

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 99.995**

**REQUERENTE:** **CHIRON CORPORATION**, norte americana (Estado de Delaware), industrial e comercial, com sede em 4560 Horton Street, Emeryville, California 94608-2916, Estados Unidos da América

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA NOVA PROTEINA DE LIGAÇÃO AO FACTOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE A INSULINA (IGFBP-6)"

**INVENTORES:** Michael C. Keifer, cientista norte americano, residente em 401 Wright Court, Clayton, California 94517, Estados Unidos da América

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

8 de Janeiro de 1991, nos Estados Unidos da América, sob o N.º. 07/638.628.

Modalidade e n.º (11)		T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)	
Requerente (71): CHIRON CORPORATION, norte americana (Estado de Delaware), industrial e comercial, com sede em 4560 Horton Street, Emeryville, California 94608-2916, Estados Unidos da América					
Inventores (72): Michael C. Kiefer, cientista norte americano, residente em 401 Wright Court, Clayton, California 94517, Estados Unidos da América					
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)		
Data do pedido	Pais de Origem	N.º de pedido			
8. Jan. 1991	E.U.A.	07/638.628			
Epígrafe: (54) "PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO FACTOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE A INSULINA (IGFBP-6)"					
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) Este invento refere-se ao processo de preparação de uma nova proteína de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina purificada (IGFBP), seleccionada do grupo consistindo na proteína de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina tendo uma sequência de aminoácido que, preferivelmente, é, pelo menos, 70% homóloga à sequência de aminoácido, e fragmentos das mesmas que são capazes de se ligar a um anticorpo específico para a proteína ou para um factor de crescimento semelhante à insulina. Esta nova IGFBP é designada aqui como IGFBP-6. As moléculas de DNA recombinantes codificando as proteínas de ligação e subsequências das mesmas são também descritas conjuntamente com microorganismos recombinantes e linhas celulares contendo as moléculas de DNA e métodos para produzir as proteínas de ligação usando hospedeiros recombinantes contendo moléculas de DNA relevantes. Anticorpos para as proteínas, úteis em várias aplicações de diagnóstico, são também descritos.					

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

Titular: CHIRON CORPORATION

Epigrafe: "METODO DE PREPARAÇÃO DE UMA NOVA PROTEINA DE LIGAÇÃO  
AO FACTOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE A  
INSULINA (IGFBP-6)"

M E M O R I A            D E S C R I T I V A

Campo do invento

O presente invento relaciona-se, de um modo geral, com a produção de polipeptidos a partir de moléculas de DNA recombinante que codificam tais polipeptidos. Mais especificamente, este invento relaciona-se com uma nova proteína de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina (designada aqui como IGFBP-6), a moléculas de DNA recombinante codificando este polipeptido, e a métodos para a produção de IGFBP-6 a partir de células hospedeiras recombinantes.

Descrição da técnica relacionada

Factores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são hormonas polipeptídicas de baixo peso molecular com homologia estrutural para a pro-insulina. São conhecidos dois IGFs diferentes, denominados IGF-I e IGF-II, que são mitogénicos in vitro para uma grande variedade de células em cultura de tecidos. Ambos os IGFs estimulam, in vitro, o crescimento de vários



tecidos, e em particular, induzem a síntese de colagénio. O IGF-I medeia o efeito promotor do crescimento da hormona de crescimento na condrogenese e na formação do osso, e é por isso essencial para o crescimento normal do individuo. Isto é demonstrado pelo facto de os pigmeus e os cães d'água pequenos serem deficientes em IGF-I mas terem um nível normal de hormona do crescimento no seu soro. Pensa-se que o IGF-II desempenha um papel chave no desenvolvimento fetal e no desenvolvimento dos nervos.

Complementarmente ao seu efeito primário no tecido esquelético, os IGFs também exibem funções de estimulação do crescimento noutros tecidos. Sabe-se que os fibroblastos das feridas produzem IGFs que são eficazes na estimulação do crescimento dos fibroblastos e síntese de colagénio, uma proteína estrutural normalmente requerida para a cicatrização de feridas. A vascularização do tecido ferido é também induzida. Além disso, também se descobriu que os IGFs têm uma actividade semelhante à eritropoietina, no que respeita à indução da hematopoiese.

Estudos recentes demonstraram também que os IGFs produzidos por certas células cancerosas, por exemplo, as células cancerosas do peito e do rim, auto-estimulam a proliferação das células cancerosas e dos tecidos vasculares e fibrosos necessários para suportar o crescimento dos tecidos cancerosos.

Além disto, ambos os IGF's mostram um espectro de actividades metabólicas semelhante ao da insulina, dado que estimulam, em particular, o transporte e metabolismo da glucose. Os efeitos biológicos dos IGFs e da insulina são mediados através da sua ligação a receptores específicos. Em particular, ambos os IGFs têm a capacidade de se ligar ao receptor da insulina com uma



afinidade aproximadamente 100 vezes mais baixa do que a insulina.

Ambos os IGFs têm um concentração no sangue aproximadamente cem vezes mais elevada do que a da insulina. A hipoglicémia é evitada por um mecanismo regulador que envolve proteínas transportadoras presentes no sangue e capazes de formar complexos com os IGFs. Assim, os IGFs circulam no sangue na forma de um complexo que não tem actividade semelhante à da insulina. Através da sua associação com proteínas transportadoras (referidas adiante como proteínas de ligação ao IGF ou IGFbps), é inibida a ligação dos IGF's aos receptores da superfície da célula. Também foi demonstrado que outra função das proteínas de ligação ao IGF é aumentar a curta vida média dos IGFs, os quais estão sujeitos a uma rápida degradação proteolítica quando presentes no sangue na sua forma livre.

De acordo com o que se disse, os IGFs podem ser úteis in vitro para estimular a) o crescimento de animais e humanos com deficiência na hormona do crescimento, b) a regeneração de tecidos, tal como eritropoiese e condrogénese, c) a cicatrização de feridas e d) as funções de vários órgãos, por exemplo, do fígado ou rim. Como resultado da sua actividade estimuladora da condrogénese, os IGFs são de uso particularmente apropriado para a formação do osso, por exemplo, no tratamento da osteoporose. Os IGFs para usar nos tratamentos acima referidos são administrados de forma vantajosa a um sujeito em associação com, pelo menos, uma proteína de ligação ao IGF. Através da sua associação com proteínas transportadoras (referidas adiante como proteínas de ligação ao IGF ou IGFbps), a ligação dos IGFs aos receptores da superfície da célula é inibida. Também foi demonstrado que outra

função das proteínas de ligação ao IGF é aumentar a curta vida média dos IGFs, os quais estão sujeitos a uma rápida degradação proteolítica quando presentes no sangue na sua forma livre.

