possui uma estrutura terciária bem relacionada à estrutura do IGF-II, possuem informação

estrutural suficiente para permitir reposicionamento adequado na estrutura terciária apropriada, mesmo quando presentes em cadeias separadas de polipeptídeos (Wang et al. (1991) Trends Biochem. Sci. 279-281). Assim, por exemplo, os aminoácidos 8-28, ou uma substituição variante conservadora, podem se fundir a uma enzima lisossomal; a proteína de fusão resultante pode ser misturada com os aminoácidos 41-61, ou uma variante de substituição conservadora; e administrados ao paciente.

[0072] O IGF-II também pode ser modificado para minimizar a ligação a proteínas de ligação sérica ao IGF (Baxter (2000) Am. J. Physiol Endocrinol Metab. 278(6):967-76) para evitar sequestro de construções IGFII/GILT. Um número de estudos localizou resíduos no IGF-II necessários para ligação a proteínas de ligação IGF. Construtos com mutações nesses resíduos podem ser classificados por retenção de ligação de alta afinidade ao receptor M6P/IGF-II e por afinidade reduzida por proteínas de ligação IGF. Por exemplo, substituir o Phe26 da IGF-II com Ser supostamente reduz a afinidade do IGF-II por IGFBP-1 e -6 sem efeito na ligação ao receptor M6P/IGF-II (Bach et al. (1993) J. Biol. Chem. 268(13):9246-54). Outras substituições, como Lys por Glu9, também podem ser vantajosas. As mutações análogas, separadamente ou em combinação, em uma região de IGF-I que é altamente conservada com IGF-II resulta em grandes diminuições na ligação de IGF-BP (Magee et al. (1999) Biochemistry 38(48) :15863-70).

[0073] Uma abordagem alternativa é identificar regiões mínimas de IGF-II que se ligam com alta afinidade ao receptor M6P/IGF-II. Os resíduos que foram implicados na ligação IGF-II ao receptor M6P/IGF-II em maior parte se acumulam em uma face do IGF-II (Terasawa et al. (1994) EMBO J. 13(23):5590-7). Embora a estrutura terciária do IGF-II seja normalmente mantida por três ligações intramoleculares de dissul-

feto, um peptídeo incorporando a sequência de aminoácidos do receptor M6P/IGF-II ligado à superfície do IGF-II pode ser projetado para dobrar adequadamente e ter atividade de ligação. Tal peptídeo de ligação mínima é um domínio de direcionamento lisossomal altamente preferido. Por exemplo, um domínio de direcionamento lisossomal preferido são os aminoácidos 8-67 da IGF-II humana. Os peptídeos projetados, baseados na região ao redor dos aminoácidos 48-55, que se ligam ao receptor M6P/IGF-II, também são domínios de alvo lisossomal desejáveis. Alternativamente, uma biblioteca aleatória de peptídeos pode ser classificada pela habilidade de se ligar ao receptor M6P/IGF-II por um ensaio duplo híbrido de levedura, ou através de um ensaio do tipo exibição de fagos.

Afinidade de ligação pelo receptor de insulina

[0074] Os inventores da presente aplicação descobriram inesperadamente que muitas muteínas IGF-II resistentes à furina aqui descritas reduziram ou diminuíram a afinidade de ligação pelo receptor de insulina. Assim, em algumas modalidades, um marcador de peptídeo adequada para a invenção reduziu ou diminuiu a afinidade de ligação pelo receptor de insulina em relação à afinidade de IGF-II humana ocorrendo naturalmente pelo receptor de insulina. Em algumas modalidades, marcações de peptídeos com afinidade de ligação reduzida ou diminuída pelo receptor de insulina adequado para a invenção incluem marcações de peptídeos com afinidade de ligação pelo receptor de insulina que é mais de 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 50, 100 vezes menor do que a IGF-II humana madura do tipo selvagem. A afinidade de ligação pelo receptor de insulina pode ser medida usando vários ensaios in vitro e in vivo conhecidos na tecnologia. Ensaios de ligação exemplares são descritos na seção de Exemplos.

Mutagênese

[0075] As muteínas IGF-II podem ser preparadas apresentando

mudanças apropriadas no nucleotídeo dentro do IGF-II DNA, ou por síntese do polipeptídeo IGF-II desejado. Variações na sequência IGF-II podem ser feitas, por exemplo, usando qualquer uma das normas para mutações conservadoras e não conservadoras definidas, por exemplo, na Patente U.S. nº 5.364.934. As variações podem ser uma substituição, eliminação ou inserção de um ou mais códons codificando a IGF-II que resulta em uma mudança na sequência de aminoácidos do IGF-II quando comparado com uma sequência ocorrendo naturalmente da IGF-II humana madura. Substituições de aminoácidos podem ser o resultado de substituir um aminoácido com outro aminoácido possuindo propriedades químicas e/ou estruturais semelhantes, como a substituição de leucina com serina, por exemplo, substituições de aminoácido conservadoras. Substituições de aminoácidos também podem ser o resultado de substituir um aminoácido com outro aminoácido possuindo propriedades e/ou químicas semelhantes, por exemplo, substituições de aminoácidos não conservadores. Inserções ou deleções podem opcionalmente estar na variação de 1 a 5 aminoácidos. A variação permitida pode ser determinada sistematicamente fazendo inserções, eliminações, ou substituições de aminoácidos na sequência e testando as variantes resultantes por atividade nos ensaios in vivo ou in vitro conhecidos na tecnologia (como os ensaios de ligação do CI-MPR ou ensaios de clivagem de furina).

[0076] O escaneamento de aminoácidos também pode ser empregado para identificar um ou mais aminoácidos em uma sequência contígua. Entre os aminoácidos de preferência estão aminoácidos relativamente pequenos, neutros. Tais aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e cisteína. A alanina é um aminoácido de preferência entre este grupo porque elimina a cadeia lateral além do beta-carbono e é menos provável de alterar a conformação da cadeia principal da variante. A alanina também é tipicamente preferida porque é o aminoácido

mais comum. Além disso, é frequentemente encontrada em posições enterradas e expostas [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Se a substituição de alanina não gerar quantidades adequadas de variante, um aminoácido isotérico pode ser usado.

[0077] As variações podem ser feitas usando métodos conhecidos na tecnologia como mutagênese oligonucleotídeo-mediada (direcionada), escaneamento de alanina, e mutagênese PCR. A mutagênese de sítio direcionado [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagênese em cassete [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], restrição de seleção de mutagênese [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] ou outras técnicas conhecidas pode ser realizada no DNA clonado para produzir muteínas IGF-II.

Espaçador

[0078] Um marcador GILT resistente à furina pode se fundir ao térmico N ou C de um polipeptídeo decodificando uma enzima lisossomal. O marcador GILT pode se fundir diretamente ao polipeptídeo de enzima lisossomal ou pode ser separada do polipeptídeo de enzima lisossomal por um ligante ou espaçador. Um ligante ou espaçador de aminoácidos é geralmente projetado para ser flexível ou interpor uma estrutura, como uma alfa-hélice, entre as duas porções proteicas. Um ligante ou espaçador pode ser relativamente curto, como a sequência Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 4) ou Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 5), ou pode ser mais comprido, como, por exemplo, 10-25 aminoácidos em comprimento. O sítio de uma junção de fusão deve ser selecionado com cuidado para promover dobra adequada e atividade dos dois parceiros de fusão e para prevenir separação prematura de um marcador de peptídeo de um polipeptídeo GAA. Em uma modalidade de preferência, a sequência de ligante é Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 4).

[0079] Construtos adicionais de proteínas GAA marcadas com GILT que podem ser usadas nos métodos e composições da presente invenção foram descritos em detalhes na Publicação U.S. Nº 20050244400, os conteúdos do qual são aqui incorporados por referência.

Células

[0080] Qualquer célula de mamífero ou tipo celular suscetível à cultura celular, e à expressão de polipeptídeos, pode ser utilizado de acordo com a presente invenção, como, por exemplo, células de rim embriônico humano (HEK) 293, ovário de hamster chinês (CHO), rim de macaco (COS), HT1080, C10, HeLa, rim de hamster bebê (BHK), 3T3, C127, CV-1, HaK, NS/O, e L-929. Exemplos não limitantes de células de mamíferos que podem ser usadas de acordo com a presente invenção incluem, sem limitação, linha de mieloma BALB/c de (NSO/l, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Holanda)); rim de macaco de linha celular CV1 transformado por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embriônico humano (293 ou 293 células subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células renais de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); células ovarianas de hamster chinês +/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de camundongo (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células renais de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células renais de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renais de cão (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rato buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongos (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68

(1982)); células MRC 5; células FS4; e linha de hepatoma humano (Hep G2). Em algumas modalidades, a proteína de fusão da presente invenção é produzida a partir de linhas celulares CHO.

[0081] A proteína de fusão da invenção também pode ser expressada em uma variedade de células de hospedeiros não mamíferos, como, por exemplo, insetos (por exemplo, Sf-9, Sf-21, Hi5), plantas (por exemplo, *Leguminosa,* cereal, ou tabaco), levedura (por exemplo, *S. cerivisae, P. pastoris),* procarionte (por exemplo, *E. Coli, B. subtilis* e outros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp), ou fungos.

[0082] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão com ou sem marcador GILT resistente à furina pode ser produzida em células deficientes em furina. Como aqui usado, o termo "células deficientes em furina" refere-se a quaisquer células cuja atividade da furina protease é inibida, reduzida ou eliminada. Células deficientes em furina incluem células de mamíferos e não mamíferos que não produzem furina ou produzem quantidade reduzida de furina ou protease de furina defeituosa. Células deficientes em furina que são conhecidas e disponíveis para o tecnólogo habilitado, incluindo sem limitação, células FD11 (Gordon et al (1997) Infection and Immunity 65(8):3370 3375), e aquelas células mutantes descritas em Moebring e Moehring (1983) Infection and Immunity 41(3):998 1009. Alternativamente, uma célula deficiente em furina pode ser obtida por exposição das células de mamíferos e não mamíferos descritas acima a tratamento de mutagênese, por exemplo, irradiação, brometo de etidio, uridina bromidada (BrdU) e outros, preferencialmente mutagênese química, e mais preferencialmente mutagênese de etil metano sulfonato, recuperando as células que sobrevivem ao tratamento e selecionando as células que parecem ser resistentes à toxicidade da exotoxina A de Pseudomonas (ver Moebring e Moehring (1983) Infection and Immunity 41(3):998

1009.

Subglicosilação

[0083] Proteínas terapêuticas direcionadas da invenção podem ser subglicosiladas, isto é, uma ou mais estruturas de carboidratos que normalmente estariam presentes em uma proteína humana ocorrendo naturalmente são preferencialmente omitidas, removidas, modificadas ou mascaradas. Sem desejar se ligar a nenhuma teoria, contempla-se que uma proteína subglicosilada pode estender a meia-vida da proteína em um mamífero. A subglicosilação pode ser alcançada de muitas formas. Em algumas modalidades, a proteína de fusão direcionada da invenção pode ser produzida usando um peptídeo de sinal secretório para facilitar a secreção da proteína de fusão. Por exemplo, a proteína de fusão pode ser produzida usando um peptídeo de sinal IGF-II. Em geral, a proteína de fusão produzida usando um peptídeo de sinal IGF-II reduziu o nível de manose-6-fosfato (M6P) na superfície da proteína comparado à enzima do tipo selvagem. Em algumas modalidades, uma proteína pode estar completamente subglicosilada (como quando sintetizada em *E. coli*), parcialmente subglicosilada (como quando sintetizada em um sistema de mamífero após interrupção de um ou mais sítios de glicosilação por mutagênese direcionada por sítio), ou podem ter um padrão de glicosilação não mamífero. Por exemplo, proteínas de fusão subglicosiladas podem ser geradas por modificação, substituição ou eliminação de um ou mais sítios de glicosilação por mutagênese direcionada em sítio. Por exemplo, GAA de tipo selvagem tipicamente possui sete sítios que correspondem ao reconhecimento canônico para glicosilação N-ligada, Asn-Xaa-Thr/Ser (SEQ ID NO: 7) (Xaa pode ser qualquer resíduo exceto Pro), notadamente, Asn-140, -233, -390, -470, -652, -882 e -925 (Hoefsloot et al., 1988; Martiniuk et al., 1990b). Um ou mais Asn das posições descritas acima podem ser modificadas ou eliminadas para gerar GAA subglicosilada. Em algumas

modalidades, o Asn pode ser mudado para Gln.

[0084] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão terapêutica pode ser deglicosilada após síntese. Por exemplo, a deglicosilação pode ser através de tratamentos químicos ou enzimáticos, e pode levar à deglicosilação completa ou, se apenas uma porção da estrutura do carboidrato for removida, deglicosilação parcial.

[0085] Em algumas modalidades, a glicosilação de uma enzima lisossomal é modificada, por exemplo, por oxidação e redução, para reduzir a eliminação da proteína terapêutica do sangue. Por exemplo, uma enzima lisossomal pode ser deglicosilada por tratamento por periodato. Em particular, o tratamento por periodato e um agente redutor como boroidreto de sódio é eficiente para modificar a estrutura do carboidrato da maioria das glicoproteínas. O tratamento com periodato oxida diois vicinais, dividindo a ligação carbono-carbono e substituindo os grupos hidroxil com grupos aldeído; o boroidreto reduz os aldeídos para hidroxis. Por exemplo, a uma concentração de 1 mM, o periodato exclusivamente oxida grupos de ácido siálico e em ou acima de 10 mM todos os diois vicinais disponíveis são convertidos por aldeídos (Hermanson, G.T. 1996, Bioconjugate techniques. Academic press). Uma vez formados, os grupos aldeído são altamente reativos e podem formar ligações de base de Schiff com grupos amino primários na proteína, resultando em ligações intramoleculares. Portanto, grupos aldeído formados devem ser reduzidos a grupos álcool. Um agente de redução comumente usado é $NaBH_4$ e a reação é melhor executada sob condições alcalinas. Muitos resíduos de açúcar incluindo diois vicinais, portanto, são divididos por este tratamento. Sem dúvida, enquanto este tratamento converte carboidratos cíclicos em carboidratos lineares, não remove completamente o carboidrato, minimizando riscos de expor sítios potencialmente sensíveis à protease ou de polipeptídeo antigênico.

[0086] Grubb, J.H., et al (Grubb et al, 2008, PNAS 105:2616) relataram o tratamento de B-glucuronidase humana com metaperiodato de sódio seguida por redução de boroidreto de sódio. A beta-glucuronidase modificada manteve 90% da atividade, mas perdeu a atividade de consumo do receptor dependente de manose e manose-6-fosfato. A condição de pH alcalino usada na redução devido ao reagente de boroidreto de sódio como descrito por Grubb et al não é adequada para todas as enzimas lisossomais, muitas das quais são lábeis sob condição alcalina.

[0087] Portanto, em algumas modalidades, cianoboroidreto de sódio é usado como agente redutor. Enquanto a taxa de redução de aldeídos por cianoboroidreto é negligível em pH neutro e acima, a taxa de reação se torna rápida em pH acídico (Borch et al, 1971, JACS 93:2897). Por exemplo, regimes usando metaperiodato de sódio e cianoboroidreto em pH 3.5-4 podem ser usados.

[0088] Por exemplo, o tratamento do GAA ou alfa galactosidase A, as enzimas deficientes em doenças de Pompe e Fabry, respectivamente, com periodato e cianoboroidreto em pH 5.6 resultou em boa recuperação de atividade enzimática. A enzima foi incubada com mistura de volume igual contendo 20 mM de metaperiodato de sódio e 40 mM de cianoboroidreto de sódio em 0.1M de acetato de Na, pH 5.6 por 60 min em gelo. O periodato não reagido foi molhado com glicerol (concentração final de 10%) por 15 min em gelo. As proteínas foram finalmente trocadas em solução salina tamponada de fosfato, pH 6,2 por diafiltração usando aparelhos de filtração centrífuga Amicon. Outros agentes redutores, por exemplo, borano dimetilamina, também podem ser úteis para reduzir aldeídos gerados por oxidação do metaperiodato de sódio de glicoproteínas como GAA sob condições acídicas.

[0089] Assim, em uma modalidade, a redução do GAA tratado com

metaperiodato de sódio envolve o uso de cianoboroidreto de sódio em pH acídico de pH 3,0 a pH 6. Condições ótimas para a modificação química podem ser prontamente determinadas usando dois ensaios: perda de ligação ConA sefarose, e diminuição do consumo em macrófago J774E.

[0090] Por exemplo, a habilidade da 13-glucuronidase modificada por periodato/boroidreto para se ligar à ConA-sefarose foi comparada à da 13-glucuronidase não tratada. As enzimas foram incubadas com 50 uL de contas de ConA em 20 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 0.5 M de NaCl por 15 min à temperatura ambiente. As contas foram centrifugadas em velocidade máxima por 15 seg. O sobrenadante (fluxo) foi cuidadosamente retirado, testado para atividade de GUS e analisado por SDS-PAGE. Quando nós tratamos GUS exatamente como relatado por Grubb et al., 60% da atividade de ligação de ConA foi perdida e GUS não ligado estava presente apenas no fluxo de periodato tratado e subsequente amostra reduzida de boroidreto de sódio.

Administração de proteínas terapêuticas

[0091] De acordo com a invenção, uma proteína terapêutica da invenção é tipicamente administrada a um indivíduo sozinha, ou em composições ou medicamentos compreendendo a proteína terapêutica (por exemplo, na fabricação de um medicamento para o tratamento da doença), como aqui descrito. As composições podem ser formuladas com um veículo ou excipiente fisiologicamente aceitável para preparar uma composição farmacêutica. O veículo e composição podem ser estéreis. A formulação deve ser adequada ao modo de administração.

[0092] Veículos farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, sem limitação, água,soluções salinas (por exemplo, NaCl), solução salina, solução salina tamponada, alcoóis, glicerol, etanol, goma arábica, óleos vegetais, benzil alcoóis, polietileno glicóis, gelatina, carboidratos como lactose, amilose, ou amido, açúcares como manitol, su-

crose, ou outros, dextrose, estearato de magnésio, talco, ácido salicílico, parafina viscosa, óleo perfumado, ésteres de ácidos graxos, hidroximetilcelulose, polivinil pirrolidona, etc., assim como suas combinações. As preparações farmacêuticas podem, se desejado, ser misturadas com agentes auxiliares (por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizadores, agentes umidificantes, emulsificantes, sais para influenciar pressão osmótica, tampões, corantes, flavorizantes e/ou substâncias aromáticas e similares) que não reagem de forma deletória com compostos ativos ou interferência com sua atividade. Em uma modalidade de preferência, um veículo solúvel em água adequado para administração intravenosa é usado.

[0093] A composição ou o medicamento, se desejado, também pode conter pequenas quantidades de agentes umidificantes ou emulsificantes, ou agentes tamponantes de pH. A composição pode ser uma solução líquida, suspensão, emulsão, comprimido, pílula, cápsula, formulação de liberação sustentada, ou pó. A composição também pode ser formulada como supositório, com ligantes e veículos tradicionais como triglicerídeos. A formulação oral pode incluir veículos-padrão como graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, polivinil pirrolidona, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, etc.

[0094] A composição ou o medicamento pode ser formulado de acordo com os procedimentos de rotina como composição farmacêutica adaptada para administração a seres humanos. Por exemplo, em uma modalidade de preferência, uma composição para administração intravenosa tipicamente é uma solução em tampão aquoso isotônico estéril. Onde necessário, a composição também pode incluir um agente solubilizante e um anestésico sítio para aliviar a dor no sítio da injeção. Geralmente, os ingredientes são fornecidos separadamente ou misturados em forma de unidade de dosagem, por exemplo, como pó

liofilizado seco ou concentrado livre de água em um recipiente hermeticamente fechado como uma ampola ou sachê indicando a quantidade de agente ativo. Onde a composição deve ser administrada por infusão, pode ser dispensada por um frasco da infusão contendo água de grau farmacêutico estéril, salina, ou dextrose/água. Onde a composição é administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou salina pode ser fornecida de forma que os ingredientes sejam misturados antes da administração.

[0095] A proteína terapêutica pode ser formulada como formas neutras ou salinas.Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os formados com grupos amino livres como os derivados de ácidos hidroclórico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. e aqueles formados com grupos carboxil livres como os derivados de sódio, potássio, amônio, cálcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

[0096] Uma proteína terapêutica (ou uma composição ou medicamento contendo um terapêutico protein) é administrada por qualquer via apropriada. Em uma modalidade de preferência, uma proteína terapêutica é administrada intravenosamente. Em outras modalidades, uma proteína terapêutica é administrada por administração direta a um tecido alvo, como coração ou músculo (por exemplo, intramuscular), ou sistema nervoso (por exemplo, injeção direta no cérebro; intraventricularmente; intratecalmente). Alternativamente, uma proteína terapêutica (ou uma composição ou medicamento contendo uma proteína terapêutica) pode ser administrada parenteralmente, transdermicamente, ou transmucosalmente (por exemplo, oralmente ou nasalmente). Mais de uma via pode ser usada ao mesmo tempo, se desejado.

[0097] Uma proteína terapêutica (ou uma composição ou medicamento contendo uma proteína terapêutica) pode ser administrada sozinha, ou em conjunto com outros agentes, como anti-histamínicos

(por exemplo, difenidramina) ou imunossupressores ou outros agentes imunoterápicos que agem contra anticorpos de enzimas lisossomais marcadas com GILT. O termo "em conjunto com", indica que o agente é administrado antes de, ou ao mesmo tempo de, ou após a proteína terapêutica (ou uma composição ou medicamento contendo a proteína terapêutica). Por exemplo, o agente pode ser misturado em uma composição contendo a proteína terapêutica, e portanto, administrado ao mesmo tempo com a proteína terapêutica; alternativamente, o agente pode ser administrado ao mesmo tempo, sem misturar (por exemplo, por "colocando" o fornecimento do agente ou linha intravenosa pela qual a proteína terapêutica também é administrada, ou vice-versa). Em outro exemplo, o agente pode ser administrado separadamente (por exemplo, não misturado), mas dentro de um curto intervalo de tempo (por exemplo, dentro de 24 horas) da administração da proteína terapêutica.

[0098] Uma proteína terapêutica (ou uma composição ou medicamento contendo uma proteína terapêutica) é administrada em uma quantidade terapeuticamente eficiente (por exemplo, uma quantidade de dose que, quando administrada em intervalos regulares, é suficiente para tratar a doença, como melhorando os sintomas associados com a doença, prevenindo ou atrasando o início da doença, e/ou também aliviando a severidade ou frequência dos sintomas da doença, como descrito acima). A dose que será terapeuticamente eficiente para o tratamento da doença dependerá da natureza e extensão dos efeitos da doença, e pode ser determinada por técnicas clínicas padrão. Além disso, ensaios in vitro ou in vivo podem opcionalmente ser empregados para ajudar a identificar as variações de dosagem ótima usando métodos conhecidos na tecnologia. A dose precisa a ser empregada também dependerá da via de administração, e a seriedade da condição do paciente, e deve ser decidida de acordo com julgamento

médico e das circunstâncias de cada paciente. Doses eficientes podem ser extrapoladas a partir de curvas dose-resposta a partir de sistemas de testes em modelos animais *in vitro.* A dose terapeuticamente eficiente pode ser, por exemplo, cerca de 0,1-1 mg/kg, 1-5 mg/kg, 5-20 mg/kg, 20-50 mg/kg, ou 20-100 mg/kg. A dose eficiente para um indivíduo particular pode ser variada (por exemplo, aumentada ou diminuída) com o tempo, dependendo das necessidades do indivíduo. Por exemplo, em momentos de doença ou estresse físico, ou se os sintomas da doença piorarem, a quantidade da dosagem pode ser aumentada.

[0099] A quantidade terapeuticamente eficiente da proteína terapêutica (ou composição ou medicamento contendo a proteína terapêutica) é administrada em intervalos regulares, dependendo da natureza e extensão dos efeitos da doença, e continuamente. A administração em um "intervalo", como aqui usado, indica que a quantidade terapeuticamente eficiente é administrada periodicamente (como distinto de uma dose única). O intervalo pode ser determinado por práticas clínicas padrão. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é administrada duas vezes ao mês, mensalmente, a cada dois meses, três vezes por semana, duas vezes por semana, a cada duas semanas, semanalmente, a cada três semanas, ou diariamente. O intervalo de administração para um único indivíduo não precisa ser um intervalo fixo, mas pode variar com o tempo, dependendo das necessidades do indivíduo. Por exemplo, em momentos de doença ou estresse físico, ou se os sintomas da doença piorarem, a quantidade da dosagem pode ser diminuída.

[00100] Como aqui usado, o termo "a cada dois meses" significa administração uma vez a cada dois meses; o termo "mensalmente" significa administração uma vez ao mês; o termo "a cada três semanas" significa administração uma vez a cada três semanas; o termo "a

cada duas semanas" significa administração uma vez a cada duas semanas; o termo "semanalmente" significa administração uma vez por semana; e o termo "diariamente" significa administração uma vez ao dia.

[00101] A invenção adicionalmente pertence a uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína terapêutica, como aqui descrito, em um recipiente (por exemplo, frasco, garrafa, saco para administração intravenosa, seringa, etc.) com um rótulo contendo instruções para administração da composição do trtrataqmento de doença de Pompe, como pelos métodos aqui descritos.

[00102] A invenção ainda será mais especificamente descrita pelos exemplos a seguir. Os exemplos, porém, estão incluídos para fins de ilustração, não para limitação.

EXEMPLOS

Exemplo 1: A furina divide um marcador GILT baseado em IGF-II

[00103] ZC-701 foi desenvolvido para o tratamento da doença de Pompe. O ZC-701 é uma proteína quimérica que contém um marcador GILT IGF-II N-terminal unido através de um espaçador de três aminoácidos aos resíduos 70-952 de uma a-glucosidase ácida humana (hGAA). Especificamente, o ZC-701 inclui os aminoácidos 1 e 8-67 da IGF-II humana (por exemplo, A2-7 da IGF-II madura humana), a sequência espaçadora Gly-Ala-Pro, e aminoácidos 70-952 da GAA humana. A sequência de aminoácidos completa é mostrada abaixo. A sequência do espaçador está em destaque. A sequência N-terminal à sequência do espaçador reflete os aminoácidos 1 e 8-67 da IGF-II humana e sequência C-terminal à sequência do espaçador reflete os aminoácidos 70-952 da GAA humana. Os dois sítios de clivagem da furina potenciais dentro da sequência marcada de IGF-II estão destacados. As setas apontam para duas posições de clivagem potencial da furina.

AALC GGELVD TLQFVCGDRGFYF SRPA SRVSRRSRGIVEECCFRS CDLALLETYCATPA KSEGAPAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAP-DKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPP SYPSYKLE NLSS SEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPA NRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLNT TVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRD LAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALS WRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCR WGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFN KD GFRDFPAMV QELHQ GGRRYMMI VDPAI S S SGPA GS YRPYDE-GLRRGVFITNETGQPL IGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEF HDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCP NNELENPPYVPGVVGGT LQAATICAS SHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGT RPFVIS RSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGA-DVCGFLG NTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSE-PAQQAMRKALTLRYALLPHLY TLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSS TWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPIEAL GSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGL TTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVI-FLARNNTIVNEL VRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVS NFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFL VSWC (SEQ ID NO: 8)

[00104] No decorrer do desenvolvimento do ZC-701, tornou-se aparente que o Marcador GILT derivado de IGF-II em uma fração das moléculas ZC-701 está sujeito à clivagem proteolítica pela furina durante a produção em células CHO. A análise N-terminal do ZC-701 batelada 10-2F45-54 revelou a presença de duas sequências n-terminais. Uma conformada ao n-término previsto do ZC-701 indicando a presença da proteína ZC-701 prevista. A outra sequência n-terminal alinhada com a sequência dentro da porção do marcador do ZC-701 indicando a presença de um ZC-701 derivado consistente com uma clivagem endo-

proteolítica no resíduo de aminoácido 34 do ZC-701. Baseado nas taxas molares estimadas nos dois términos n, esta batelada de ZC-701 mostrou ter uma taxa 1:1 de espécies intactas e divididas.

[00105] Após o recebimento deste resultado, cada uma das outras bateladas de ZC-701 foi sujeito ao sequenciamento n-terminal. Todas as bateladas exibiram os mesmos términos N com as espécies divididas variando de 20-50% do composto total. Uma batelada, previamente mostrada como tendo baixa atividade de consumo, exibiu um conjunto de términos N indicativo de proteólise adicional. Concluiu-se que o evento proteolítico responsável pela segunda espécie nas quatro bateladas de ZC-701 foi perpetrado pela furina ou protease semelhante à furina.

[00106] A figura 1 mostra um mapa do término amino do ZC-701. Os dois resíduos de aminoácidos são os sítios do término n mapeado em todos as bateladas de ZC-701. O primeiro término N é o sítio da clivagem do peptídeo de sinal, que gera o término N previsto do ZC-701. O segundo resíduo é o sítio de um evento de clivagem proteolítica indesejado. A sequência de aminoácido proximal ao sítio da clivagem é Arg-Arg-Ser-Arg (SEQ ID NO: 9). Isto corresponde ao sítio de clivagem canônica de uma protease presente em células CHO chamada furina, que se divide após Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 10). A furina é um membro da família de pró hormônio convertases que inclui o PC3, uma protease responsável pela maturação da pró insulina em células de ilhotas pancreáticas. Na verdade, o sítio de clivagem do PC3 na pró insulina é conservado e idêntico ao sítio na qual a furina divide o marcador IGF-II.

[00107] A furina dividida ZC-701 difere em peso molecular do ZC-701 intacto por cerca de 3000 dáltons, o que representa menos de 3% de diferença no peso molecular. Devido à heterogeneidade do oligossacarídeo na proteína, a presença do ZC-701 dividido não foi previa-

mente detectada pelo SDS-PAGE. Porém, se o ZC-701 for inicialmente deglicosilado por tratamento com peptídeo n-glicosidase F (PNGase F), então a proteína dividida pode ser resolvida do ZC-701 intacto por SDS-PAGE.

[00108] Como mostrado na figura 2, a faixa 1 do gel SDS-PAGE mostra o padrão eletroforético de ZC-701 purificado deglicosilado. Duas faixas são evidentes. A faixa superior parece ser o ZC-701 intacto e a faixa inferior acredita-se ser ZC-701 com furina dividida. Para provar que a faixa inferior é certamente ZC-701 com furina dividida, as mesmas proteínas carregadas na faixa 1 foram primeiro tratadas com furina e então carregadas na faixa 2. Como mostrado na figura 2, todas as proteínas na faixa 2 co-migram com a faixa inferior na faixa 1 de forma que a faixa inferior é certamente ZC-701 com furina dividida.

[00109] Estima-se que a proporção de ZC-701 dividido com furina em um número de bateladas ZC-701 por quantificação da intensidade da faixa em SDS-PAGE e por quantificação de aminoácidos liberados em experimentos de sequência N-terminal. Como discutido acima, a fração do ZC-701 dividido variou de 20% a 50% em bateladas diferentes.

Exemplo 2. Proteínas de fusão direcionadas contendo marcador GILT em IGF-II resistente à furina

[00110] Pode-se contornar o problema da clivagem de furina alterando a sequência de aminoácidos do IGF-II de forma que a alteração de aminoácidos elimine pelo menos um sítio de clivagem da furina. Uma série de versões mutantes de ZC-701 foi gerada e testada para resistência à clivagem por furina. Versões mutantes de ZC-701 foram geradas como descrito abaixo.

ZC-701

[00111] O cassete GILTΔ2-7-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-

GILTΔ2-7-GAA70-952 (Plasmídeo p7001). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70.

[00112] ggtaccagagctagcaagetaattcacaccaATGGGAATCCCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTCTCAC CTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCAGGCCCGCAAG CCGTGTGAGCCGTCGCAGCCGTGG-CATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA CCTGG-CCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGG-CGCGCCGgca caccccggccgteccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccec-caacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccca ggaacagtgcgagg-cccgeggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcag-ccctggtgcttcttcc cacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagetectctgaaa-tgggctacacggccaccctgacccgtaccacceccaccttctt ccccaaggacatcctgac-cctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagc-taacaggcg ctacgaggtgccettggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtecccac-tetacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggt gatcgtgcaccggcagctggacgg-ccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgeggaccagttccttcagctgtccacc tcgctgccacgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcac-cagctggaccaggatcaccctgtggaacc gggaccttgcgcccacgcceggtgcgaacctc-tacgggtetcaccattctacctggcgctggaggacggegggtcggcacacggggtg ttectgc-taaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgaca-ggtgggatectggatgtctacat cttectgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtac-ctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatactggggcctgggettc cacctgtgccg-ctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccac-ttcceccctggacgtccaa tggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgtt-caacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagag caccagggcggccgg-

cgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctegggccctgccgggagctacaggccc-
tacgacgagg gtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgg-
gaaggtatggcccgggtccactgecttecccgacttca ccaaccccacagccctggcctgg-
tgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgccatcgacggcatgtggattgaca-
tgaacg agccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctgga-
gaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggga ccctccaggcggcaaccatctgtg-
cctccagccaccagtttactccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaag-
ccatc gcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccg-
ctcgacctttgctggccacggccgatacgccggc cactggacgggggacgtgtggag-
ctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgeggatcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgegctggac-
ccagaggggccttctacccctcatgc ggaaccacaacagcctgctcagtctgccccagga-
gccgtacagettcagegagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccct

[00113] gcgctacgcactectcceccacctetacacgctgaccaccaggcccacgtcg-
cgggggagaccgtggcccggcccetatcctggagtt ccccaaggactetagcacctggactg-
tggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgaccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttecccettgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaata-
gaggccettggcagcctcccacccccacctg cagctecccgtgagccagccatccacag-
cgaggggcagtgggtgacgctgccggcccecctggacaccatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatcccectgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcag-
cccatggccctggctgtggccctgaccaagg gtggagaggcccgaggggagctgactggga-
cgatggagagagcctggaagtgctggagegaggggcctacacacaggtcatcttcct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctg-
cagctgcagaaggtgactgtcctgggcg tggccacggcgccccagcaggtectctccaacgg-
tgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc tcgctg-
ttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgctagcggccgc (SEQ ID
NO: 11)

[00114] *Construto 1459*

[00115] O cassete GILTΔ2-7/K37-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-

GILTΔ2-7/K37-GAA70-952 (Plasmídeo p1459). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7/K37 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7/K37 contém uma substituição de Arg por Lys no aminoácido 37 da sequência de IGF-II humana (em maiúsculo).