A administração da combinação do IGF e da proteína de ligação ao IGF, em vez do IGF sózinho, tem efeitos benéficos incluindo a prevenção da hipoglicémia e possíveis efeitos mitogénicos nos locais de injeção, e o prolongamento da vida média do IGF. Além disso, descobriu-se que as proteínas de ligação também são úteis para potenciar o efeito semelhante à eritropoietina do IGF-I. As proteínas de ligação podem também ser úteis para orientar os IGF's para tecidos específicos.


Quando administradas sózinhas, isto é, sem qualquer IGF, as proteínas de ligação podem também ser úteis terapêuticamente para bloquear os efeitos adversos dos IGFs, tal como os que ocorrem quando os IGFs são produzidos em excesso, por exemplo, IGFs livres secretados por certas células cancerosas, por exemplo células cancerosas produzindo hormonas, tais como células cancerosas do peito ou rim. A terapia com proteínas de ligação ao IGF pode também prevenir a cegueira como um efeito secundário da proliferação da diabetes que afecta a retina. De facto foi demonstrado que os IGFs podem ser um dos factores estimuladores da proliferação endotelial e de fibroblastos na diabetes que afecta a retina.

Um outro uso terapêutico das IGFbps é o controlo do crescimento excessivo dos sujeitos deficientes em proteína de ligação ao IGF, dado que é bastante provável que elevados níveis de IGF, combinados com níveis anormalmente baixos de proteínas de ligação, são responsáveis pelo crescimento excessivo.



Formas conhecidas de IGFbps incluem a IGFBP-1, tendo um peso molecular em humanos de aproximadamente 30-40 kD. Ver, por exemplo, Pova, G. et al., Eur. J. Biochem (1984) 144:199-204, que refere a IGFBP-1, isolada e purificada a partir de fluido amniótico; Koistinen, R. et al., Endocrinology (1986) 118:1375-1378, que refere a IGFBP-1 isolada e purificada a partir de placenta humana; Powell, D.R. et al., J. Chromatogr. (1987) 420:163-170, que refere a IGFBP-1 de 30-40 kD, isolada e purificada a partir de meio condicionado de células de hepatoma G2 (Hep-G2); Lee, Y. L. et al., Mol. Endocrinol. (1988) 2:404-411, que refere uma sequência de aminoácidos da IGFBP-1 isolada a partir de células Hep-G2; Brikman, A. et al., The EMBO Journal (1988) 7:2417-2423, que refere uma biblioteca genómica de cDNA de IGFBP-1 da placenta; Brewer, M. T. et al., Bioch. Biophys. Res. Com. (1988) 152:1289-1297, que diz respeito a sequências de nucleótidos e aminoácidos para a IGFBP-1 clonada a partir de uma biblioteca uterina humana decidua; WO89/09792, publicada em 19 de Outubro de 1990, de Clemmons, D.R., et al., diz respeito a sequências de cDNA e a vectores de clonagem para a IGFBP-1 e IGFBP-2; WO89/08667, publicada a 21 de Setembro de 1989, de Drop, L. S., et al., diz respeito a uma sequência de aminoácidos da proteína de ligação-1 ao factor de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-1); WO89/09268, publicada em 5 de Outubro de 1989, de Baxter, R.C., diz respeito a a uma sequência de cDNA da IGFBP-1 e a métodos de expressão para a IGFBP-1.

A IGFBP-2 tem um peso molecular de, aproximadamente, 33-36 kd. Ver, por exemplo, Binkert, C. et al., The EMBO Journal (1989) 8:2497-2502, que diz respeito a uma sequência de



nucleótidos e à sequência deduzida de aminoácidos para a IGFBP-2.

A IGFBP-3 tem um peso molecular de, aproximadamente, 150 kd. Ver, por exemplo, Baxter, R.C. et al., *Bioch. Biophys. Res. Com.* (1986) 139:1256-1261, que diz respeito a uma sub-unidade de 53 kd da IGFBP-3 que foi purificada a partir de soro humano; Wood, W.I. et al., *Mol. Endocrinol.* (1988) 2:1176-1185, que diz respeito a uma sequência de aminoácidos completa para IGFBP-3 e à expressão celular do cDNA clonado da IGFBP-3 em culturas de células de tecidos de mamífero; WO90/00569, publicada a 25 de Janeiro de 1990, de Baxter, R.C., que diz respeito ao isolamento, a partir de plasma humano, de uma sub-unidade ácida instável (ALS) do complexo (IGFBP), e a sequência particular de aminoácidos para a ALS diz respeito a uma sub-unidade da IGFBP-3.

Para formas não humanas, ver, por exemplo, Mottola, C. et al., *Journ. of Biol. Chem.* (1986) 261:11180-11188, que diz respeito a uma forma não humana da IGFBP que foi isolada em meio condicionado de células de fígado de rato BRL-3A e tem um peso molecular de aproximadamente 33-36 kd; Lyons, R. M. et al., *Mol. Cell. Endocrinol.* (1986) 45:263-270, que diz respeito a uma proteína de 34 kd clonada em células de fígado de rato BRL-3A designada por MCP; Publicação EPO No. 369.943, publicada em 23 de Maio de 1990, de Binkert, C., et al., que diz respeito a uma sequência de cDNA de uma proteína de ligação de BRL-3A de rato e usa esta sequência para verificar três bibliotecas de cDNA humano.

Mohan, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989) 86:8338-8342, que diz respeito a uma sequência de aminoácidos N-terminal para uma IGFBP (designada aqui como IGFBP-4, mas, usando



a terminologia dos requerentes como referida nos pedidos listados a seguir, corresponde actualmente à IGFBP-5) isolada de um meio condicionado por células humanas de osteosarcoma, e Shimasaki, S. et al., Mol. Endocrinology (1990) 4:1451-1458, que diz respeito a cDNAs de IGFBP codificando uma IGFBP (designada aqui por IGFBP-4, mas, usando a terminologia dos requerentes, corresponde actualmente à IGFBP-5) de rato e humana.

O Pedido co-pendente No. de série 07/574.613, depositado em 28 de Agosto de 1990, e que é co-pertença dos presentes requerentes, diz respeito ao material genético IGFBP-4 e IGFBP-5 e a sequências de aminoácidos; o Pedido co-pendente com o No. de série 07/576.648, publicado a 31 de Agosto de 1990, e que é co-pertença dos presentes requerentes, diz respeito a sequências de aminoácidos da IGFBP-4; o conjunto de pedidos com o No de série 07/576.629, publicado a 31 de Agosto de 1990, e que é co-pertença dos presentes requerentes, diz respeito ao material genético que codifica a IGFBP-4; o pedido co-pendente com o No. de série 07/577.391, publicado a 31 de Agosto de 1990, e que é co-pertença dos presentes requerentes, diz respeito às sequências de aminoácidos da IGFBP-5; o pedido co-pendente com o No. de série 07/577.392, publicado a 31 de Agosto de 1990, que é co-pertença dos presentes requerentes, diz respeito ao material genético que codifica a IGFBP-5.

Zapf, J. et al., J. of Biol. Chem. (1990) 265:14892-14898, diz respeito a quatro IGFBP's (IGFBP-2, IGFBP-3, uma forma truncada da IGFBP-3, e IGFBP-4) isoladas a partir de soro humano de adulto, por cromatografia de afinidade com o factor de crescimento semelhante à insulina (IGF) e por cromatografia



liquida de elevada resolução.

A existência de um grande no de diferentes proteínas de ligação ao IGF indica que estas proteínas devem ter diferentes funções. Dado que é possível diagnosticar estados de doença e modificar por várias vias diferentes a actividade biológica dos IGF's, usando as já conhecidas proteínas de ligação, existe um significativo interesse na descoberta de novas proteínas de ligação ao IGF tendo as mesmas ou diferentes propriedades biológicas.

#### Sumário do invento

Por conseguinte é um objectivo do presente invento fornecer uma proteína de ligação ao IGF, diferente da IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4 e IGFBP-5.

Ainda outro objectivo do presente invento consiste em fornecer uma nova proteína de ligação ao IGF, usando moléculas de DNA recombinante capazes de expressar a nova proteína de ligação ao IGF (designada aqui por IGFBP-6), com o objectivo de produzir a proteína de ligação.

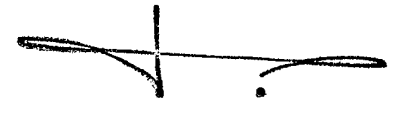
Estes e outros objectivos do invento foram conseguidos através do fornecimento de uma IGFBP purificada, seleccionada de um grupo consistindo de uma IGFBP tendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60%, preferencialmente 70%, mais preferencialmente 85% e ainda mais preferencialmente 90% homóloga à sequência de aminoácidos da Figura 1, e fragmentos desta, em que os fragmentos têm comprimento suficiente para serem únicos a esta proteína de ligação (por exemplo, 10, 15, 20, ou 25 aminoácidos consecutivos da dita sequência), e em que a proteína de ligação purificada é capaz de se ligar a um anticorpo

especifico para a IGFBP-6 ou a um factor de crescimento semelhante à insulina. Moléculas proteicas de ligação produzidas por recombinação, e anticorpos que reconhecem a nova proteína de ligação, fazem também parte do invento.

Uma vantagem significativa da produção de IGFBP-6 por técnicas de DNA recombinante, em vez do isolamento da IGFBP-6 a partir de fontes naturais, é que podem ser produzidas quantidades equivalentes de IGFBP-6 usando menos material inicial do que o que seria necessário para isolar a proteína de ligação a partir de uma fonte natural. A produção de IGFBP-6 por técnicas recombinantes também permite que a IGFBP-6 seja isolada na ausência de algumas moléculas normalmente presentes nas células que naturalmente produzem IGFBP-6. De facto, composições de IGFBP completamente livres de qualquer vestigio de contaminantes proteicos humanos podem ser rapidamente produzidas dado que a única proteína humana produzida pelo hospedeiro recombinante não humano é a IGFBP recombinante. Também são evitados potenciais agentes virais de fontes naturais. E também evidente que as técnicas de DNA recombinante podem ser usadas para produzir derivados polipeptidicos da IGFBP-6 que não se encontram na natureza, tal como as variações descritas a seguir.

#### Breve Descrição do Desenho

A Figura 1 é um diagrama esquemático que mostra a sequência de aminoácidos e nucleótidos de um clone que codifica a IGFBP-6 humana.

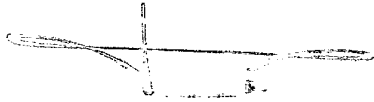


### Descrição das Modalidades Específicas

São fornecidas novas composições compreendendo proteínas recombinantes produzidas usando sequências que codificam a IGFBP-6 e fragmentos derivados desta, em conjunto com proteínas isoladas a partir de fontes naturais, bem como proteínas expressas recombinantemente, e métodos para produção destas proteínas.

#### 1. Definições

A prática do presente invento utilizará, a não ser que de outra forma indicado, técnicas convencionais de biologia molecular, microbiologia, DNA recombinante, e imunologia, as quais estão dentro do campo da técnica. Tais técnicas estão completamente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL, SECOND EDITION (1989); DNA CLONING, VOLUMES I E II (D. N. Glover ed. 1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M. J. Gait ed, 1984); NUCLEIC ACID HIBRIDIZATION (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney ed. 1986); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); B. Perbal, A PRATICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); as séries, METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. H. Miller e M. P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology, Vol. 154 e Vol. 155 (Wu e Grossman, e Wu, eds., respectivamente), Mayer e Walker, eds. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London), Scopes, (1987), PROTEIN PURIFICATION:




PRINCIPLES AND PRACTICE, Segunda edição (Springer-Verlag, N.Y.), e HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (D. M. Weir e C. C. Blackwell eds. 1986).

As abreviaturas padrão para nucleótidos e aminoácidos são usadas na Figura 1 e noutros locais nesta Memória Descritiva.

Como aqui usado, o termo IGFBP-6 é um acrónimo para a proteína de ligação-6 ao factor de crescimento semelhante à insulina. Esta proteína, ou fragmento desta, é capaz de se ligar a um anticorpo específico para a IGFBP-6 ou a um factor IGF. Um cDNA codificando pelo menos uma forma da IGFBP-6 é apresentado na Figura 1. Prevê-se que existem outras espécies de IGFBP-6 ou que podem ser criadas. Assim, IGFBP-6 refere-se a qualquer das formas de ocorrência natural de IGFBP-6, incluindo a forma que se mostra na Figura 1. Na sequência que se mostra, o local de clivagem para a proteína completamente formada pode ocorrer no ponto indicado pela seta (a), resultando numa proteína tendo um peso molecular de 29018 Da. Adicionalmente, outras espécies da proteína podem ser clivadas onde indicado pela seta (b), resultando numa proteína tendo um peso molecular de aproximadamente 28500 Da.

Complementarmente, dentro da definição estão incluídos análogos e incluem polipéptidos truncados (incluindo fragmentos) e polipéptidos semelhantes à IGFBP-6, por exemplo, mutantes, que retêm a actividade catalítica e, de preferência, têm uma homologia de pelo menos 80%, mais preferencialmente de 90% e ainda mais preferencialmente de 95%. Tipicamente, tais análogos diferem por apenas 1, 2, 3, ou 4 modificações nos códons. Exemplos incluem polipéptidos com variações menores de aminoácidos em relação à sequência natural de aminoácidos da



IGFBP-6; em particular, substituições conservativas de aminoácidos. Substituições conservativas são aquelas que têm lugar dentro de uma família de aminoácidos que estão relacionados pelas suas cadeias laterais. Aminoácidos geneticamente codificados são geralmente divididos em quatro famílias: (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) não polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; e (4) polares sem carga = glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptofano e tirosina são por vezes classificados conjuntamente como aminoácidos aromáticos. Por exemplo, é normal prever que uma substituição isolada de uma leucina por uma isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina, ou uma substituição conservativa semelhante de um aminoácido por um aminoácido de estrutura relacionada não tenha um grande efeito na actividade biológica. Moléculas polipeptídicas, tendo substancialmente a mesma sequência de aminoácidos que a IGFBP-6, mas possuindo substituições menores de aminoácidos que não afectam substancialmente a capacidade dos derivados do polipeptido de IGFBP-6 para interactuarem com moléculas específicas para a IGFBP-6, tal como anticorpos e moléculas IGF, particularmente IGF-I e especialmente IGF-II, estão dentro da definição de IGFBP-6. Derivados incluem conjugados de agregação com outras moléculas IGF-BP e conjugados covalentemente com metades químicas não relacionadas. Derivados covalentes são preparados através da ligação de funcionalidades a grupos que se encontram na cadeia de aminoácidos da IGFBP-6 ou nos resíduos N-




ou C- terminais por meios conhecidos na técnica.