[00116] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATC CAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG CCGTGTGAGCAAGCGCAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca caccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccca ggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcc cacccagetaccccagetacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacceccaccttctt ccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg ctacgaggtgcccaggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtecccactctacagcgtggagttctctgaggagccettcggggt gatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgccectgttattgeggaccagttecttcagagtccacc tcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagaggaccaggatcaccctgtggaacc gggaccagcgcccacgcceggtgegaacctetacgggtctcaccattctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtg ttectgctaaacagcaatgccatggatgtggtectgcagccgagccctgccettagetggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat cttectgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatactggggcctgggcttc cacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtgg-

tggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaa tggaacgacctggactacatg-
gactcceggagggacttcacgacaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcag-
gagctg caccagggeggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcageteggg-
ccctgccgggagetacaggccctacgacgagg gtctgcggaggggggttacatcac-
caacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccaccccgactt-
ca ccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagaccatgaccaggtg-
ccatcgacggcatgtggattgacatgaacg agccttccaacttcatcaggggetctgagga-
cggctgccccaacaatgagctggagaacccaccetacgtgcctggggtggaggggggga
ccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctg-
cacaacctctacggcctgaccgaagccatc gcctcccacagggcgctggtgaagg-
ctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggc
[00117] cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtg-
ccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg gtegggccgacgtctgeggctt-
cctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccctt-
catgc ggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagettcagegag-
ccggcccagcaggccatgaggaaggccacaccct gcgctacgcactectcccccacctcta-
cacgctgttccaccaggcccacgtcgeggggggagaccgtggcceggccectatcctggagtt
ccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcat-
caccccagtgaccaggccgggaagg ccgaagtgactggctacttеccettgggcacatgg-
tacgacctgcagacggtgccaatagaggccdtggcagcctcccacccccacctg cag-
ctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggccccectgga-
caccatcaacgtccacctccgggc tgggtacatcatcccctgcagggccctggcctcacaac-
cacagagteccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagg gtggagagg-
cccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagegaggggccta-
cacacaggtcatcttcct ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccag-
tgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg tggccacggcgccccag-
caggtectaccaacggtgtecctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtectg-
gacatctgtgtc tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagettgc-
tagcggccgc **(SEQ ID NO: 12)**

Construto 1460

[00118] O cassete GILTΔ2-7/K37-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7/K40-GAA70-952 (Plasmídeo p1460). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7/K40 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. A fira GILTΔ2-7/K40 contém uma substituição de Arg por Lys no aminoácido 40 da sequência de IGF-II humana (em maiúsculo).

[00119] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATC CCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCAC CTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCAGGCCCGCAAG CCGTGTGAGCCGTCGCAGCAAGGG-CATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA CCTGG-CCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTAC CC C CGCCAAGTCC GAGGGC GC GC CGgca_cacccggccgteccagagcagtgcccacacagtg-cgacgtccccccaacagccgcttcgattgcgccectgacaaggccatcaccca ggaacag-tgcgaggcccgeggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccaga-tggggcagccctggtgettatcc cacccagetaccccagetacaagaggagaacctgag-ctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacceccaccttctt ccccaagga-catcctgaccctgeggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgat-caaagatccagctaacaggcg ctacgaggtgccettggagaccccgcgtgtccacag-ccgggcaccgtecccactetacagegtggagttctctgaggagccatcggggt gatcgtgcac-cggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgccectgttctttgcggacca-gttccttcagctgtccacc tcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcag-tcccctgatgctcagcaccagetggaccaggatcaccctgtggaacc gggaccttgcg-cccacgcceggtgegaacctctacgggtetcaccattctacctggcgctggaggacggcggg-tcggcacacggggtg ttcctgetaaacagcaatgccatggatgtggtectgcagccgag-

ccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat cttcctgggcccagag-
cccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatac-
tggggcctgggcttc cacctgtgccgctggggctactectccaccgctatcacccgccaggtgg-
tggagaacatgaccagggcccacttecccctggacgtccaa tggaacgacctggactacatg-
gactcceggagggacttcacgttcaacaaggatggatccgggacttеccggccatggtgcag-
gagctg caccagggeggccggcgctacatgatgatcgtggatectgccatcagcagctcggg-
ccctgccgggagctacaggccctacgacgagg gtctgeggaggggggttacatcac-
caacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgactt-
ca ccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtg-
ccatcgacggcatgtggattgacatgaacgagecttccaacttcatcaggggetctgagga-
cggctgccccaacaatgagctggagaacccaccetacgtgcctggggtggttgggggga
ccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagifictctecacacactacaacctg-
cacaacctetacggcctgaccgaagccatc gccteccacagggcgctggtgaagg-
ctcgggggacacgcccatttgtgatcteccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggc
cactggacgggggacgtgtggagetcctgggagcagctcgcctectccgtgccagaaatectg-
cagtttaacctgctgggggtgcctctg gtcggggccgacgtctgeggcttcctgggcaacacet-
cagaggagetgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctaccecttcatgc ggaacca-
caacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagettcagcgagccggcccagcagg-
ccatgaggaaggccetcaccct gcgctacgcactecteccccacctetacacgctgttccac-
caggcccacgtegegggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagtt ccccaaggactc-
tagcacctggactgtggaccaccagctectgtgggggggaggccctgetcatcaccccagtg-
ctccaggccgggaagg ccgaagtgactggctacttccecttgggcacatggtacgacctgca-
gacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacceccaectg cagcteccgtgagcca-
gccatccacagegaggggcagtgggtgacgctgccggccecctggacaccatcaacg-
tccacctccgggc tgggtacatcatcceectgcagggccctggcctcacaaccacagag-
tcccgccagcagcccatggccctggctgtggccetgaccaagg gtggagaggcccgaggg-
gagetgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagegaggggcctacacacagg-
tcatcttcct ggccaggaataacacgatcgtgaatgagetggtacgtgtgaccagtgagggag-
ctggcctgcagetgcagaaggtgactgtcctgggcg tggccacggcgecccagcaggtec-
tctccaacggtgtecctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtectggaca-

tctgtgtc tcgctgttgatgggagagcagtttetcgtcagetggtgttagtctagagettgctageggccgc **(SEQ ID NO: 13)**

Construto 1461

[00120] O cassete GILTΔ2-7/A37-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7/A37-GAA70-952 (Plasmídeo p1461). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7/A37 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7/A37 contém uma substituição de Arg por Lys no aminoácido 37 da sequência de IGF-II humana (em maiúsculo).

[00121] ggtaccagetgetagcaagetaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCC GCAAG CCGTGTGAGCGCTCGCAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca caccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgteccecccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccca ggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagecctggtgettcttcc cacccagetaccccagctacaagctggagaacctgagctectctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacceccaccttctt ccccaaggacatectgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagetaacaggcg ctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtecccactctacagcgtggagttctctgaggagccettcggggt gatcgtgcaccggcagetggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgeggaccagttccttcagctgtccacc tcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcaectcagtecctgatgctcagcaccagetggaccaggatcaccctgtggaacc gggaccttgcgcccacgcccggtgcgaaccteta-

cgggtetcacctttctacctggcgctggaggacggcgggteggcacacggggtg ttcctgc-
taaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgccettagctggaggtegaca-
ggtgggatcctggatgtctacat cttcctgggcccagagcccaagagegtggtgcagcagtac-
ctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatactggggcctgggcttc cacctgtgccg-
ctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccact-
teccectggacgtccaa tggaacgacctggactacatggactcceggagggacttcacgtt-
caacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagetgcaccagggeggccgg-
cgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagetcgggccctgccgggagctacaggcce-
tacgacgagg gtctgeggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgg-
gaaggtatggcceggtccactgccttccccgacttca ccaaccccacagccctggcctgg-
tgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgccettcgacggcatgtggattgaca-
tgaacg agccttccaacttcatcaggggactgaggacggctgccccaacaatgagctgga-
gaacccaccetacgtgcctggggtggttgggggga ccctccaggcggcaaccatctgtg-
cctccagccaccagtttactccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaag-
ccatc gcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgc-
tegacctttgctggccacggccgatacgccggc cactggacgggggacgtgtggag-
ctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgcggatcctgggcaacacctcagaggagagtgtgtgcgctggac-
ccagctgggggccttctacccettcatgc ggaaccacaacagcctgetcagtctgccccagga-
gccgtacagcttcagegagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccct gcgc-
tacgcactcctecccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccg-
tggcceggcccacttectggagtt ccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccag-
ctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaagg ccgaagtgac-
tggctacttcccettgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggccatggcag-
cctcccacccccacctg cagctccccgtgagccagccatccacagegaggggcagtggg-
tgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggc tgggtacat-
catccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagteccgccagcagcccatggccctgg-
ctgtggccctgaccaagg gtggagaggcccgaggggagagttctgggacgatggagagag-
cctggaagtgctggagegaggggcctacacacaggtcatcttcct ggccaggaataaca-
cgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaagg-

tgactgtcctgggcg tggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtecctg-tctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc tcgctgttgatggga-gagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagettgctagcggccgc **(SEQ ID NO: 14)**

Construto 1463

[00122] O cassete GILTΔ2-7/A40-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7/A40-GAA70-952 (Plasmídeo p1463). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7/A40 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. A fira GILTΔ2-7/A40 contém uma substituição de Arg por Lys no aminoácido 40 da sequência de IGF-II humana (em maiúsculo).

[00123] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCAGGCCCGCAAG CCGTGTGAGCCGTCGCAGCGCTGG-CATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA CCTGG-CCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGG-CGCGCCGgca caccccggccgteccagagcagtgcccacacagtgegacgtec-cccccaacagccgcttcgattgcgccectgacaaggccatcaccca ggaacagtgcgagg-cccgeggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcag-ccctggtgcttcttcc cacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagetcctctgaaa-tgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttat ccccaaggacatcctgac-cctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagc-taacaggcg ctacgaggtgccettggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtecccac-tctacagcgtggagttctctgaggagccatcggggt gatcgtgcaccggcagctggacggccg-cgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacc tcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcac-

cagctggaccaggatcaccctgtggaacc gggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctc-
tacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtg ttectge-
taaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagaggaggtegaca-
ggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcag-
tacctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatactggggcctgggcttc cacctgtgccg-
ctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccac-
ttccccctggacgtccaa tggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgtt-
caacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctg caccagggeggccgg-
cgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagetcgggccctgccgggagctacaggccc-
tacgacgagg gtctgeggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgg-
gaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttca ccaaccccacagccctggcctgg-
tgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgccettcgacggcatgtggattgaca-
tgaacg agccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctgga-
gaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggga ccctccaggcggcaaccatctgtg-
cctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgac-
cgaagccatc gcctcccacagggcgctggtgaaggctegggggacacgcccatttg-
tgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggc cactggacgggggacgtg-
tggagctcctgggagcagctcgcctectccgtgccagaaatcctgcagtttaacctg-
ctgggggtgcctctg gtegggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctg-
tgtgtgcgctggacccagctgggggccttctaccecttcatgc ggaaccacaacagcctgctca-
gtctgccccaggagccgtacagatcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccct-
caccct gcgctacgcactectcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcg-
cgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagtt ccccaaggactctagcacctggactg-
tggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttcccctgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaata-
gaggccettggcagcctcccacccccacctg cagctccccgtgagccagccatccacag-
cgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcag-
cccatggccctggctgtggccctgaccaagg gtggagaggcccgaggggagctgttctggga-
cgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcct

ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctg-cagctgcagaaggtgactgtectgggcg tggccacggcgccccagcaggtcctctccaacgg-tgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtectggacatctgtgtc tcgctg-ttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgctageggccgc **(SEQ ID NO: 15)**

Construto 1479

[00124] O cassete GILTΔ2-7M1/K37-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7M1/K37-GAA70952 (Plasmídeo p1479). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7-M1/K37 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. A fira GILTΔ2-7M1/K37 contém uma substituição de Arg por Lys no aminoácido 37 da sequência de IGF-II humana (em maiúsculo).

[00125] ggtaccaagcttgccATGGGAATCCCAATGGGCAAG-TCGATGCTGGTGCTGCTCACCTTCTT GGCCTTTGCCTC GTG-CTGCATTGCC GCTCTGTGC GGC GGGGAACTGGTGGACACC CTCCAATTCGTCTGTGGGGACCGGGGCTTCTACTTCAGCAGAC-CCGCAAGCCGTGTGAG TAAGCGCAGCCGTGGCATTGTTGAGGA-GTGCTGTTTTCGCAGCTGTGACCTGGCTCT CCTGGAGACGTAC-TGCGCTACCCCCGCCAAGTCTGAGGGCGCGCCGgcacaccccgg-ccgtc ccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgcg-cccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctg-caaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgatcttcccacccagctac-cccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccg-taccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggaga-ctgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttg-gagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtecccactetacagcgtggagttctctgagga-gcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtgg-

cgcccctgttattgcggaccagttecttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatca-
caggcctcgccgagcacctcagtccectgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctg-
tggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcaccattctac-
ctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatgga-
tgtggtectgcagccgagccctgccettagetggaggtegacaggtgggatcctggatgtcta-
catcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggatac-
ccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccac-
cgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccectggacgtccaatg-
gaacgacctggactacatggacteccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgg-
gacttcccggccatggtgcaggagagcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtgga-
tcctgccatcagcagctegggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgegga-
ggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcceggg-
tccactgccttecccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtgg-
ctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaac-
ttcatcaggggetctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtg-
cctggggtggttgggggaccaccaggcggcaaccatctgtgectccagccaccagttt-
ctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccaca-
gggcgctggtgaaggetcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctgg-
ccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagetectgggagcagetcg-
cctcctccgtgccagaaatectgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccga-
cgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagetggggg-
ccttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacag-
cttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcac-
tcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccgg-
cccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctg-
tgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggc-
tacttecccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcag-
cctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagegaggggcagtgggtga-
cgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatcccectg-
cagggccctggcctcacaaccacagagteccgccagcagcccatggccctggctgtgg-

ccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagagttctgggacgatggagagagectgga-
agtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatettcctggccaggaataacacgatcgtga-
atgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactg-
tcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtecctgtctccaactt-
cacctacagccccgacaccaaggtectggacatctgtgtacgctgttgatg ggagagcagttt-
ctcgtcagctggtgttagtctagagcttgctagcggccgc (SEQ ID NO: 16)

Construto 1487

[00126] O cassete GILTΔ2-7M1/A37-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7M1/A37-GAA70952 (Plasmídeo p1487). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7-M1/A37 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. A fira GILTΔ2-7M1/A37 contém uma substituição de Arg por Lys no aminoácido 37 da sequência de IGF-II humana (em maiúsculo).

[00127] ggtaccaagettgccATGGGAATCCCAATGGGCAAGTC GATGCTGGTGCTGC TCAC CTTC TTGGCCTTTGCCTCGTGCTG-CATTGCCGCTCTGTGCGGCGGGGAACTGGTGGACACCCT CCAA-TTCGTCTGTGGGGACCGGGGCTTCTACTTCAGCAGACC CGCAAGCCGTGTGAG TGCTCGCAGCCGTGGCATTGTTGAGGAG-TGCTGTTTTCGCAGCTGTGACCTGGCTCT CCTGGAGAC GTAC-TGC GCTAC C CCC GC CAAGTCTGAGGGC GCGCCGgcacac-cccggccgtc ccagagcagtgcccacacagtgcgacgtecceccaacagccgcttcgattg-cgccectgacaaggccatcacccaggaacagtgegaggcccgcggctgctgctacatccctg-caaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagetac-cccagetacaagctggagaacctgagacctctgaaatgggctacacggccaccctgacccg-taccacccccaccttatccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagac-tgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgga-gaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggag-

ccatcggggtgatcgtgcaccg gcagaggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcg-
ccectgttctttgcggaccagttcatcagctgtccacctcgctgccetcg cagtatatcacagg-
cctcgccgagcacctcagtccectgatgetcagcaccagctggaccaggatcaccctgtgga-
accgggaccttgcg cccacgcceggtgegaacctctacgggtctcacccttttctacctggcg-
ctggaggacggegggteggcacacggggtgttectgetaaac agcaatgccatggatgtgg-
tcctgcagccgagccctgccettagetggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctaca-
tcttcctgggccc agagcccaagagegtggtgcagcagtacctggacgttgtgggatacccgtt-
catgccgccatactggggc ctgggettccacctgtgccg ctggggctactcctccaccgctat-
cacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttecectggacgtccaatgga-
acgacct ggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggettccgggac-
ttcceggccatggtgcaggagctgcaccagggcg gccggcgctacatgatgatcgtgga-
tcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcg-
gagg ggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcceggg-
tccactgecttecccgacttcaccaaccccaca gccctggcctggtgggaggacatggtgg-
ctgagttccatgaccaggtgccatcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaact
tcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccetacgtg-
cctggggtggttgggggaccctccaggcg gcaaccatctgtgectccagccaccagtac-
tctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacag
ggcgctggtgaaggetcgggggacacgcccatttgtgatcteccgctegacctttgctgg-
ccacggccgatacgccggccactggacgg gggacgtgtggagacctgggagcagctcgcc-
tectccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtegggccg acg-
tctgeggcttectgggcaacacctcagaggagagtgtgtgcgctggacccagctggggg-
ccttctaccecttcatgcggaaccacaa cagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagctt-
cagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgca ctectccec-
cacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgc gggggagaccgtggcceggcccctct-
tectggagttccccaaggact ctagcacctggactgtggaccaccagctectgtgggggggagg-
ccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgact ggctactt-
ccecttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggccettggcagcctcccac-
ceccacctgcagctecccgt gagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctg-
ccggccccectggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatca tccccctgcaggg-

ccctggcctcacaaccacagagteccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgac-caagggiggagaggc ccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtg-ctggagegagggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaata acacgatcgtgaa-tgagetggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagetgcagaaggtgactg-tcctgggcgtggccacggcg ccccagcaggtectctccaacggtgtecctgtctccaacttcac-ctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtacgctgttgatg ggagagcagtttctcgt-cagctggtgttagtctagagcttgctagcggccgc **(SEQ ID NO:17)**

[00128] Como mostrado na figura 3, três mutantes exemplares (por exemplo, construtos 1459, 1460 e 1461) nos quais a alanina ou lisina foram substituídas por um dos resíduos canônicos de arginina foram expressados sem clivagem detectável por furina. Como também mostrado na figura 3 (painel direito), o construto 1461 contendo uma substituição R37A é adicionalmente resistente à adição de furina exógena.

Construto 1726

[00129] O cassete GILTΔ2-7A30-39-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A30-39-GAA70-952 (Plasmídeo p1726). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-39 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A30-39 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 30-39 (Arg-Pro-Ala-SerArg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00130] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATC CCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCCGTGGCATCGT TGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGAC-CTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTAC CCCCGCCAAGTCC

GAGGGC GC GC C Ggcacacccggccgteccagagcagtgcccacacagtge-
gacgtcccc cccaacagccgettcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacag-
tgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagca ggggctgcagggagcccaga-
tggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagetacaagetggagaacctgag-
ctcctctga aatgggctacacggccaccctgacccgtaccacceccaccttettccccaagga-
catcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagact gagaaccgcctccacttcacgat-
caaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccggg-
cacc gtecccactctacagegtggagttctctgaggagccettcggggtgatcgtgcaccgg-
cagctggacggccgcgtgctgctgaacacgac ggtggcgcccctgactttgeggaccagttec-
ttcagctgtceacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcc
cctgatgctcagcaccagaggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacg-
cccggtgegaacctetacgggtctcaccc tttctacctggcgctggaggacggcgggtcggca-
cacggggtgttectgctaaacageaatgccatggatgtggtectgcagccgagccct gccet-
tagetggaggtegacaggtgggatcctggatgtetacatcttcctgggcccagag-
cccaagagegtggtgcagcagtacctggac gttgtgggatacccgttcatgccgccatac-
tggggcctgggettccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggt
ggtggagaacatgaccagggcccacttcceectggacgtccaatggaacgacctggactaca-
tggactcccggagggacttcacgttcaa caaggatggcttccgggacttеccggccatggtg-
caggagetgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatca gcagc-
tegggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggattcatcac-
caacgagaccggccagcegct gattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgact-
teaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagtt ccatgaccaggtg-
ccatcgacggcatgtggattgacatgaacgagecttccaacttcatcaggggetctgagga-
cggctgccccaacaat gagetggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggga-
cectccaggeggcaaccatctgtgcetccagccaccagtttetctec acacactacaacctg-
cacaacctetacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggc-
tegggggacacgcccatt tgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccgg-
ccactggacgggggacgtgtggagetcctgggagcagctcgcctc ctccgtgccagaaatec-
tgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgeggcttcctgggcaa-
cacctcagaggag ctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccettcatgcgga-

accacaacagectgctcagtctgccccaggagccgtacaget tcagcgagccggcccagca-ggccatgaggaaggccetcaccctgcgctacgcactecteccccacctctacacgctgtt-ccaccaggcc cacgtcgcgggggagaccgtggcceggcccetcttectggagttecccaag-gactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgg ggggaggccctgctcatcacccca-gtgaccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccettgggcacatggtacgaectgca gacggtgccaatagaggcccttggeagcctcccacccccacctgcagctceccgtgagccag-ccatceacagegaggggcagtgggtg acgctgccggccccectggacaccatcaacg-tccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacaga gtcce-gccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggag-ctgttctgggacgatggagagag cctggaagtgctggagegaggggcctacacacaggtca-tettectggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccag tgagggag-ctggcctgcagetgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcagg-tcctctccaacggtgtccctgtetc caacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggaca-tctgtgtetcgctgttgatgggagagcagtttetcgtcagctggtgttagtetaga gcttgctag-cggccgc **(SEQ ID NO:18)**

Construto 1749

[00131] O cassete GILTΔ2-7A31-39-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A31-39-GAA70-952 (Plasmídeo p1749). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência espaçadora de aminoácidos Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A31-39 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A30-39 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 31-39 (Arg-Pro-Ala-SerArg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00132] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-

CAGCAGGCGTGGCAT CGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTG-
TGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGC TACCCC C
GCCAAGTC CGAGGGCGC GC CGgcacacccggccgtcccagagcagtg-
cccacacagtgcgacgt_ccceccccaacagccgcttcgattgcgccectgacaaggccatcac-
ccaggaacagtgegaggcccgcggctgctgctacatccctgcaa agcaggggctgcagg-
gagcccagatggggcagccctggtgettatcccacccagctaccccagctacaagctgga-
gaacctgagctcc tctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccacctta-
tccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatgg agactgagaaccgcctccac-
ttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgccatggagaccccgcgtgtcca-
cagccgg gcaccgtccccactctacagegtggagttctctgaggagcccttegggggtgatcg-
tgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaac acgacggtggcgcccctgttctagcg-
gaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacct
cagtccectgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg-
cccacgcceggtgcgaacctctacgggt ctcaccattctacctggcgctggaggacggeggg-
tcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagcc gag-
ccctgccatagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggccca-
gagcccaagagcgtggtgcagcagta cctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatac-
tggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcaccc gccaggtgg-
tggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatg-
gactcccggagggacttc acgttcaacaaggatggcttccgggacttecggccatggtgcag-
gagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcct gccatcagcagctegggc-
ccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcac-
caacgagaccggcc agccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgecttccccgactt-
caccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtgg ctgagttccatgaccaggtg-
ccatcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgagga-
cggctgcccc aacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggggac-
cctccaggeggcaaccatctgtgcctccagccaccagttt ctctccacacactacaacctgca-
caacctetacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctegggg-
gacacg cccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactg-
gacgggggacgtgtggagctcctgggagcagct cgcctectccgtgccagaaatcctgcagtt-

taacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctca gaggagctgtgtgtgcgctggacccagagggggccttctacccettcatgcggaaccacaa-cagcctgctcagtctgccccaggagccg tacagcttcagcgagccggcccagcagg-ccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactectcccccacctctacacgctgttccac caggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactc-tagcacctggactgtggaccaccagct cctgtgggggggaggccctgetcatcaccccagtg-ctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacga cctgca-gacggtgccaatagaggccettggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccag-ccatccacagcgaggggcag tgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacg-tccacctccgggctgggtacatcatcccectgcagggccctggcctcacaacc acagag-tcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggg-gagctgttctgggacgatgga gagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacagg-tcatcttectggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtg accagtgagggag-ctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcagg-tcctctccaacggtgtecc tgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtectggaca-tctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagaggtgttag tctagagcttgctagcgg-ccgc **(SEQ ID NO:19)**

Construto 1746

[00133] O cassete GILTΔ2-7A32-39-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A32-39-GAA70-952 (Plasmídeo p1746). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A32-39 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A32-39 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 32-39 (Ala-Ser-Arg-ValSer-Arg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00134] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCAC CTTCTTGGCCTTC GC

CTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGC GGCGGGGAGCTGGT GGA-
CACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCA-
GGCCCCGTGG CATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA-
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTG TGCTAC C CC CGCCAAG-
TCCGAGGGCGC GCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgc
gacgtecceccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtg-
cgaggcccgcggctgctgctacatccc tgcaaagcaggggctgcagggagcccaga-
tggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctga
gctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaag-
gacatcctgaccctgcggctggacgtgat gatggagactgagaaccgcctccacttcacgat-
caaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacag
ccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagccettegggtgatcgtg-
caccggcagctggacggccgcgtgctgct gaacacgacggtggcgccectgttctttgcggac-
cagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagc acctcag-
tcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg-
cccacgcccggtgcgaacctctacg ggtctcaccctactacctggcgctggaggacggeggg-
tcggcacacggggtgttectgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgca gccgag-
ccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggccca-
gagcccaagagegtggtgcagca gtacctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatac-
tggggcctgggettccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatca cccgccaggtgg-
tggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatg-
gactcccggaggga cttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcag-
gagctgcaccagggeggccggcgctacatgatgatcgtgga tectgccatcagcagctcggg-
ccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcac-
caacgagaccg gccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttecccgactt-
caccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatg gtggctgagttccatgaccaggtg-
ccettcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgagga-
cggctg ccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggggac-
cctccaggeggcaaccatctgtgcctccagccacc agtttctctccacacactacaacctgca-
caacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggga

cacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactg-
gacgggggacgtgtggagctectgggagc agctcgcctcctccgtgccagaaatectgcagtt-
taacctgctgggggtgcctctggtegggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacac ctca-
gaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctaccecttcatgeggaaccacaa-
cagcctgetcagtctgccccagga gccgtacagatcagc gagccggcccagcagg-
ccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactectcccccacctctacacgctgtt ccac-
caggcccacgtcgeggggggagaccgtggcccggcccctatcctggagttccccaaggactc-
tagcacctggactgtggaccacc agctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgac-
caggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggt acgacctgcaga-
cggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccag-
ccatccacagegaggg gcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacg-
tccacctccgggctgggtacatcatcccectgcagggccctggcctca caaccacagag-
tmcgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggg-
gagctgactgggacg atggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacagg-
tcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtac gtgtgaccagtgagggag-
ctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtectac-
caacggtgtecctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtectggacatctgtg-
tctcgctgttgatgggagagcagtactcgtcagctggt gttagtctagagcttgetagcggccgc

(SEQ ID NO:20)

Construto 1747

[00135] O cassete GILTΔ2-7A33-39-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A33-39-GAA70-952 (Plasmídeo p1747). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A33-39 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A33-39 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 33-39 (Ser-Arg-Val-S erArg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00136] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATC CCAA-
TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-
CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-
CAGCAGGCCCGCACG TGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCG-
CAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTA CTGTGCTAC-
CCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcag-
tgcccacaca gtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccat-
cacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctaca tecctgcaaagcaggggctgca-
gggagcccagatggggcagccctggtgcttettcccacccagetaccccagctacaagctg-
gagaac ctgagacctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttct-
tecccaaggacatcctgaccctgeggctggacg tgatgatggagactgagaaccgcctccac-
ttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtcc
acagccgggcaccgtecccactctacagcgtggagactctgaggagcccttcggggtgatcg-
tgcaccggcagctggacggccgcgtg ctgctgaacacgacggtggcgccectgttctttgcg-
gaccagttecttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgcc gagcacct-
cagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg-
cccacgcceggtgcgaacct ctacgggtctcaccattctacctggcgctggaggacggeggg-
tcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtc ctgcagccgag-
ccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttectgggccca-
gagcccaagagcgtggtg cagcagtacctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatac-
tggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccg ctatcacccgccaggtgg-
tggagaacatgaccagggcccacttecccctggacgtccaatggaacgacctggactacatg-
gactccegga gggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcag-
gagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatc gtggatectgccatcagcagctcggg-
ccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacga
gaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgecttccccgacttcac-
caaccccacagccctggcctggtgggagg acatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttc-
cgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggac ggctg-
ccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgectggggtggttgggggaccaccagg-

cggcaaccatctgtgcctccag ccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctc-tacggcctgaccgaagccatcgccteccacagggcgctggtgaaggctcgg gggacacg-cccatagtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggg-gacgtgtggagctcctgg gagcagctcgcctectccgtgccagaaatectgcagtttaacctg-ctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggca acacctcagaggagetg-tgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccatcatgeggaaccacaacagcctgct-cagtctgcccca ggagccgtacagettcagcgagccggcccagcaggccatgaggaagg-ccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgc tgttccaccaggcccacgtcg-cgggggagaccgtggcceggccectettcctggagttccccaaggactctagcacctggac-tgtggacc accagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccggga-aggccgaagtgactggctacttccccttgggcacat ggtacgacctgcagacggtgccaata-gaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagetccccgtgagccagccatccacagcgag gggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggta-catcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtmcgccagcagcccatgg-ccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggac gatg-gagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttectggccaggaa-taacacgatcgtgaatgagctggt acgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgca-gaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacg gtgtccctg-tctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgg-gagagcagtttctcgtcagctg gtgttagtctagagcttgctagcggccgc **(SEQ ID NO:21)**

Construto 1758

[00137] O cassete GILTΔ2-7A34-39-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A34-39-GAA70-952 (Plasmídeo p1758). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A34-39 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A34-39 contém uma eliminação de resí-

duos de aminoácidos 34-39 (Arg-Val-SerArg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00138] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATC CAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCAGGCCCGCAAG CCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTT-CCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGAC GTACTGTGCTAC-CCCCGCCAAGTCC GAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagca-gtgccc acacagtgcgacgtccecccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccat-cacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgct gctacatccctgcaaagcaggggctgca-gggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagetaccccagetacaagag gagaacctgagctectctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccacct-tettccccaaggacatcctgaccctgcggc tggacgtgatgatggagactgagaaccg-cctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgccettggagaccccgc gtgtccacagccgggcaccgtmccactctacagcgtggagttactgaggagcccttegggg-tgatcgtgcaccggcagctggacggcc gcgtgctgctgaacacgacggtggcgccectgtta-ttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcc tcgccgag-cacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggac-cttgcgcccacgcceggtgcg aacctctacgggtctcaccetttctacctggcgctggagga-cggcgggteggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatg tggtcctgcag-ccgagccctgccatagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctggg-cccagagcccaagagcgt ggtgcagcagtacctggacgttgtgggatacccgttcatgccg-ccatactggggcctgggettccacctgtgccgctggggctactectcca ccgctatcacccg-ccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctg-gactacatggactccc ggagggacttcacgttcaacaaggatggettccgggacttеccgg-ccatggtgcaggagctgcaccagggeggccggcgctacatgatg atcgtggatcctgccat-cagcagctcgggccctgccgggagetacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggg-ttttcatcaccaac gagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgcctt-ccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtggga ggacatggtggctgagttccatga-

ccaggtgccatcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcagggg-
ctctgagg acggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtgg-
ttgggggaccctccaggcggcaaccatctgtgcctcc agccaccagtttactccacacacta-
caacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaagg-
ctc gggggacacgcccatttgtgatcteccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccgg-
ccactggacgggggacgtgtggagctcct gggagcagetcgcctectccgtgccagaaatec-
tgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttectggg caacac-
ctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccatcatgcggaacca-
caacagcctgctcagtctgcce caggagccgtacagatcagegagccggcccagcagg-
ccatgaggaaggccetcaccctgcgctacgcactcctcccccacctetacac

[00139] gctgttccaccaggcccacgtegegggggagaccgtggcccggcccactt-
cctggagaccccaaggactctagcacctggactgtgga ccaccagctectgtgggggggagg-
ccctgetcatcaccccagtgaccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttecccttggg-
ca catggtacgacctgcagacggtgccaatagaggccettggcagectcccacecccacctg-
cagaccccgtgagccagccatccacagc gaggggcagtgggtgacgctgccggcccec-
ctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctgg cct-
cacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtgga-
gaggcccgaggggagctgttctgg gacgatggagagagectggaagtgctggag-
cgaggggcctacacacaggtcatatcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagct
ggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtgg-
ccacggcgccccagcaggtcctetcca acggtgtccctgtaccaacttcacctacagccccga-
caccaaggtectggacatctgtgtetcgctgttgatgggagagcagtttctcgtca gctggtgttag-
tctagagcttgctagcggccgc **(SEQ ID NO:22)**

Construto 1750

[00140] O cassete GILTΔ2-7A35-39-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A35-39-GAA70-952 (Plasmídeo p1750). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A35-39 (sequência em maiúsculo). O es-

paçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A35-39 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 35-39 (Val-SerArg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00141] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATC CCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACC CTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTC TACTT-CAGCAGGC CC GCAAG CCGTCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTG-TTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGA GACGTACTGTGC-TACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtccca-gagcag tgcccacacagtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgcgc ccctga-caaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcgg ctgctgctacatccctgcaaagca-ggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagcta-caa gctggagaacctgagetectctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccac-ceccaccttatccccaaggacatectgaccctg cggctggacgtgatgatggagac-tgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgga-gacc ccgcgtgtccacagccgggcaccgtecccactctacagcgtggagttctctgaggag-cccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggac ggccgcgtgctgctgaacacgacggtgg-cgcccctgttctttgeggaccagttecttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcaca ggcctcgccgagcacctcagtccectgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtg-gaaccgggacettgcgcccacgcccgg tgcgaacctctacgggtctcacccttttctacctgg-cgctggaggacggcgggtcggcacacggggtg ttectgetaaacagcaatgccatg gatg-tggtectgcagccgagccctgcccttagctggaggtegacaggtgggatcctggatgtcta-catcttcctgggcccagagcccaaga gcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggatac-ccgttcatgccgccatactggggcctgggettccacctgtgccgctggggctactc ctccaccgc-tatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatgga-acgacctggactacatgga cteccggagggacttcacgttcaacaaggatggettccgggac-ttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctaca tgatgatcgtgga-tcctgccatcagcageteggcccctgccgggagctacaggccetacgacgagggtctgcgga-

gggggggttttcatca ccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccggg-
tccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggt gggaggacatggtgg-
ctgagttccatgaccaggtgccettcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaac-
ttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtg-
cctggggtggttgggggaccctccaggcggcaaccatctgtg cctccagccaccagttt-
ctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccaca-
gggcgctggtgaa ggctcgggggacacgcccatttgtgatcteccgctegacctttgctgg-
ccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtgga gctcctgggagcagctcgcc-
tectccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacg-
tctgcggctt cctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggcctt-
ctacccettcatgeggaaccacaacagcctgctcag tctgccccaggagccgtacagatcag-
cgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactecteccccacc
tctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttectg-
gagttccccaaggactctagcacctgga ctgtggaccaccagetcctgtgggggggagg-
ccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccct
tgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggccettggcagcctеccac-
ccccacctgcagetccccgtgagccagccatc cacagegaggggcagtgggtgacgctg-
ccggccecectggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagg
gccctggcctcacaaccacagagteccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgac-
caagggtggagaggcccgaggggagc tgttctgggacgatggagagagcctggaagtg-
ctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttectggccaggaataacacgatcgtga
atgagctggtacgtgtgaccagtgagggagaggcctgcagctgcagaaggtgactgtec-
tgggcgtggccacggcgccccagcaggtc ctctccaacggtgtecctgtetccaacttcaccta-
cagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtetcgctgttgatgggagagcagtttc tcgtca-
gctggtgttagtctagagcttgctagcggccgc (SEQ ID NO:23)