As moléculas específicas para a IGFBP-6 incluem polipéptidos tais como anticorpos que são específicos para o polipéptido IGFBP-6 contendo a sequência de aminoácidos da IGFBP-6 de ocorrência natural. Por "polipéptido de ligação específica" entendem-se polipéptidos que se ligam à IGFBP-6 e os seus derivados, os quais têm uma afinidade de ligação mensurável maior para o polipéptido alvo, isto é, a IGFBP-6 e derivados polipeptídicos da IGFBP-6, do que para outros polipéptidos testados para a ligação. É preferida uma maior afinidade por um factor de 10, mais preferencialmente por um factor de 100. A afinidade de ligação para anticorpos refere-se a um acontecimento isolado de ligação (isto é, ligação monovalente de uma molécula de anticorpo). A ligação específica por anticorpos também significa que a ligação tem lugar no local normal de ligação da molécula do anticorpo (na extremidade dos braços, na região variável). Utilizando os dados da sequência da Figura 1, bem como as características evidenciadas pela IGFBP-6, está dentro do campo do invento obter outras sequências de DNA que codifiquem a IGFBP-6. Por exemplo, o gene estrutural pode ser manipulado através da variação de nucleótidos individuais, de forma a reter o(s) aminoácido(s) correcto(s), ou variar os nucleótidos, de forma a modificar os aminoácidos, sem perda de actividade biológica. Os nucleótidos podem ser substituídos, inseridos ou deletados por técnicas conhecidas, incluindo, por exemplo, mutagénese e reparação pelo "primer" in vitro. O gene estrutural pode ser truncado na sua extremidade 3' e/ou na sua extremidade 5' enquanto retem a sua actividade biológica.



O termo "polinucleótido recombinante" como usado aqui, refere-se a um polinucleótido de origem genômica, cDNA, semi-sintético ou sintético que, em virtude da sua origem ou manipulação: (1) não está associado com todo ou com uma porção de um polinucleótido com o qual está associado na natureza; (2) está ligado a um polinucleótido que não aquele a que se encontra ligado na natureza; (3) não existe na natureza.

O termo "polinucleótido", como aqui usado, refere-se a uma forma polimérica de nucleótidos de qualquer comprimento, quer ribonucleótidos quer desoxiribonucleótidos. Este termo refere-se apenas à estrutura primária da molécula. Assim, este termo inclui RNA e DNA de cadeia simples e dupla. Também inclui tipos de modificações conhecidas, por exemplo marcadores conhecidos na técnica, metilação, "caps", substituição de um ou mais dos nucleótidos de ocorrência natural por um análogo, modificações internucleótidos tais como, por exemplo, aqueles com ligações sem carga (por exemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) e com ligações com carga (por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aqueles que contêm metades pendentas, tais como, por exemplo, proteínas (incluindo, por exemplo, nucleases, toxinas, anticorpos, péptidos sinais, poli-L-lisina, etc.), aqueles com elementos intercalados (por exemplo, acridina, psoraleno, etc.), aqueles contendo elementos quelantes (por exemplo, metais, metais radioativos, boro, metais oxidativos, etc.), aqueles contendo agentes alquilantes, aqueles com ligações modificadas (por exemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), bem como formas não modificadas do polinucleótido.



Um "replicon" é qualquer elemento genético, por exemplo, um plasmídeo, um cromossoma, um vírus, um cosmídeo, etc., que se comporta como uma unidade autónoma de replicação de polinucleótido dentro da célula; isto é, capaz de replicação sob o seu próprio controlo. Este pode incluir marcadores selectivos.

Um "vector" é um replicon ao qual está ligado outro segmento de polinucleótido, de forma a realizar a replicação e/ou expressão do segmento ligado.

"Sequência de controlo" refere-se a sequências de polinucleótidos que são necessárias para efectuar a expressão das sequências codificadoras às quais estão ligadas. A natureza de tais sequências de controlo difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotas, tais sequências de controlo incluem geralmente um promotor, um local de ligação ribossómica, e uma sequência de terminação da transcrição; em eucariotas, geralmente, tais sequências de controlo incluem promotores e a sequência de terminação da transcrição. O termo "sequências de controlo" pretende incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é necessária para a expressão, e podem também incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, sequências condutoras e sequências associadas à fusão.

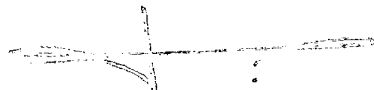
"Operacionalmente ligado" refere-se a uma justaposição em que os componentes descritos estabelecem uma relação que lhes permite funcionarem da forma pretendida. Uma sequência de controlo "operacionalmente ligada" a uma sequência codificadora, está ligada de tal forma que a expressão da sequência codificadora é conseguida em condições compatíveis com as sequências de controlo.

Um "open reading frame" (estrutura de leitura aberta (ORF) é uma região de uma sequência de polinucleótido que codifica um polipéptido; esta região pode representar uma porção de uma sequência codificadora ou o total de uma sequência codificadora.

Uma "sequência codificadora" é uma sequência polinucleotídica que é traduzida num polipéptido, usualmente via mRNA, quando colocada sob o controlo de sequências reguladoras apropriadas. As fronteiras da sequência codificadora são determinadas por um codão de iniciação da tradução na extremidade 5' e por um codão de terminação da tradução na extremidade 3'. Uma sequência codificadora pode incluir, mas não está limitada a, cDNA, e sequências polinucleotídicas recombinantes. "PCR" refere-se a uma técnica de reacção de polimerase em cadeia, como descrito em Saiki, et al., Nature 324:163 (1986); Patente Norte Americana com o No 4.683.195; e Patente Norte Americana com o No. 4.683.202.

Como usado aqui, x é "heteróloga" no que respeita a y, se x não está naturalmente associada com y de forma idêntica; isto é, x não está associada com y na natureza ou x não está associada com y da mesma forma que se encontra na natureza.