Construto 1748

[00142] O cassete GILTΔ2-7A36-39-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A36-39-GAA70-952 (Plasmídeo p1748). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos

espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A36-39 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A36-39 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 36-39 (Ser-Arg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00143] ggtaccagctgetagcaagetaattcacaccaATGGGAATC CAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCAGGCCCGCAAG CCGTGTGCGTGGCATCGTTGAGGAGTG-CTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCT GGAGAC GTACTG-TGCTAC C CC C GC CAAGTC C GAGGGC GC GC CGgcacaccccgg-ccgteccag____agcagtgcccacacagtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgcg-ccectgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcc cgcggctgctgctacatccctg-caaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgettatcccacccagctac-cccag ctacaagctggagaacctgagacctctgaaatgggctacacggccaccctgacccg-taccacccccaccttcttccccaaggacatcctg accctuggctggacgtgatgatggagac-tgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagetaacaggcgctacgaggtgcccttg gagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagegtggagttetctgagga-gccettcggggtgatcgtgcaccggca gctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtgg-cgccectgttattgeggaccagttccttcagetgtccacctcgctgccctcgcagt atatcacagg-cctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtgga-accgggaccttgcgccca cgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccttttctacctggcg-ctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagca atgccatggatgtgg-tcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctaca-tcttcctgggcccaga gcccaagagegtggtgcagcagtacctggacgttgtgggatacccgtt-catgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctgg ggctactectccaccgctat-cacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttecccctggacgtccaatgga-acgacctggac tacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggettccgggac-

ttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggeggccg gcgctacatgatgatcgtggatec-
tgccatcagcageteggcccctgccgggagetacaggccctacgacgagggtctgegga-
ggggg gtMcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccggg-
tccactgccttccccgacttcaccaaccccacagcce tggcctggtgggaggacatggtgg-
ctgagttccatgaccaggtgccatcgacggcatgtggattgacatgaacgagcatccaacttcatc
aggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctgggg-
tggttgggggaccetccaggcggcaa ccatctgtgcctccagccaccagtttctetccacaca-
ctacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggc gctgg-
tgaaggctegggggacacgcccatttgtgatacccgctegacctttgaggccacggccgata-
cgccggccactggacggggg acgtgtggagctectgggagcagctcgcctectccgtgcca-
gaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtegggccgacgt ctgeggettec-
tgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccctt-
catgeggaaccacaacag cctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgag-
ccggcccagcaggccatgaggaaggccetcaccctgcgctacgcactcc tcccccacctcta-
cacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcceggcccctettcctggag-
ttccccaaggactcta gcacctggactgtggaccaccagacctgtgggggaggccctgct-
catcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactgg ctacttccecttgggcaca-
tggtacgacctgcagacggtgccaatagaggccettggcagcctcccacccccacctgcaga-
ccccgtgag ccagccatccacagegaggggcagtgggtgacgctgccggcccecctgga-
caccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccc cctgcagggccctggcctcacaac-
cacagagteccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagagg-
cccga ggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggccta-
cacacaggtcatcttectggccaggaataacac gatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccag-
tgagggagctggcctgcagetgcagaaggtgactgtectgggcgtggccacggcgcccc ag-
caggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctg-
gacatctgtgtctcgctgttgatgggag agcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgc-
tagcggccgc **(SEQ ID NO:24)**

Construto 1751

[00144] O cassete GILTΔ2-7A29-40-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-

GILTΔ2-7A29-40-GAA70-952 (Plasmídeo p1751). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A29-40 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A29-7429 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 29-40 (Ser-Arg-Pro-AlaSer-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) da sequência de IGF-II humano.

[00145] ggtaccagctgetagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCAC CTTCTTGGC CTTC GC C TCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGA-CACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCGG-CATCGTTGAGGA GTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGG-CCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGC CAAGTCCGAGGG-CGCGCCGgcacaccccggccgteccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccec-cccaacagc cgcttcgattgcgccectgacaaggccatcacccaggaacagtgcgagg-cccgcggctgctgetacatccctgcaaagcaggggctgca gggagcccagatggggcag-ccctggtgatcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaa-atgggcta cacggccaccctgacccgtaccacccccaccttctteccaaggacatectgac-cctgeggctggacgtgatgatggagactgagaaccg cctccacttcacgatcaaagatccagc-taacaggcgctacgaggtgccettggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtecccact ctacagegtggagttctctgaggagccettcggggtgatcgtgcaccggcagctggacgg-ccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttattgeggaccagttecttcagctg-tccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgct ca-gcaccagaggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaac-ctetacgggtctcaccattctacct ggcgctggaggacggcgggteggcacacggggtgttec-tgetaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgccetta gctggaggtega-caggtgggatectggatgtetacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcag-tacctggacgttgtgg gatacccgttcatgccgccatactggggcctgggettccacctgtgccg-ctggggctactectccaccgctatcacccgccaggtggtgga gaacatgaccagggcccactt-

ccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggacteccggagggacttcacgttcaa-
caagga tggettccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggeggccggcgc-
tacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctc gggccctgccgggagctacaggccc-
tacgacgagggtctgcggagggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattggg
aaggtatggcceggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgg-
gaggacatggtggctgagttccatgac caggtgccatcgacggcatgtggattgaca-
tgaacgagecttccaacttcatcaggggetctgaggacggctgccccaacaatgagctgg
agaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggaccaccaggcggcaaccatctg-
tgectccagccaccagtactaccacacacta caacctgcacaacctctacggcctgac-
cgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctgggggacacgcccatttgtgatctc
ccgctegacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggag-
ctcctgggagcagctcgcctectccgtgc cagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtg-
cctctggtcggggccgacgtctgeggettectgggcaacacctcagaggagctgtgtgt gcg-
ctggacccagctgggggccttctaccecttcatgeggaaccacaacagectgctcagtctg-
ccccaggagccgtacagcttcagcga gccggcccagcaggccatgaggaaggccctcac-
cctgcgctacgcactectcccccacctetacacgctgttccaccaggcccacgtcg cgggggа-
gaccgtggcccggccectettectggagttccccaaggactctagcacctggactgtggac-
caccagctcctgtgggggggag gccctgetcatcaccccagtgetccaggccgggaagg-
ccgaagtgactggctacttcccctgggcacatggtacgacctgcagacggtg ccaatagagg-
ccettggcagcctcccacccccacctgcagctecccgtgagccagccatccacagcgagggg-
cagtgggtgacgctgc cggccccectggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacat-
catcccectgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgc cagcagcccatgg-
ccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatgga-
gagagcctggaa gtgctggagegaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaa-
taacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgaggga gctggcctgcagctgca-
gaaggtgactgtectgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctg-
tctccaacttca cctacagccccgacaccaaggtectggacatctgtgtctcgctgttgatggga-
gagcagtttctegtcagctggtgttagtctagagcttgcta **gcggccgc (SEQ ID NO:25)**

Construto 1752

[00146] O cassete GILTΔ2-7A30-40-GAA70-952 foi clonado usando

os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A30-40-GAA70-952 (Plasmídeo p1752). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-40 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A30-40 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 30-40 (Arg-Pro-Ala-SerArg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) da sequência de IGF-II humano.

[00147] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCGGCATCGTTGA GGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGAC-CTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCC CGCCAAG-TCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgteccagagcagtgcccacacagtge-gacgtccccccaa cagccgcttcgattgcgccectgacaaggccatcacccaggaacag-tgegaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccaga-tggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgag-ctcctctgaaatgg gctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaagga-catcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgaga accgcctccacttcacgat-caaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccggg-caccgtec ccactctacagcgtggagttctctgaggagccctteggggtgatcgtgcaccgg-cagaggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtg gcgcccctgttattgeggaccagttec-ttcagagtccacctcgctgccacgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtccectg atgctcagcaccagaggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgccegg-tgcgaacctctacgggtacaccattct acctggcgctggaggacggcgggtcggcaca-cggggtgttectgetaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcc cttag-ctggaggtegacaggtgggatectggatgtetacatcttcctgggcccagagcccaagageg-tggtgcagcagtacctggacgttg tgggatacccgttcatgccgccatactggggcctggga-

tccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggt ggagaacatga-
ccagggcccacttcccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggagg-
gacttcacgttcaacaa ggatggettccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcacca-
gggcggccggcgctacatgatgatcgtggatectgccatcagca gctegggccctgccggga-
gctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccag-
ccgctgatt gggaaggtatggcccgggtccactgecttccccgacttcaccaaccccacag-
ccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccat gaccaggtgccatcgacggcatgtg-
gattgacatgaacgagecttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgag
ctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggggaccctccaggeggcaaccatctg-
tgcctccagccaccagtttctaccacac actacaacctgcacaacctctacggcctgac-
cgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctegggggacacgcccatttgtga
tctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtg-
gagctectgggagcagctcgcctcctccg tgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtg-
cctctggtegggccgacgtctgcggatectgggcaacacctcagaggagctgtg tgtgcg-
ctggacccagagggggccttctacccccttcatgeggaaccacaacagectgctcagtctg-
ccccaggagccgtacagettcagc gagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcac-
cctgcgctacgcactecteccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgt cgcgggggа-
gaccgtggcccggcccetcttectggagttccccaaggactctagcacctggactgtggac-
caccagctectgtgggggg aggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaagg-
ccgaagtgactggctacttecccttgggcacatggtacgacctgcagacgg tgccaatagagg-
ccdtggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagegagggg-
cagtgggtgacgctg ccggccccectggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacat-
catcccectgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccg ccagcagcccatgg-
ccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagagttctgggacgatgga-
gagagcctgga agtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatettectggccaggaa-
taacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgaggg agctggcctgcagetgca-
gaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtectctccaacggtgtecctg-
tetccaacttc acctacagccccgacaccaaggtectggacatctgtgtetcgctgttgatggga-
gagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgct **agcggccgc (SEQ ID NO:26)**

Construto 1753

[00148] O cassete GILTΔ2-7A31-40-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A31-40-GAA70-952 (Plasmídeo p1753). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A31-40 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A31-40 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 31-40 (Pro-Ala-SerArg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00149] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCAGGGGCATCGT TGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGAC-CTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTAC C CC C GCCAAGTC C GAGGGCGCGCC Ggcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgega-cgtcccc cccaacagccgatcgattgcgccectgacaaggccatcacccaggaacagtg-cgaggcccgcggctgctgetacatecctgcaaagca ggggctgcagggagcccaga-tggggcagccctggtgatcttcccacccagetaccccagctacaagctggagaacctgag-ctcctctga aatgggctacacggccaccctgacccgtaccacceccaccttctteccaagga-catcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagact gagaaccgcctccacttcacgat-caaagatccagetaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacag-ccgggcacc gtccccactctacagcgtggagttetctgaggagcccttegggtgatcgtg-caccggcagaggacggccgcgtgctgctgaacacgac ggtggcgcccctgttctttgcggac-cagttecttcagagtccacctcgctgccetcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacct-cagtec cctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg-cccacgcceggtgcgaacctctacgggtetcaccc tttctacctggcgctggaggacggcggg-teggcacacggggtgttectgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccct

gccatagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtetacatcttcagggcccagagcccaa-
gagcgtggtgcagcagtacctggac gttgtgggatacccgttcatgccgccatactgggg-
cctgggatccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggt ggtgga-
gaacatgaccagggcccacttcccectggacgtccaatggaacgacctggactacatggac-
tcceggagggacttcacgttcaa caaggatggcttccgggacttеccggccatggtgcaggag-
ctgcaccagggeggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatca gcagctеggg-
ccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcac-
caacgagaccggccagccgct gattgggaaggtatggccegggtccactgccttccccgactt-
caccaaccccacagecctggcctggtgggaggacatggtggctgagtt ccatgaccaggtg-
ccatcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgagga-
cggctgccccaacaat gagaggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggggac-
cctccaggeggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttetctcc acacactacaacctgca-
caacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggga-
cacgcccatt tgtgatcteccgctegaccttgctggccacggccgatacgccggccactgga-
cgggggacgtgtggagetcctgggagcagetcgcctc ctccgtgccagaaatcctgcagtt-
taacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgeggettcctgggcaacaectca-
gaggag ctgigtgtgcgctggacccagagggggccttctaccectteatgeggaaccacaa-
cagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagct tcagcgagccggcccagcagg-
ccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcceccacctctacacgctgttccac-
caggcc cacgtcgcgggggagaccgtggcceggcccctcttectggagttccccaaggactc-
tagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgg ggggaggccctgetcatcaccccagtgac-
caggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccctgggcacatggtacgacctgca ga-
cggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctecccgtgagccag-
ccatccacagcgaggggcagtgggtg acgctgccggcccccctggacaccatcaacg-
tccacctccgggctgggtacatcatcccccctgcagggccctggcctcacaaccacaga gtec-
cgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggag-
ctgttctgggacgatggagagag cctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggt-
catcttectggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccag tgagggag-
ctggcctgcagetgeagaaggtgactgtectgggcgtggccacggcgccccagcaggtecte-
tccaacggtgtecctgtetc caacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtg-

tctcgctgttgatgggagagcagtttctegtcagetggtgttagtctaga gcttgctagcggccgc (SEQ ID NO:27)

Construto 1754

[00150] O cassete GILTΔ2-7A32-40-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A32-40-GAA70-952 (Plasmídeo p1754). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A32-40 (sequência em maiúsculo).

[00151] (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A32-40 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 32-39 (Ala-Ser-Arg-ValSer-Arg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00152] ggtaccagctgctagcaagetaattcacaccaATGGGAATCCCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCAGGCCCGGCAT CGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTG-TGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGC TACC CC CGC CAA-GTC C GAGGGC GC GCCGgcacaccccggccgteccagagcagtgcccacaca-gtgcgacgt ccccccccaacagccgcttcgattgcgccectgacaaggccatcacccaggaa-cagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaa agcaggggctgcagggagcccaga-tggggcagccctggtgatcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcc tctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttctteccaaggaca-tcctgaccctgcggctggacgtgatgatgg agactgagaaccgcctccacttcacgatcaaa-gatccagctaacaggcgctacgaggtgccdtggagaccccgcgtgtccacagccgg gcac-cgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcag-ctggacggccgcgtgctgctgaac acgacggtggcgccectgttctttgcggaccagttectt-cagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacct cag-tmcctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg-

cccacgcccggtgcgaacctctacgggt ctcaccattctacctggcgctggaggacggeggg-
tcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtectgcagcc gag-
ccctgccatagaggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagag-
cccaagagcgtggtgcagcagta cctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatac-
tggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactectccaccgctatcaccc gccaggtgg-
tggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatg-
gactcccggagggacttc acgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcag-
gagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcct gccatcagcagctegggc-
ccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcac-
caacgagaccggcc agccgctgattgggaaggtatggccegggtccactgccttccccgactt-
caccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtgg ctgagttccatgaccaggtg-
cccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgagga-
cggctgcccc aacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggggac-
cctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagttt ctctccacacactacaacctgca-
caacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctegggggga-
cacg cccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactgga-
cgggggacgtgtggagctcctgggagcagct cgcctectccgtgccagaaatcctgcagtt-
taacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctca
gaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccettcatgcggaaccacaa-
cagcctgctcagtctgccccaggagccg tacagcttcagcgagccggcccagcagg-
ccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccac
caggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttectggagttccccaaggactc-
tagcacctggactgtggaccaccagct cctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtg-
ctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacga cctgca-
gacggtgccaatagaggccatggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccag-
ccatccacagcgaggggcag tgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacg-
tccacctccgggctgggtacatcatcccectgcagggccctggcctcacaacc acagag-
tcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggg-
gagctgttctgggacgatgga gagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacagg-
tcatcttectggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtg accagtgagggag-

ctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcagg-
tcctctccaacggtgtecc tgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtectggaca-
tctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttag tctagagcttgctagcgg-
ccgc **(SEQ ID NO:28)**

Construto 1755

[00153] O cassete GILTΔ2-7A33-40-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A33-40-GAA70-952 (Plasmídeo p1755). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A33-40 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A33-40 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 33-40 (Ser-Arg-ValSer-Arg-Arg-Ser) da sequência de IGF-II humano.