"Homologia" refere-se aos graus de semelhança entre x e y. Espera-se que o total de homologia entre diferentes espécies ou formas de IGFBP-6, ao nível nucleotídico, seja provavelmente de 40% ou maior, provavelmente 60% ou maior, e ainda mais provavelmente cerca de 80% a 90%, ou maior. A correspondência entre a sequência de uma forma e outra pode ser determinada por técnicas conhecidas no ramo. Por exemplo, podem ser determinadas



por comparação directa da informação da sequência do polinucleótido. Alternativamente, a homologia pode ser determinada por hibridização dos polinucleótidos em condições tais que formam dupletes estáveis entre regiões homólogas (por exemplo, aquelas que serão usadas antes da digestão  $S_1$ ), seguindo-se a digestão por nuclease(s) específica(s) para cadeia simples, seguindo-se a determinação de tamanho dos fragmentos da digestão.

Como usado aqui, o termo "polipéptido" refere-se a um polímero de aminoácidos e não se refere a um comprimento específico do produto; assim, péptidos, oligopéptidos, e proteínas estão incluídos dentro da definição de polipéptido. Este termo também não se refere a ou exclui modificações pós-expressão do polipéptido, por exemplo, glicosilações, acetilações, fosforilações e semelhantes. Incluídos na definição estão, por exemplo, polipéptidos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), polipéptidos com ligações substituídas, bem como outras modificações conhecidas na técnica, ambas de ocorrência natural e de ocorrência não natural.

Um polipéptido ou sequência de aminoácidos "derivados a partir" de uma determinada sequência de ácidos nucleicos refere-se a um polipéptido tendo uma sequência de aminoácidos idêntica à do polipéptido codificado na sequência, ou uma porção desta em que a porção consiste de pelo menos 3 a 5 aminoácidos, mais preferencialmente de pelo menos 8 a 10 aminoácidos, e ainda mais preferencialmente de pelo menos 11 a 15 aminoácidos, ou que seja imunologicamente identificável com um polipéptido codificado na



sequência. Esta terminologia também inclui um polipéptido expresso a partir de uma determinada sequência de ácidos nucleicos.

A IGFBP-6, ou polipéptidos derivados desta, podem ser usados para produzir anticorpos, quer monoclonais quer policlonais, específicos para a IGFBP-6. Estes termos, e os métodos para produzir anticorpos são conhecidos na técnica.

"Células hospedeiras recombinantes", "células hospedeiras", "células", "linhas celulares", "culturas de células", e outros termos tais denominam, por exemplo, microorganismos, células de insectos, e células de mamíferos, que podem ser, ou foram, usados como recipientes para vectores recombinantes ou outro DNA transferido, e incluem a descendência da célula original que foi transformada. Está compreendido que a descendência de uma única célula parental pode não ser completamente idêntica em morfologia ou em genoma ou em complemento de DNA total à parente original, devido a mutações naturais, acidentais ou provocadas.

Como usado aqui, o termo "microorganismo" inclui espécies microbianas procariotas e eucariotas tais como bactérias e fungos, incluindo os últimos leveduras e fungos filamentosos.

"Transformação", como usado aqui, refere-se à inserção de um polinucleótido exógeno numa célula hospedeira, independentemente do método usado para a inserção, por exemplo, uptake directo, transdução, conjugação-f ou electroporação. O polinucleótido exógeno pode ser mantido como um vector não integrado, por exemplo, um plasmideo, ou alternativamente, pode ser integrado no genoma do hospedeiro.



Por "purificado" e "isolado" entende-se, quando referidos a um polipéptido ou sequência de nucleótidos, que a molécula indicada está presente na ausência substancial de outras macromoléculas biológicas do mesmo tipo. O termo "purificado" como usado aqui, significa a presença preferencialmente, de pelo menos 95% em peso, mais preferencialmente pelo menos 99% em peso, e ainda mais preferencialmente pelo menos 99,8% em peso, de macromoléculas biológicas do mesmo tipo (podem estar presentes macromoléculas excepto a água, tampões, e outras moléculas pequenas, especialmente moléculas tendo um peso molecular de menos de 1000).

## 2- Modos específicos de realização do invento

### a. Fontes de IGFBP-6

A IGFBP-6 pode ser derivada de mamíferos, por exemplo, fontes de murideos, suínos, equideos, bovinos e humanas. Todas estas fontes estão incluídas dentro da definição de IGFBP-6, desde que possuam o grau requerido de homologia.

A IGFBP-6 inclui proteínas de ligação purificadas a partir de um extrato de tecido ou de um meio de cultura condicionado bem como as obtidas por meios recombinantes.

### b. Purificação de IGFBP-6

A IGFBP-6 pode ser rapidamente purificada a partir do sangue e dos seus componentes, tal como soro e plasma, e a partir de células geneticamente modificadas para produzir IGFBP-6 ou derivados polipeptídicos desta, por cromatografia de afinidade usando anticorpos monoclonais específicos para a IGFBP-6.

Adicionalmente ao uso da cromatografia por afinidade com anticorpos, a IGFBP-6 e derivados polipeptídicos desta podem ser purificados por uma variedade de outras técnicas de purificação de proteínas bastante conhecidas (sózinhas ou combinadas) incluindo imunoprecipitação, filtração em gel, cromatografia de troca iónica, cromatofocagem, focagem isoeléctrica, precipitação selectiva, electroforese, e semelhantes. As fracções isoladas durante o procedimento de purificação podem ser analisadas quanto à presença de IGFBP-6 ou derivados polipeptídicos derivados da IGFBP-6, através de imunoensaios utilizando anticorpos específicos para a IGFBP-6 ou bioensaios específicos para a IGFBP-6. Exemplos detalhados são fornecidos a seguir.

#### c. Isolamento das sequências da IGFBP-6

O isolamento de sequências de nucleótidos codificando a IGFBP-6 implica a criação ou de uma biblioteca genómica preparada a partir de células codificando a IGFBP-6 ou a preparação de uma biblioteca de cDNA a partir de RNA isolado a partir de células que expressam a IGFBP-6. Geralmente, é preferível criar uma biblioteca de cDNA para o isolamento de sequências de nucleótidos codificando a IGFBP-6 de forma a evitar quaisquer possíveis problemas provenientes das tentativas para determinar as fronteiras dos intrões/exões. As bibliotecas genéticas podem ser feitas em células hospedeiras quer eucariotas quer procariotas. Os vectores de clonagem vulgarmente disponíveis, tais como plasmídeos, cosmídeos, fagos, YAC e semelhantes, podem ser usados para originar bibliotecas genéticas próprias para o isolamento de sequências de nucleótidos que codifiquem a IGFBP-6 ou porções

desta.

#### d. Verificação da Presença de Sequências da IGFBP-6

Métodos úteis para verificar bibliotecas genéticas em relação à presença de sequências de nucleótidos de IGFBP-6, incluem a preparação de sondas oligonucleotídicas baseadas na informação da sequência de aminoácidos N-terminal de IGFBP-6 purificada, ou de fragmentos internos purificados da IGFBP-6 purificada. Através do uso do código genético de tripletes universal, podem ser preparadas sequências de oligonucleótidos com cerca de 17 pares de bases ou maiores, por técnicas de síntese convencionais in vitro, de forma a corresponderem a porções da IGFBP-6 para a qual a sequência de aminoácidos foi determinada pela análise N-terminal. As resultantes sequências de ácidos nucleicos podem ser subsequentemente marcadas com radionuclídeos, enzimas, biotina, substâncias fluorescentes, ou semelhantes, e usadas como sondas para verificar as bibliotecas genéticas.

Métodos adicionais de interesse para isolar as sequências de ácidos nucleicos que codificam a IGFBP-6 incluem a verificação das bibliotecas genéticas para a expressão da IGFBP-6 ou fragmentos desta, através de anticorpos específicos para a IGFBP-6, quer policlonais quer monoclonais. Uma técnica preferida envolve o uso de "primers" degenerados baseados em sequências parciais de aminoácidos de IGFBP-6 purificada, ou em sequências de moléculas relacionadas conhecidas, e a reacção de polimerase em cadeia (PCR) para ampliar os segmentos do gene entre os "primers". O gene pode depois ser isolado usando uma sonda

específica de hibridização baseada no segmento ampliado do gene, o qual é depois analisado para a expressão apropriada da proteína. Uma descrição detalhada desta técnica encontra-se nos exemplos que se seguem.

#### e. Métodos de Sequenciação

As sequências de nucleótidos que codificam a IGFBP-6 podem ser obtidas a partir de moléculas de DNA recombinante recuperadas dos isolados de IGFBP-6 das bibliotecas genéticas. A sequência de nucleótidos que codifica a IGFBP-6 pode ser obtida por sequenciação da sequência de nucleótidos, que não a do vector, destas moléculas recombinantes. A informação da sequência de nucleótidos pode ser obtida usando protocolos de sequenciação de DNA vulgarmente usados, tais como a sequenciação de Maxim e Gilbert, a sequenciação de nucleótidos didesoxi, e semelhantes. Exemplos de protocolos apropriados para a sequenciação de nucleótidos podem ser encontrados em Berger e Kimmel, Methods in Enzymology Vol. 52, Guide to Molecular Cloning Techniques, (1987) Academic Press. A informação da sequência de nucleótidos de vários isolados de DNA recombinante, incluindo isolados de cDNA e bibliotecas genómicas, pode ser combinada de forma a fornecer a total sequência de aminoácidos codificadora da IGFBP-6 bem como a sequência de nucleótidos de intrões dentro do gene da IGFBP-6, sequência de nucleótidos a montante e sequência de nucleótidos a jusante.

As sequências de nucleótidos, obtidas a partir da sequenciação dos isolados específicos da biblioteca genética da IGFBP-6, são sujeitas a análise com o objectivo de identificar



regiões de interesse no gene da IGFBP-6. Estas regiões de interesse incluem as "open reading frames" (estruturas de leitura abertas), intrões, sequências promotoras, sequências de terminação, e semelhantes. A análise da informação da sequência de nucleótidos é preferencialmente realizada por computador. O software apropriado para analisar as sequências de nucleótidos para regiões de interesse está comercialmente disponível e inclui, por exemplo, DNASIS<sup>TM</sup> (LKB). É também de interesse usar informação da sequência de aminoácidos obtida a partir da sequenciação N-terminal da IGFBP-6 purificada, quando se analisa a informação da sequência de nucleótidos de IGFBP-6, de modo a aumentar a precisão da análise da sequência de nucleótidos.

#### f. Sistemas de expressão

A IGFBP-6 e os derivados polipeptídicos da IGFBP-6 podem ser expressos por técnicas recombinantes quando a sequência de DNA codificando a molécula relevante está funcionalmente inserida num vector. Por "funcionalmente inserida" entende-se numa estrutura de leitura e orientação adequadas, como é bem entendido pelos especialistas na técnica. Quando se produz uma construção genética contendo uma estrutura de leitura completa da IGFBP-6, o material de iniciação preferido é um isolado da biblioteca de cDNA codificando a IGFBP-6. Tipicamente, o gene da IGFBP-6 será inserido a jusante de um promotor e será seguido por um codão stop, embora possa ser usado, se desejado, a produção de uma proteína híbrida seguida de clivagem. Em geral, sequências específicas da célula hospedeira que melhoram o rendimento de produção de IGFBP-6 e derivados polipeptídicos de IGFBP-6 serão

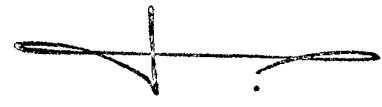
usados e serão adicionadas sequências de controlo adequadas ao vector de expressão, tal como sequências incrementadoras, sequências de poliadenilação, e locais de ligação aos ribossomas.

#### i. Sistemas de mamíferos

Uma vez isolada a sequência codificadora adequada, esta pode ser expressa numa variedade de diferentes sistemas de expressão; por exemplo, os usados com células de mamíferos, baculovirus, bactéria e leveduras.


Os sistemas de expressão em mamíferos são conhecidos na técnica. Um promotor de mamífero é uma qualquer sequência de DNA capaz de se ligar à RNA polimerase de mamíferos e iniciar a transcrição a jusante (3') de uma sequência código (por exemplo, DNA estrutural) em mRNA. Um promotor terá uma região de iniciação da transcrição, que é usualmente colocada proxima da extremidade 5' da sequência codificadora, e uma caixa TATA, usualmente localizada 25 a 30 pares de bases (pb) a montante do local de iniciação da transcrição. Pensa-se que a caixa TATA direcciona a RNA polimerase II para iniciar a síntese de RNA no local correcto. Um promotor de mamífero também terá um elemento promotor a montante, tipicamente localizado dentro dos 100 a 200 pb a montante da caixa TATA. Um elemento promotor a montante determina a taxa à qual a transcrição é iniciada e pode actuar em qualquer das orientações [Sambrook et al. (1989) "Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells." in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed.].

Genes virais de mamíferos são muitas vezes expressos abundantemente e têm uma grande variedade de hospedeiros; por



isso, as sequências que codificam genes virais de mamíferos fornecem sequências promotoras particularmente úteis. Exemplos incluem o promotor do início SV40, o promotor do vírus LTR do tumor mamário de rato, o promotor mais tardio do adenovírus (AdMLP), e o promotor do vírus herpes simplex. Adicionalmente, as sequências derivadas a partir de genes não virais, tal como o gene da murina metalotioneína, também fornecem sequências promotoras úteis. A expressão pode ser tanto constitutiva como regulada (induzida), dependendo do promotor, e pode ser induzida com glucocorticoides em células de resposta a hormonas.