[00154] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAA-
TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCAC CTTCTTGGCCTTCGCC
TC GTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGC GGGGAGCTGGT GGA-
CACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACC GCGGCTTCTACTTCAG-
CAGGCCCGCAGG CATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTG-
TGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTG TGCTACCCCCGCCAAG-
TCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgc
gacgtccecccaacagccgcttcgattgcgccectgacaaggccatcacccaggaacagtg-
cgaggcccgcggctgctgctacatcce tgcaaagcaggggctgcagggagcccaga-
tggggcagccctggtgatettcccacccagctaccccagctacaagaggagaacctga
gctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacceccaccttcttecccaag-
gacatectgaccctgcggctggacgtgat gatggagactgagaaccgcctccacttcacgat-
caaagatccagctaacaggcgctacgaggtgccatggagaccccgcgtgtccacag
ccgggcaccgtccccactctacagegtggagttctctgaggagccettcggggtgatcgtg-
caccggcagetggacggccgcgtgctgct gaacacgacggtggcgcccctgttattgcggac-

cagttecttcagagtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagc acctcag-
tecectgatgetcagcaccagaggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg-
cccacgcccggtgcgaacctetacg ggtctcaccetttctacctggcgctggaggacggeggg-
tcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtectgca gccgag-
ccctgccatagctggaggtegacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggccca-
gagcccaagagegtggtgcagca gtacctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatac-
tggggcctgggettccacctgtgccgctggggctactectccaccgctatca cccgccaggtgg-
tggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatg-
gacteccggaggga atcacgttcaacaaggatggettccgggacttceggccatggtgcag-
gagctgcaccagggeggccggcgctacatgatgatcgtgga tectgccatcagcagetcggg-
ccctgccgggagctacaggccetacgacgagggtctgeggaggggggttttcatcac-
caacgagaccg gccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgecttccccgactt-
caccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatg gtggctgagaccatgaccaggtg-
ccatcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggetctgagga-
cggctg ccccaacaatgagctggagaacccaccetacgtgcctggggtggttgggggac-
cctccaggeggcaaccatctgtgcctccagccacc agtttctetccacacactacaacctgca-
caacctetacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcggggga
cacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactg-
gacgggggacgtgtggagetectgggagc agctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtt-
taacctgctgggggtgcctctggtegggggccgacgtctgeggcttcctgggcaacac ctca-
gaggagagtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctaccecttcatgeggaaccacaaca-
gectgctcagtctgccccagga gccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgag-
gaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgtt ccaccagg-
cccacgtcgeggggggagaccgtggcceggccectettcctggagttecccaaggactetag-
cacctggactgtggaccacc agctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctcca-
ggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccctgggcacatggt acgacctgcagacgg-
tgccaatagaggccatggcagcctcccaccccaccctgcagaccccgtgagccagccatcca-
cagcgaggg gcagtgggtgacgctgccggccccectggacaccatcaacgtccac-
ctccgggctgggtacatcatccecctgcagggccctggcctca caaccacagagteccgcca-
gcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgac-

tgggacg atggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatctt-cctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtac gtgtgaccagtgagggagctgg-cctgcagagcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtectac-caacggtgtecctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtg-tetcgctgttgatgggagagcagifictegtcagctggt gttagtctagagcttgctagcggccgc **(SEQ ID NO:29)**

Construto 1756

[00155] O cassete GILTΔ2-7A34-40-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7A34-40-GAA70-952 (Plasmídeo p1756). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7A34-40 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7A34-40 contém uma eliminação de resíduos de aminoácidos 34-40 (Arg-Val-SerArg-Arg-Ser-Arg) da sequência de IGF-II humano.

[00156] ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAA-TGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC TCACCTTCTTGGCCTTCG-CCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTT-CAGCAGGCCCGCAAG CGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTC CGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTA CTGTGCTAC-CCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgteccagagcag-tgcccacaca gtgegacgtecccceccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccat-cacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctaca tecctgcaaagcaggggctgca-gggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagetacaagctgga-gaac ctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttctt-ccccaaggacatcctgaccctgeggctggacg tgatgatggagactgagaaccgcctccac-ttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtcc

acagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcgggg-
tgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtg ctgctgaacacgacggtggcgccectgtte-
tttgcggaccagttecttcagetgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgcc
gagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagetggaccaggatcaccctgtggaaccggga-
ccttgcgcccacgcccggtgcgaacct ctacgggtctcacccttctacctggcgctggagga-
cggcgggteggcacacggggtgttectgctaaacagcaatgccatggatgtggtc ctgcag-
ccgagccctgccdtagctggaggtegacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctggg-
cccagagcccaagagegtggtg cagcagtacctggacgttgtgggatacccgttcatgccg-
ccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactectccaccg ctatcacccg-
ccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcceectggacgtccaatggaacgacctg-
gactacatggacteccgga gggacttcacgttcaacaaggatggettccgggacttcccgg-
ccatggtgcaggagctgcaccagggeggccggcgctacatgatgatc gtggatectgccat-
cagcagcteggcccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggg-
ttttcatcaccaacga gaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgectt-
ccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggagg acatggtggctgagttccatga-
ccaggtgccettcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggac-
tgaggac ggctgccccaacaatgagctggagaacccaccetacgtgcctggggtgg-
ttgggggaccetccaggeggcaaccatctgtgcctccag ccaccagtttctaccacacacta-
caacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaagg-
ctcgg gggacacgcccatttgtgatcteccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccgg-
ccactggacgggggacgtgtggagctectgg gagcagctcgcctcctccgtgccagaaa-
tcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggettcctgggca
acacctcagaggagagtgtgtgcgctggacccagagggggccttctacccctcatgcggaac-
cacaacagcctgctcagtctgcccca ggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcagg-
ccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgc tgttccac-
caggcccacgtegegggggagaccgtggcccggccectcttcctggagttecccaaggactc-
tagcacctggactgtggacc accagctcctgtgggggaggccctgctcatcaccccagtg-
ctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccettgggcacatggtacgacctgca-
gacggtgccaatagaggccatggcagcctcccacceccacctgcagctccccgtgagccag-
ccatccacagc gag gggcagtgggtgacgctgccggccccctggacaccatcaacg-

tccacctccgggctgggtacatcatccecctgcagggccctggcct cacaaccacagagtec-
cgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggag-
ctgttctgggac gatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggt-
catcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggt acgtgtgaccagtgagggag-
ctggcctgcagagcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtectac-
caacg gtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtg-
tctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctg gtgttagtctagagcttgctagcggccgc
(SEQ ID NO:30)

Construto 1763

[00157] O cassete GILTΔ2-7M1/L27A37-GAA70-952 foi clonado usando os sítios Asp718 e NotI do cassete e vetor pCEP4 para produzir pCEP-GILTΔ2-7M1-L27A37-GAA70-952 (Plasmídeo p1763). Sítios de restrição para a clonagem estão em minúsculo. A sequência de aminoácidos espaçadora Gly, Ala, Pro (sequência sublinhada) separam o gene GAA e o marcador GILTΔ2-7M1/L27A37 (sequência em maiúsculo). O espaçador e o marcador são colocados a jusante do resíduo de GAA Ala70. O cassete GILTΔ2-7M1/L27A37 contém substituições Y27L e R37A na sequência de IGF-II humano. A sequência de DNA do cassete GILT difere da sequência de DNA humano em cada 6º códon.

[00158] ggtaccaagcttgccATGGGAATCCCAATGGGCAAG-
TCGATGCTGGTGCTGCTCACCTTCTT GGCCTTTGCCTCGTGCTG-
CATTGCCGCTCTGTGCGGCGGGGAACTGGTGGACACCCT CCAA-
TTCGTCTGTGGGGACCGGGGCTTCCTGTTCAGCAGACCCG-
CAAGCCGTGTGAG TGCTCGCAGCCGTGGCATTGTTGAGGAGTG-
CTGTTTTCGCAGCTGTGACCTGGCTCT CCTGGAGACGTACTGC
GCTACCC CC GCCAAGTC TGAGGGC GCGC CGgcacaccccggccgtc
ccagagcagtgcccacacagtgcgacgtcccccccaacagccgcttcgattgcgcccctga-
caaggccatcacccaggaacagtgcga ggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagca-
ggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctacc ccagc-

tacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccac-
ccccaccttcttccccaaggacat cctgaccctgeggctggacgtgatgatggagac-
tgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcc cttg-
gagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtecccactctacagegtggagttctctgagga-
gccatcggggtgatcgtgcaccg gcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtgg-
cgccectgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcg cagtatatcaca-
ggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtg-
gaaccgggaccttgcg cccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcaccattctacctggcg-
ctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttectgetaaac agcaatgccatggatgtgg-
tcctgcagccgagccctgccettagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtetaca-
tcttcctgggccc agagcccaagagegtggtgcagcagtacctggacgttgtgggatacccgtt-
catgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccg ctggggctactectccaccgctat-
cacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatgga-
acgacct ggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggettccgggac-
ttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcg gccggcgctacatgatgatcgtgga-
tcctgccatcagcagcteggcccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcg-
gagg ggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccggg-
tccactgccttccccgacttcaccaaccccaca gccctggcctggtgggaggacatggtgg-
ctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaact
tcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtg-
cctggggtggttgggggaccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagttt-
ctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccaca-
gggcgctggtgaaggctegggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctgg-
ccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagetectgggagcagctcg-
cctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtegggccga-
cgtctuggettcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggg-
ccttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgetcagtctgccccaggagccgtacag-
cttcagegagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactectec-
cccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccecte-
ttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctectgtgggggga-

ggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctactt-
cccatgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccac-
ccccacctgcagaccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctg-
ccggccecccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatca tcccectgcaggg-
ccctggcctcacaaccacagagteccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgac-
caagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctg-
gagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaa-
tgagaggtacgtgtgaccagtgagggagaggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctggg-
cgtggccacggcgccccagcaggtectctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctaca-
gccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtetcgctgttgatg ggagagcagtttctcgtcag-
ctggtgttagtctagagcttgctagcggccgc **(SEQ ID NO:31)**

Exemplo 3: Expressão e Purificação de enzimas GAA marcadas por GILT

Cultura Tecidual

[00159] Plasmídeos GAA marcados por GILT foram transfectado em células de suspensão FreeStyle 293-F como descrito pelo fabricante (Invitrogen). brevemente, as células cresceram em meio OptiMEM I (Invitrogen) em frascos agitadores de policarbonato em um agitador orbital a 37℃ e 8% de CO2. As células foram ajusta das a uma concentração de $lx10^6$ células/ml, e então transfectadas com uma taxa de 1:1:1 de células em ml: jarro de DNA:gl 293 fectina. Alíquotas da cultura foram coletadas 5-7 dias após a transfecção e centrifugadas a 5,000 x g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados congelados a -80℃.

Purificação e Concentração de Proteínas

[00160] O material de partida foi o sobrenadante de cultura celular de mamíferos, como descrito acima, congelado no armazenamento a -80℃. Ácido cítrico foi adicionado para atingir pH 6.0, e então sulfato de amônia foi adicionado para atingir uma concentração final de 1 M. O material foi passado através de um filtro de 0.2 uM de Supor-Mach

(Nalgene).

[00161] O material filtrado foi carregado em uma coluna de fluxo Phenyl-Sepharose® 6 Low-Sub Fast-Flow (GE Healthcare) preparada com tampão de carregamento HIC (citrato a 50 mM pH 6,0, 1 M Am-SO4). A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de Tampão de Lavagem HIC (50 mM de citrato pH 6,0, 0,8 M $AmSO_4$), e eluída com 5 volumes de coluna de Tampão de Elução HIC (50 mM de citrato pH 6,0). Amostras dos picos de elução foram colocadas em pool e o tampão foi trocado em salina de tampão fosfato (145,15 mM de NaCl, 2,33 mM de KCl, 10 mM de Na2HPO4, 2 mM de KH2PO4, pH 6,2) usando concentradores de rotação centricon (Amicon) e colunas de dessalinização Bio-Spin-6 (Bio-Rad).

Atividade da Enzima

[00162] A expressão de GAA foi determinada por um ensaio enzimático de para-nitrofenol (PNP).

[00163] A enzima GAA foi incubada em mistura de reação de 50 uL contendo 100 mM de acetato de sódio pH 4,2 e 10 mM de para-nitrofenol (PNP) a-glucosídeo substrato (Sigma N1377). As reações foram incubadas a 37℃ por 20 minutos e interrompid as com 300 ttl de 100 mM de carbonato de sódio. A absorbância a 405 nm foi medida em placas de microtitulação de 96 poços e comparada a curvas padrões derivadas do p-nitrofenol (Sigma N7660). Uma unidade de GAA PNP é definida com 1 nmole de PNP hidrolisado/hora.

Exemplo 4: Ensaios Competitivos de Ligação ao Receptor

[00164] A afinidade das proteínas marcadas com GILT pelo receptor IGF2 (IGF2R), receptor IGF1 (IGF 1 R) e o receptor de insulina (IR) foi examinada em experimentos de ligação competitiva realizados em formato de placa com 96 poços. Os receptores foram revestidos a temperatura ambiente por uma noite em placas brancas de ligação Reacti (Pierce, catNo. 437111) em Tampão de Revestimento (0,05 M

tampão carbonato, pH 9,6) a uma concentração de 0,5 ug/poço (IGF2R) ou 1 µg/poço (IGF1R, IR). As placas foram lavadas com tampão de lavagem (Solução Salina Tamponada com Fosfato mais 0,05% Tween-20), e então bloqueadas em Tampão SuperBloqueador (Pierce, catNo.37516) por 1 hora. Após outra lavagem da placa, ligantes biotinilados (Cell Sciences) foram adicionados aos poços; os poços de IGF2R receberam 8 nM de biotina IGF-2, os poços de IGF1 receberam 30 nM de biotina IGF-1, e poços de IR receberam 20 nM de biotina insulina. Juntamente com os ligantes biotinilados, os poços também continham diluições seriais de amostras de proteínas GAA marcadas com GILT ou ligantes controles não biotinilados para agirem como inibidores de ligação para os ligantes biotinilados. Após uma incubação de duas horas com agitação, as placas foram lavadas e ligantes biotinilados ligados foram detectados com uma incubação de estreptavidina-HRP (R&D, catNo.890803, diluição 1:200 em tampão bloqueador, 30 minutos), seguido por incubação por Substrato Quimioluminescente Super Elisa Pico (Pierce, catNo.37070, 5 minutos). O sinal quimioluminescente foi medido em 425.

[00165] A porcentagem de ligante biotinilado foi calculada para cada concentração de competidor no ensaio de competição de ligação de IGF2R e os valores IC50 foram determinados (figura 4). A proteína 1752 com uma eliminação de resíduos de IGF2 30-40 exibiu um valor de IC50 similar do ZC-701 marcado com GILT (figura 4), indicando que a eliminação destes resíduos na região da volta do IGF2 não parece afetar a ligação ao IGF2R. A proteína 1751 com eliminação dos resíduos 29-40 do IGF2 exibiu um valor de IC50 mais alto (figura 4), indicando que não compete muito bem para ligação ao IGF2R.

[00166] Em uma placa de ensaio de IGF2R separada, a comparação do ZC-701 e a proteína 1763 rendeu valores de IC50 diferentes em 35% (Ver figura 5).

[00167] Em um ensaio medindo a competição da ligação da insulina biotinilada à insulina ligada à placa, as proteínas 1751 e 1752 não foram tão eficientes como inibidores comparadas com 701 ou IGF-II (Ver figura 6). Isto indica que as proteínas 1751 e 1752, com eliminações na região da volta correspondente aos aminoácidos 30-40 do marcador GILT, tiveram afinidade reduzida para o receptor de insulina comparado ao marcador GILT intacta em 701 ou IGF-II.

[00168] Em um ensaio medindo a competição da ligação do IGF-I biotinilado ao IGF1R ligado à placa, a proteína 1763 não foi tão eficiente como inibidor comparada com 701, IGF-II ou IGF-I (ver figura 7). Isso indica que a proteína 1763, com mutações A2-7, Y27L e R37A no marcador GILT, teve afinidade reduzida para o receptor IGF-I comparado ao ZC-701 ou IGF-II.

Exemplo 4. Ensaio de ligação de receptor de insulina adicional

[00169] A proteína ZC-1487 foi testada para sua afinidade de ligação pelo receptor de insulina. A proteína ZC-1487 contém o cassete GILTD2-7M1/A37, que contém substituição de Arg para Ala no aminoácido 37 da sequência do IGF2 humano e é resistente à proteólise por furina. Duas bateladas diferentes desta proteína purificada de células CHO, ZC-1487-B26 e ZC-1487-B28 foram analisadas em um ensaio medindo a competição da ligação da insulina biotinilada à insulina ligada à placa.

[00170] Um ensaio de ligação ao receptor de insulina foi conduzido para a insulina competidora, IGF-II, ZC710B20 e ZC1487B26 ou ZC-1487-B28 com ligação de insulina biotinilada ao receptor de insulina (Insulina-R).

[00171] Especificamente, placas brancas Reacti-Bind® foram revestidas com Insulina-R a uma concentração de 1 ug/poço/100ul (38,4 nM). As placas revestidas foram incubadas por uma noite à temperatura ambiente, e então lavadas 3X com tampão de lavagem (300 ul/poço). As

placas foram então bloqueadas com tampão de bloqueio (300 ul/poço) por 1 hora. As etapas de lavagem foram repetidas e qualquer traço da solução nas placas foi retirado.

[00172] A insulina biotinilada foi misturada a 20 nM com diferentes concentrações de insulina, IGF-II, ZC701B20, B26 e B28 por diluições seriais (concentrações finais são mostradas na Tabela 2). 100 ul de insulina diluída, IGF-II, ZC710B20, ZC1487B26, e ZC1487B28 em insulina-biotina 20 nM foram adicionados nas placas revestidas e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas. As placas foram então lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. 100 uL de solução de trabalho estrapavidina-HRP (50 ul de estrepavidina-HRP em 10 mL de tampão de bloqueio) foram adicionados nas placas e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. 100 ul de solução de trabalho Elisa-Pico contendo substrato quimioluminescente Elisa-Pico foram adicionados e a quimioluminescência foi medida a 425 nM. Resultados de exemplo são mostrados na Tabela 2, figura 8, e figura 9. Ambos as bateladas de ZC-1487 não foram tão eficientes como inibidores comparados ao ZC-701 ou ao controle de insulina. Como pode ser visto na Tabela 2 e na figura 8, o peptídeo resistente à furina ZC1847B26 se liga ao receptor de insulina mais de 10 vezes menos avidamente do que o ZC-701 e mais de 20 vezes menos do que a IGF-II tipo selvagem. Como pode ser visto na Tabela 2 e na figura 8, o peptídeo resistente à furina ZC1847B26 se liga ao receptor de insulina mais de 10 vezes menos avidamente do que o ZC-701 e mais de 20 vezes menos do que a IGF-II tipo selvagem.

[00173] Isto indica que a proteína 1487 possui afinidade reduzida pelo receptor

[00174] de insulina comparado ao marcador GILT no ZC-701.

[00175] Tabela 2. Atividade de ligação ao receptor de Insulina – Intensidade da Quimioluminescência

Insulin (nM)												
Insulin-B (nM)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**	**7,8125**	**3,90625**	**1,95313**	**0**
20nM	38,00	43,00	66,00	102,00	243,00	479,00	750,00	780,00	503	1175	1046	2180
20nM	13,00	25,00	57,00	141,00	229,00	517,00	517,00	885,00	1003	1344	1462	1694
ave	**25,5**	**34,0**	**61,5**	**121,5**	**236,0**	**498,0**	**633,5**	**832,5**	**753,0**	**1259,5**	**1254,0**	**1937,0**
IFG-II (nM)												
Insulin-B (nM)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**	**7,8125**	**3,90625**	**1,95313**	**0**
20nM	70,00	268,00	356,00	644,00	828,00	991,00	1189,00	1492,00	1478	1478	1410	1874
20nM	140,00	176,00	379,00	566,00	919,00	1224,00	1447,00	1377,00	1483	1370	1249	1959
ave	**105,0**	**222,0**	**367,5**	**605,0**	**873,5**	**1107,5**	**1318,0**	**1434,5**	**1480,5**	**1424,0**	**1329,5**	**1916,5**
ZC701B20 (nM)												
Insulin-B (nM)	**4000**	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**	**7,8125**	**3,90625**	**0**
20nM	191,00	387,00	526,00	715,00	800,00	1284,00	1116,00	1248,00	1474	1241	1450	1790
20nM	250,00	329,00	483,00	774,00	767,00	1071,00	1024,00	968,00	1471	1118	1234	1886
ave	**220,5**	**358,0**	**504,5**	**744,5**	**783,5**	**1177,5**	**1070,0**	**1108,0**	**1472,5**	**1179,5**	**1342,0**	**1838,0**
ZC1487B26 (nM)												
Insulin-B (nM)	**4000**	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**	**7,8125**	**3,90625**	**0**
20nM	967,00	1190,00	1334,00	1210,00	1294,00	1462,00	1402,00	1281,00	1323	1612	1173	1952
20nM	962,00	1189,00	1395,00	1379,00	1612,00	1396,00	1221,00	1013,00	1326	1182	1102	2069
ave	**964,5**	**1189,5**	**1364,5**	**1294,5**	**1453,0**	**1429,0**	**1311,5**	**1147,0**	**1324,5**	**1397,0**	**1137,5**	**2010,5**
	2000 (4000)	1000 (2000)	500 (1000)	250 (500)	125 (250)	62,5 (125)	31,25 (62,5)	5,625 (31,25)	7,8125 (15,625)	3,90625 (7,8125)	1,95313 (3,90625)	0

Exemplo 5. Ensaios de Absorção

[00176] Alguns mutantes foram testados para retenção de atividade de

[00177] absorção. As células HEK293 foram transfectadas com construtos 1479 (R37K), 1487 (R37A) ou ZC-701. Após a coleta, os sobrenadantes da cultura foram parcialmente purificados por cromatografia HIC. Todas as amostras foram tratadas com PNGase antes da eletroforese.

[00178] A figura 10 mostra preparações parcialmente purificadas de proteínas de fusão direcionadas contendo um marcador de muteína IGF-II resistente à furina analisado por SDS-PAGE e imunocoagulação. Como pode ser visto, a proteína de fusão codificada pela construção 1487 contendo mutação R37A é resistente à furina exógena.

[00179] A figura 11 ilustra resultados de absorção da GAA marcada com GILT resistente à furina GAA em mioblastos L6 de rato. Como mostrado na figura 11, Kconsumos exemplares para proteínas 1479, 1487, ZC-701 e ZC-701 purificado são 4,5 nM, 4,4 nM, 5,0 nM e 2,6 nM, respectivamente, que indica que as proteínas decodificadas por construções 1487 (R37A) e 1479 (R37K) mantem a habilidade para consumo eficiente em mioblastos de L6 de rato. O consumo eficiente das proteínas de fusão contendo um marcador GILT resistente à furina também indica que o marcador resistente à furina mantém alta afinidade para o CI-MPR.

EQUIVALENTES

[00180] Os versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de usar não mais do que experimentos de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção aqui descrita. O escopo da presente invenção não pretende ser limitado à descrição acima, mas sim ser definido nas reivindicações em anexo. Os artigos "um", "uma" e "o", como aqui usados na especificação e nas reivindicações, a não

ser quando claramente indicado o contrário, devem ser entendidos como incluindo seus referentes no plural. Reivindicações ou descrições que incluem "ou" entre um ou mais membros de um grupo são consideradas satisfatórias se um, mais de um, ou todos os membros do grupo estiverem presentes, empregados, ou então relevantes a um dado produto ou processo a não ser quando indicado o contrário ou evidente no contexto. A invenção inclui modalidades nas quais exatamente um membro do grupo está presente, empregado, ou então relevante a um dado produto ou processo. A invenção também inclui modalidades nas quais mais de um, ou todos os membros do grupo estão presentes, empregados, ou então relevantes a um dado produto ou processo. Além disso, deve-se entender que a invenção engloba variações, combinações, e permutações nas quais uma ou mais limitações, elementos, cláusulas, termos descritivos, etc., de uma ou mais reivindicações são introduzidos em outra reivindicação dependente da mesma reivindicação de base (ou, como relevante, de qualquer outra reivindicação), a não ser quando indicado o contrário ou a não ser que seja evidente para alguém habilitado na tecnologia que uma contradição ou inconsistência surja. Onde elementos estão presentes em listas, por exemplo, no grupo Markush ou formato similar, deve-se entender que cada subgrupo dos elementos também é revelado, e quaisquer elementos podem ser removidos do grupo.

[00181] Deve-se entender que, em geral, onde a invenção, ou aspectos da invenção, é/são referidos como elementos particulares, características, etc., certas modalidades da invenção ou aspectos da invenção consistem, ou consistem essencialmente em, tais elementos, características, etc. Para fins de simplicidades, estas modalidades não são em todos os casos especificamente definidas aqui. Também deve-se entender que qualquer modalidade da invenção, por exemplo, qualquer modalidade encontrada na tecnologia anterior, pode ser explici-

tamente excluída das reivindicações, sem importar se a exclusão específica está citada na especificação.

[00182] Também deve-se entender que, a não ser quando claramente indicado o contrário, em quaisquer métodos aqui reivindicados que incluam mais de um ato, a ordem dos atos do método não é necessariamente limitada à ordem na qual os atos do método são citados, mas a invenção inclui modalidades nas quais a ordem é limitada. Além disso, onde as reivindicações citam uma composição, a invenção engloba métodos de usar a composição e métodos de fazer a composição. Onde as reivindicações citam uma composição, deve-se entender que a invenção engloba métodos de usar a composição e métodos de fazer a composição.

INCORPORAÇÃO DE REFERÊNCIAS

[00183] Todas as publicações e documentos de patente citados neste pedido são incorporados por referência em sua totalidade na mesma extensão dos conteúdos de cada publicação individual ou documento de patente aqui incorporados.

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica uma proteína de fusão que compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica à alfa-glucosidase ácida humana (GAA) do tipo selvagem; uma porção de direcionamento lisossomal, em que a porção de direcionamento lisossomal é uma a muteína IGF-II que compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 70% idêntica à IGF-II humana madura (SEQ ID NO:1), com uma mutação dentro de uma região correspondente aos aminoácidos 30-40 da SEQ ID NO:1 de forma que a dita mutação elimine pelo menos um sítio de clivagem de furina protease, em que a muteína IGF-II

(a) é resistente à clivagem de furina;

(b) tem reduzida afinidade de ligação pelo receptor de insulina em relação à afinidade de IGF-II humana ocorrendo naturalmente para o receptor de insulina; e

(c) liga-se ao receptor manose-6-fosfato humano independente de cátion de uma maneira independente da manose-6-fosfato.

2. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a muteína IGF-II compreende uma deleção dos aminoácidos 30-40 da SEQ ID NO:1.

3. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a mutação é uma substituição de aminoácidos em uma posição correspondendo a Arg37 da SEQ ID NO:1.

4. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a substituição de aminoácidos é uma substituição de Lys ou Ala.

5. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a muteína IGF-II tem reduzida afinidade de ligação pelo receptor de IGF-I em relação à afinidade de IGF-II humana ocorrendo naturalmente para o receptor de IGF-I.

6. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão compreende os aminoácidos 70-952 da GAA humana.

7. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão compreende ainda um espaçador entre os aminoácidos 70-952 da GAA humana e a muteína IGF-II.

8. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o espaçador compreende uma sequência de aminoácidos Gly-Ala-Pro.

9. Célula, caracterizada pelo fato de que contém o ácido nucleico como definido na reivindicação 1.

10. Célula, caracterizada pelo fato de que contém o ácido nucleico como definido na reivindicação 6.

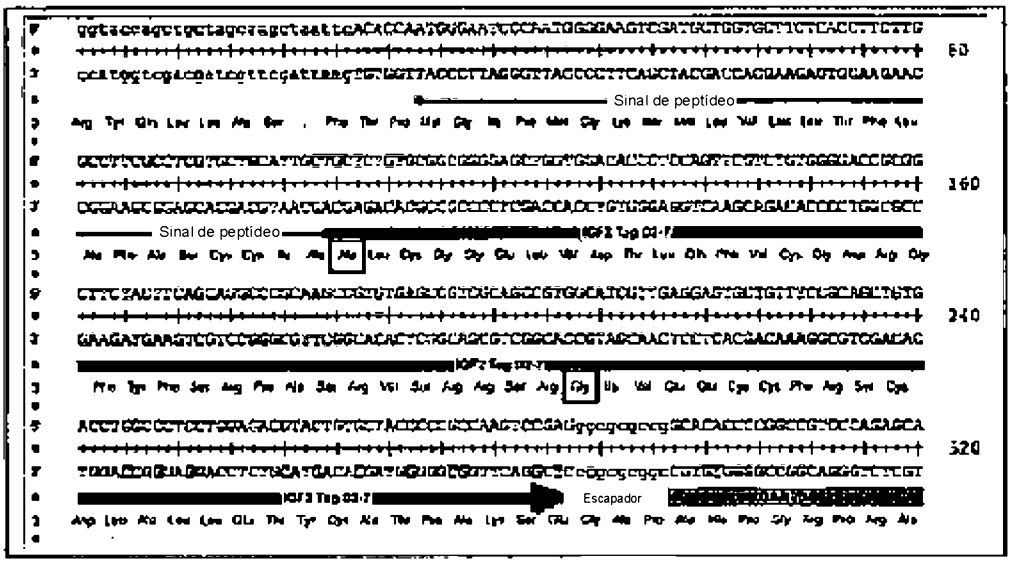


Fig. 1. Mapa do término N do ZC-701. Dois resíduos de aminoácidos em vermelho são locais de eventos de divisão. O primeiro é o local da divisão do peptídeo de sinal, o segundo é o local da divisão da furina.

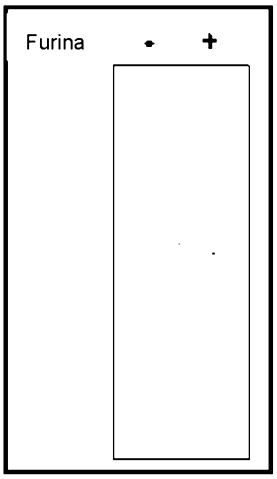


Fig. 2. SDS-PAGE do ZC-701 após tratamento com PNGase F. A faixa da direita foi adicionalmente tratada com furina.

Sequência de reconhecimento de furina = R X X R

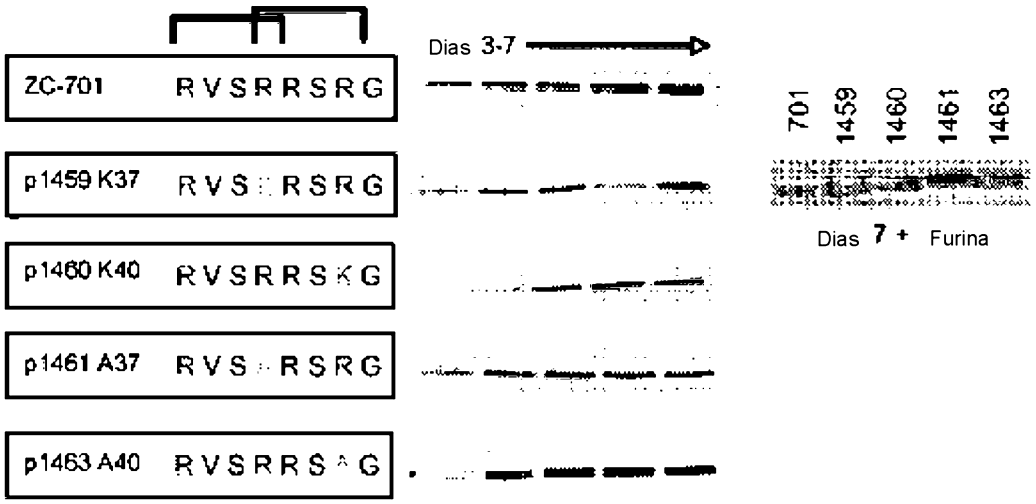
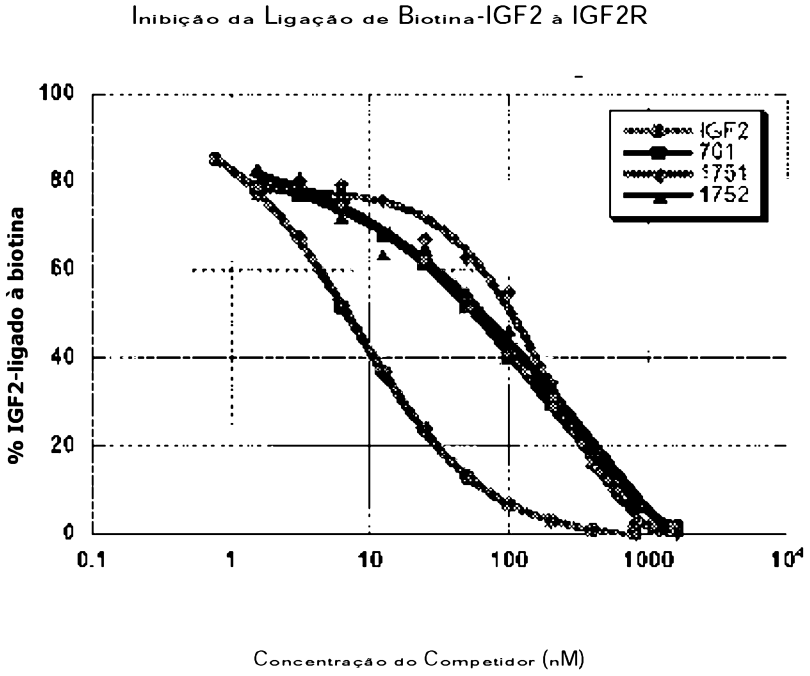
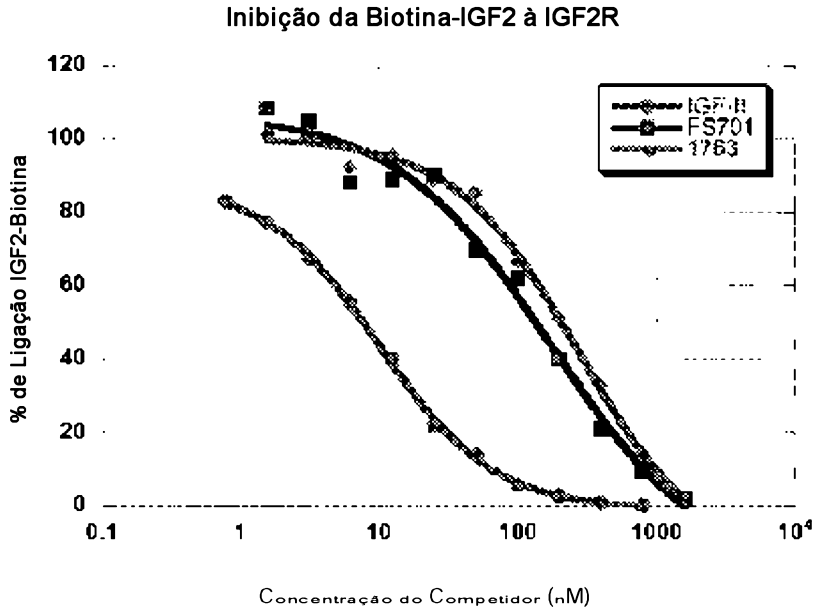


Fig. 3. Esquerda. Esquema de mutantes ZC-701 nos quais o local da divisão da furina é modificado. Centro. Análise SDS-PAGE de mutantes tratados com PNGase após 3-7 dias de cultura celular. Direita. Análise SDS-Page de mutantes tratados com PNGase tratada com furina.