A presença de um elemento incrementador ("enhancer"), combinado com os elementos promotores descritos acima, irá aumentar tipicamente os níveis de expressão. Um incrementador é uma sequência de DNA reguladora que pode estimular a transcrição até 1000 vezes quando ligada a promotores homólogos ou heterólogos, com a síntese a começar no local de iniciação normal do RNA. Os incrementadores são também activados quando são colocados a montante ou a jusante do local de iniciação da transcrição, ou com orientação normal ou com orientação trocada, ou a uma distância de mais de 1000 nucleótidos do promotor [Maniatis et al. (1987) Science 236:1237; Alberts et al. (1989) Molecular Biology of the Cell, 2a ed.]. Elementos incrementadores derivados a partir de vírus podem ser particularmente úteis, porque eles têm tipicamente uma vasta gama de hospedeiros. Exemplos incluem o incrementador do gene do início do SV40 [Dijkema et al (1985) EMBO J. 4:761] e os incrementador/promotores derivados da repetição terminal longa (LTR) do vírus do sarcoma de Rous [Gorman et al. (1982b) Proc.



Natl. Acad. Sci. 79:6777] e a partir do citomegalovirus humano [Boshart et al. (1985) Cell 41:521]. Adicionalmente, alguns incrementadores são reguláveis e tornam-se activos apenas na presença de um indutor, tal como uma hormona ou ião metálico [Sassone-Corsi e Borelli (1986) Trends Genet. 2:215; Maniatis et al. (1987) Science 236:1237].

Uma molécula de DNA pode ser expressa intracelularmente em células de mamíferos. Uma sequência promotora pode estar directamente ligada à molécula de DNA, caso em que o primeiro aminoácido da extremidade N-terminal da proteína recombinante será sempre uma metionina, que é codificada pelo códon de iniciação ATG. Se desejado, a extremidade N-terminal pode ser clivada a partir da proteína por incubação in vitro com brometo cianogénico.

Alternativamente, proteínas estranhas podem também ser secretadas a partir da célula para o meio de crescimento através da criação de moléculas de DNA quiméricas que codificam uma proteína de fusão composta de um fragmento de sequência condutora que possibilita a secreção de proteínas estranhas em células de mamíferos. Preferencialmente, existem locais de processamento codificados entre o fragmento condutor e o gene estranho, que podem ser clivados quer in vivo quer in vitro. O fragmento da sequência condutora codifica tipicamente um péptido sinal constituído de aminoácidos hidrofóbicos, os quais direccionam a secreção da proteína a partir da célula. A sequência condutora tripartida do adenovirus é um exemplo de uma sequência condutora que possibilita a secreção de uma proteína estranha a partir de células de mamíferos.




Tipicamente, as sequências de terminação da transcrição e as de poliadenilação, reconhecidas pelas células de mamíferos, são regiões reguladoras localizadas na posição 3' em relação ao códon stop da tradução e, por isso, junto com os elementos promotores, flanqueiam a sequência codificadora. A extremidade 3' do mRNA completamente formado é feita por clivagem pós-transcricional em local específico e poliadenilação [Birnstiel et al. (1985) Cell 41:349; Proudfoot e Whitelaw (1988) "Termination and 3' end processing of eucaryotic RNA" em Transcription and splicing (ed. B. D. Hames e D. M. Glover); Proudfoot (1989) Trends Biochem. Sci. 14:105]. Estas sequências direcionam a transcrição de um mRNA que pode ser traduzido no polipéptido codificado pelo DNA. Exemplos de sinais de terminação/poliadenilação da transcrição incluem os derivados do SV40 [Sambrook et. al. (1989) "Expression of cloned genes in cultured mammalian cells" em Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

Alguns genes podem ser expressos mais eficientemente quando intrões (também chamados sequências de intervenção) estão presentes. Contudo, vários cDNAs têm sido eficientemente expressos a partir de vectores a que faltam os sinais de "splicing" (também chamados locais dadores e aceitadores de corte ("splice")) [ver, por exemplo, Gething e Sambrook (1981) Nature 293:620]. Os intrões são sequências intervenientes não codificadoras dentro de uma sequência codificadora que contém um local dador e aceitador de corte ("splice"). Estes são removidos por um processo chamado "splicing", seguindo-se a poliadenilação do transcrito primário [Nevins (1983) Annu. Rev. Biochem. 52:441;

Green (1986) Annu. Rev. Genet. 20:671; Padgett et al. (1986) Annu. Rev. Biochem. 55:1119; Krainer e Maniatis (1988) "RNA splicing", em Transcription and splicing (ed. B. D. Hames e D. M. Glover)].

Tipicamente, os componentes acima descritos, compreendendo um promotor, um sinal de poliadenilação, e uma sequência de terminação da transcrição, são postos em conjunto dentro das construções de expressão. Incrementadores, intrões com locais aceitadores e dadores de corte ("splice") funcionais, e sequências condutoras podem também ser incluídos numa construção de expressão, se desejado. As construções de expressão são muitas vezes mantidas num replicon, tal como um elemento extracromossómico (por exemplo, plasmídeos) capaz de as manter estavelmente num hospedeiro, tal como células de mamíferos ou bactérias. Os sistemas de replicação em mamíferos incluem os derivados a partir de vírus de animais, os quais requerem factores de trans-activação para replicarem. Por exemplo, plasmídeos contendo os sistemas de replicação dos papovavírus, tal como o SV40 [Gluzman (1981) Cell 23:175] ou poliomavírus, replicam-se num número de cópias extremamente elevado na presença do antígeno T viral apropriado. Exemplos adicionais de replicons de mamíferos incluem os derivados a partir do vírus do papiloma bovino e o vírus Epstein-Barr. Adicionalmente, o replicon pode ter dois sistemas de replicação, permitindo assim que este seja mantido, por exemplo, em células de mamíferos para expressão e em hospedeiros procariotas para clonagem e ampliação. Exemplos de tais vectores vai-vem de mamíferos-bactérias incluem o pMT2 [Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9:946 e o pHEBO [Shimizu



et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:1074].

O processo de transformação usado depende do hospedeiro a ser transformado. Métodos para a introdução de polinucleótidos heterólogos em células de mamíferos são conhecidos na técnica e incluem a transfecção mediada por dextrano, precipitação em fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, electroporação, encapsulação do(s) polinucleótido(s) em lipossomas, e microinjecção directa do DNA para dentro do núcleo.

As linhas de células de mamíferos, disponíveis como hospedeiros para a expressão, são conhecidas na técnica e incluem muitas linhas de células imortalizadas disponíveis na American Type Culture Collection (ATCC), incluindo, mas não limitadas a, células de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, células de rim de hamster bebé (BHK), células de rim de macaco (COS), células do carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2), e um número de outras linhas celulares.

#### ii. Sistemas em baculovirus

O polinucleótido que codifica a IGFBP-6 também pode ser inserido num vector de expressão de insecto apropriado, e está operacionalmente ligado aos elementos de controlo dentro do vector. A construção do vector utiliza técnicas que são conhecidas no ramo.