Competidor	IGF2	ZC-701	1751
ICso	6.9	57.7	106.0

FIG. 4



Competidor	IGF2	ZC-701	1763	1752
IC50	7.7	135.4	207.9	65.3

FIG. 5

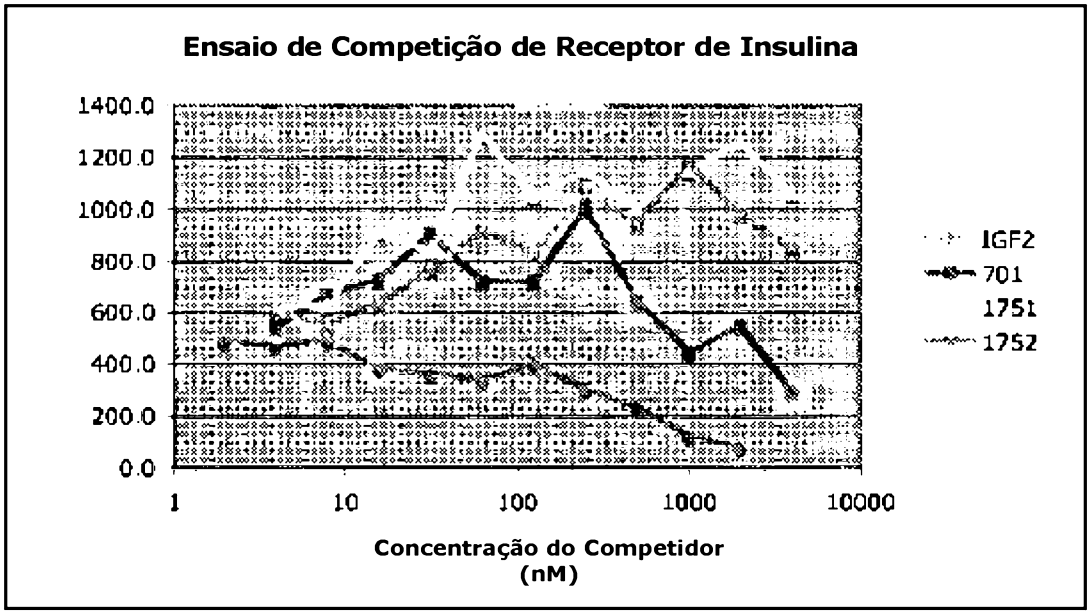

Ensaio de Competição de Receptor de Insulina
1400.0
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
1
10
100
1000
10000
Concentração do Competidor (nM)
IGF2
701
1751
1752

FIG. 6

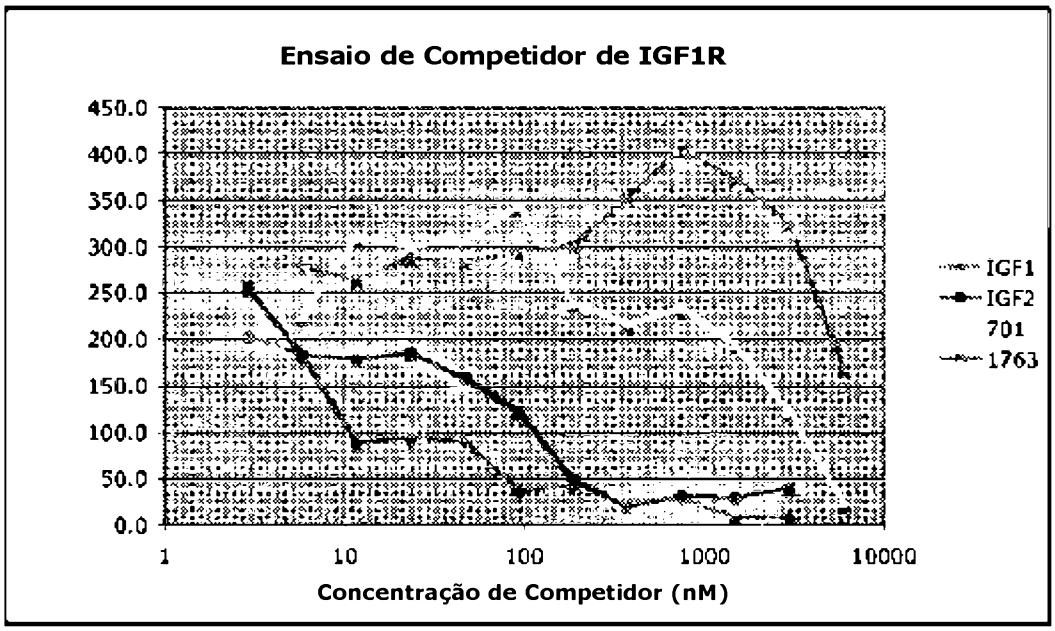

Ensaio de Competidor de IGF1R
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
1
10
100
1000
10000
Concentração de Competidor (nM)
IGF1
IGF2
701
1763

FIG. 7

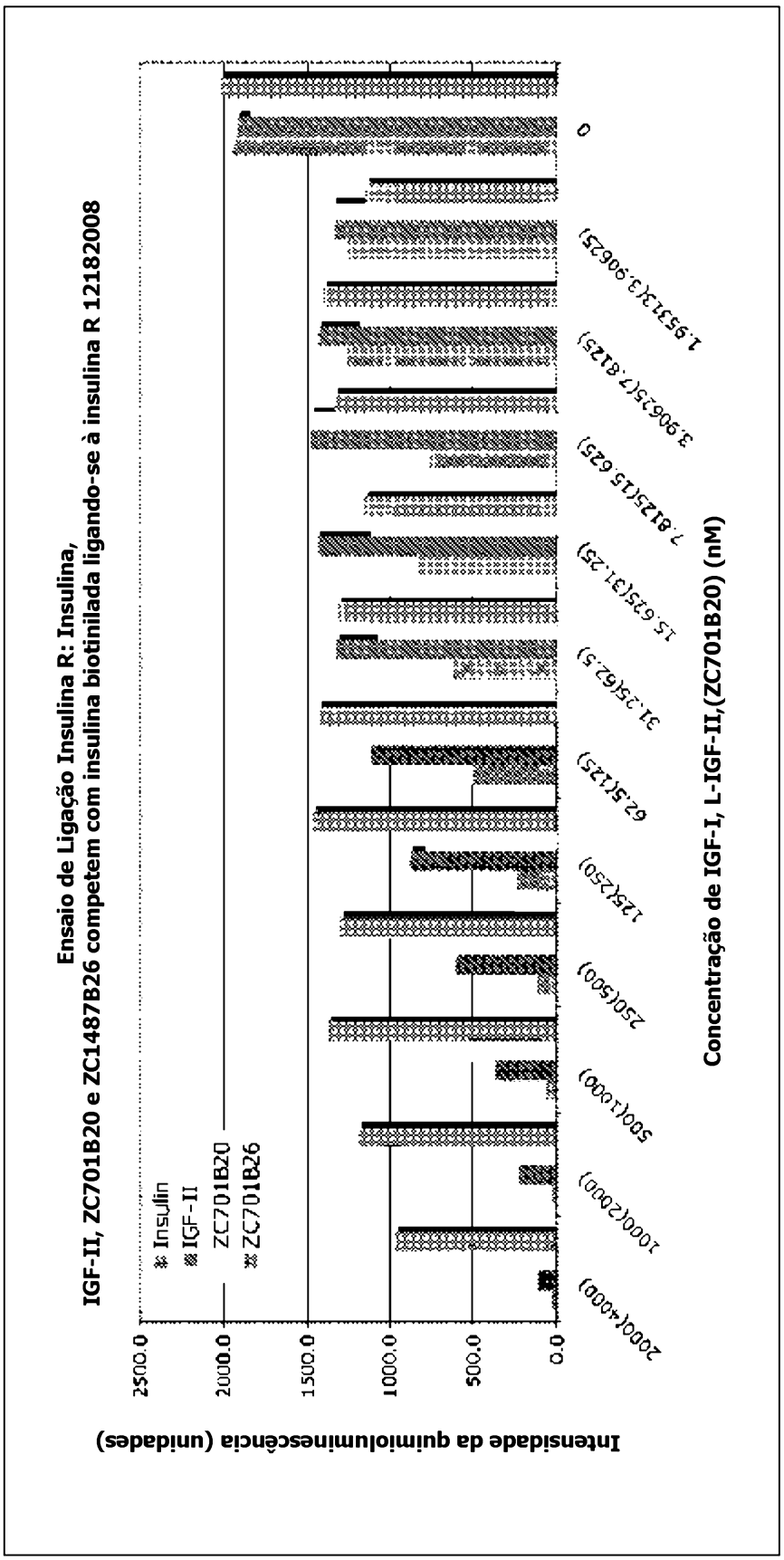
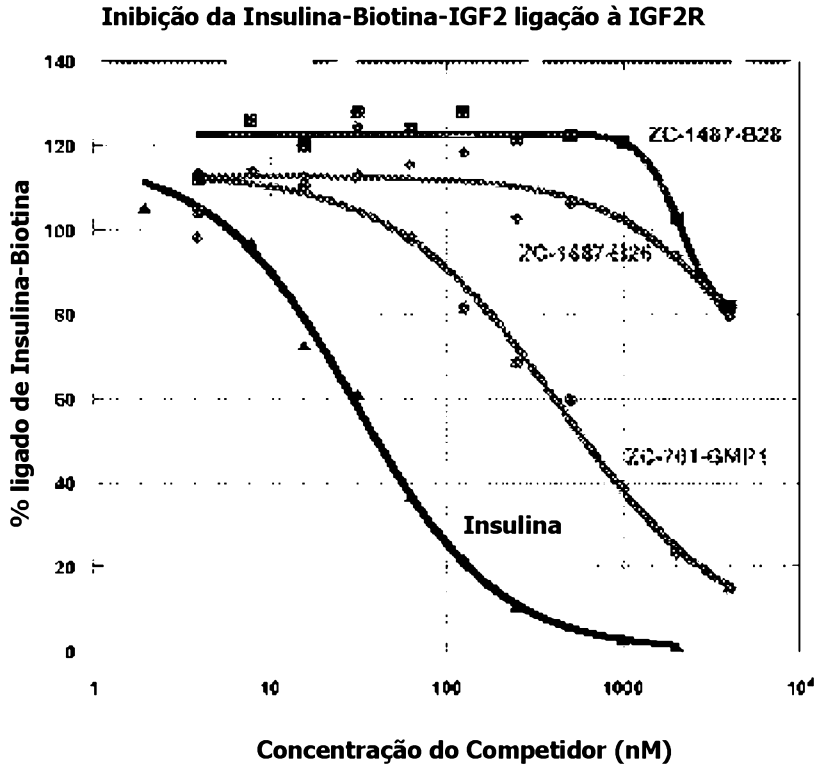

Ensaio de Ligação Insulina R: Insulina,
IGF-II, ZC701B20 e ZC1487B26 competem com insulina biotinilada ligando-se à insulina R 12182008
Insulin
IGF-II
ZC701B20
ZC701B26
Intensidade da quimioluminescência (unidades)
2500.0
2000.0
1500.0
1000.0
500.0
0.0
Concentração de IGF-I, L-IGF-II,(ZC701B20) (nM)
0
1.95313(3.90625)
3.90635(7.8125)
7.8125(15.625)
15.625(31.25)
31.25(62.5)
62.5(125)
125(250)
250(500)
500(1000)
1000(2000)
2000(4000)

FIG. 8



	Insulina	ZC-1487-B26	ZC-1487-B28	ZC-701-GMP1
ICSO	40.5	N/A	N/A	607

FIG. 9

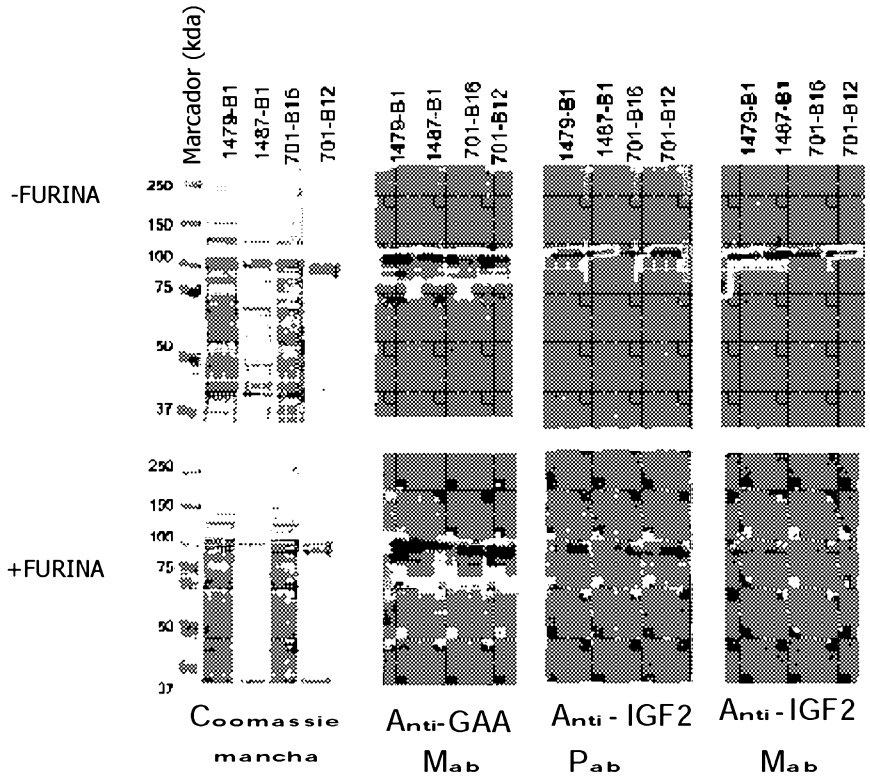
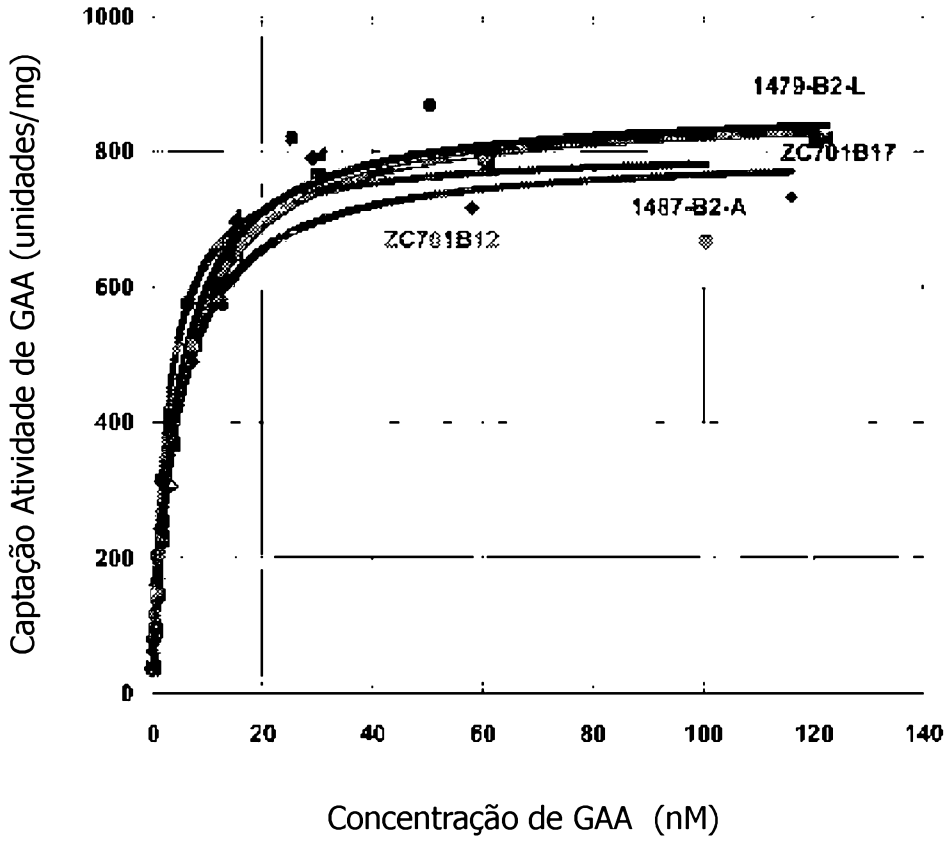

-FURINA
+FURINA
Marcador (kda)
1479-B1
1487-B1
701-B16
701-B12
250
150
100
75
50
37
Coomassie
mancha
Anti-GAA
Mab
Anti - IGF2
Pab
Anti - IGF2
Mab

FIG. 10

FIG. 11


1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
120
140
1479-B2-L
ZC701B17
1487-B2-A
ZC701B12
Captação Atividade de GAA (unidades/mg)
Concentração de GAA (nM)

RESUMO

Patente de Invenção: **"ÁCIDO NUCLEICO E CÉLULAS".**

A presente invenção refere-se a composições ainda melhores e a métodos para direcionamento lisossomal eficiente baseado na tecnolgia GILT. Entre outras coisas, a presente invenção refere-se a métodos e a composições para direcionar enzimas lisossomais usando peptídeos de direcionamento lisossomais resistentes à furina. A presente invenção também serefere a métodos e a composições para direcionar enzimas lisossomais a lisossomos usando um peptídeo de direcionamento lisossomal que reduziu ou diminuiu a afinidade de ligação pelo receptor de insulina.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 35451263_1.txt
- Data de Geração do Código: 25/07/2017
- Hora de Geração do Código: 14:00:50
- Código de Controle:
  - Campo 1: 4351A1D4EEABF208
  - Campo 2: D7DC9794C70132E1