Geralmente, os componentes do sistema de expressão incluem um vector de transferência, usualmente um plasmideo bacteriano, o qual contém o fragmento do genoma do baculovirus, e um local de restrição conveniente para a inserção do gene ou

genes heterólogos a serem expressos; um baculovirus do tipo selvagem com uma sequência homóloga à do fragmento específico do baculovirus no vector de transferência (isto permite a recombinação homóloga do gene heterólogo no genoma do baculovirus); e células hospedeiras de insectos apropriadas e meio de crescimento.

Após a inserção da sequência de DNA do IGFBP-6 no vector de transferência, o vector e o genoma viral do tipo selvagem são transfectados para uma célula hospedeira de insecto onde é permitida a recombinação entre o vector e o genoma viral. O arranjo do virus recombinante é expresso e as placas recombinantes são identificadas e purificadas. Materiais e métodos para os sistemas de expressão de baculovirus/células de insecto estão comercialmente disponíveis na forma de um kit da, inter alia, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). Estas técnicas são geralmente conhecidas pelos especialistas na técnica e completamente descritas por Summers e Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No 1555 (1987) (referido adiante como "Summers e Smith"), e incorporadas para referência.

Antes da inserção da sequência de DNA do IGFBP-6 no genoma do baculovirus, os componentes acima descritos, compreendendo um promotor, uma sequência condutora (se desejado), uma sequência codificadora de interesse, e uma sequência de terminação da transcrição estão tipicamente montados numa construção de transplante intermediária (vector de transferência). Esta construção pode conter um único gene e elementos reguladores operacionalmente ligados; genes múltiplos, cada um com o seu próprio conjunto de elementos reguladores



operacionalmente ligados; ou genes múltiplos, regulados pelo mesmo conjunto de elementos reguladores. Construções de transplante intermediárias são muitas vezes mantidas num replicon, tal como um elemento extracromossómico (por exemplo, plasmídeos) capazes de as manter estavelmente no hospedeiro, tal como uma bactéria. O replicon terá um sistema de replicação, permitindo assim que seja mantido no hospedeiro apropriado para clonagem e ampliação.

Presentemente, o vector de transferência usado mais vulgarmente para introduzir genes estranhos no AcNPV é o pAc373. Muitos outros vectores, conhecidos pelos especialistas na técnica, foram também concedidos. Estes incluem, por exemplo, o pVL985 (que altera o codão de iniciação de polihedrina de ATG para ATT, e que introduz um local de clonagem da BamHI de 32 pares de bases a jusante do ATT; ver Luckow e Summers, Virology (1988) 17:31).

O plasmídeo usualmente contém também o sinal de poliadenilação da polihedrina (Miller et al. (1988) Ann. Rev. Microbiol., 42:177), e um gene procariota de resistência à ampicilina (amp) e a origem da replicação, para selecção e propagação em E. coli.

Os vectores de transferência dos baculovirus usualmente contém um promotor de baculovirus. Um promotor de baculovirus é qualquer sequência de DNA capaz de ligar uma RNA polimerase de baculovirus e de iniciar a transcrição a jusante (5' para 3') de uma sequência codificadora (por exemplo, gene estrutural) em mRNA. Um promotor terá uma região de iniciação da transcrição que está usualmente colocada proximalmente à extremidade 5' da



sequência codificadora. Esta região de iniciação da transcrição inclui tipicamente um local de ligação da RNA polimerase e um local de iniciação da transcrição. Um vector de transferência de baculovirus pode também ter um segundo domínio chamado incrementador, que, quando presente, está usualmente em posição distal em relação ao gene estrutural. A expressão pode ser tanto regulada como constitutiva.

Genes estruturais, abundantemente transcritos nos tempos tardios no ciclo de infecção viral, fornecem sequências promotoras particularmente úteis. Exemplos incluem sequências derivadas a partir do gene que codifica a proteína polihedrona viral, Friesen et al., (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", em : The Molecular Biology of Baculoviruses (ed. Walter Doerfler); Publicações E.P.O. Nos 127.839 e 155.476; e o gene que codifica a proteína p10, Vlak et al., (1988), J. Gen. Virol. 69:765.

O DNA que codifica sequências sinal apropriadas pode ser derivado a partir de genes para proteínas secretadas de insectos ou baculovirus, tal como o gene da polihedrina de baculovirus (Carbonell et al. (1988) Gene, 73:409). Alternativamente, dado que os sinais de modificações pós-tradução em células de mamíferos (tal como o péptido sinal de clivagem, clivagem proteolítica, e fosforilação) parecem ser reconhecidos pelas células de insectos, e os sinais necessários para a secreção e acumulação nuclear parecem também ser conservados entre as células de invertebrados e as células de vertebrados, sequências condutoras de origem que não os insectos, tal como as derivadas a partir dos genes que codificam o interferon- $\alpha$  humano,



Maeda et al., (1985), Nature 315:592; o péptido de libertação da gastrina humano, Lebacqz-Verheyden et al., (1988), Molec. Cell. Biol. 8:3129; a IL-2 humana, Smith et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:8404; a IL-3 de rato, (Miyajima et al., (1987) Gene 58:273; e a glucocerebrosidase humana, Martin et al., (1988) DNA, 7:99, podem também ser usadas para fornecer a secreção em insectos.

Um polipéptido ou poliproteína recombinantes podem ser expressos intracelularmente ou, se expressos com as sequências reguladoras apropriadas, podem ser secretados. Uma boa expressão intracelular de proteínas estranhas não fundidas requer usualmente genes heterólogos que idealmente têm uma pequena sequência condutora contendo sinais apropriados de iniciação à tradução, precedendo o sinal de iniciação ATG. Se desejado, a metionina N-terminal pode ser clivada a partir da proteína completamente formada por incubação in vitro com brometo cianogénico.

Alternativamente, poliproteínas ou proteínas recombinantes, que não são naturalmente secretadas, podem ser secretadas a partir de células de insecto através da criação de moléculas quiméricas de DNA que codificam uma proteína de fusão composta por um fragmento da sequência condutora que fornece a secreção de proteínas estranhas em insectos. O fragmento de sequência condutora codifica tipicamente um péptido sinal composto de aminoácidos hidrofóbicos que direccionam a translocação da proteína para dentro do reticulo endoplasmático.

Após a inserção da sequência de DNA da IGFBP-6 e/ou do gene que codifica o precursor do produto de expressão, uma célula



hospedeira de insecto é co-transformada com DNA heterólogo do vector de transferência e com o DNA genómico do baculovirus do tipo selvagem - usualmente por co-transfecção. O promotor e a sequência de terminação da transcrição da construção compreenderão, tipicamente, uma secção de 2 a 5kb do genoma do baculovirus. Métodos para a introdução do DNA heterólogo dentro do local desejado do virus do baculovirus são conhecidos na técnica. (Ver Summers e Smith supra; Ju et al., (1987); Smith et al., Mol. Cell. Biol. (1983) 3:2156; e Luckow e Summers (1989). Por exemplo, a inserção pode ser num gene, como o gene da polihedrina, por recombinação homóloga de duplo "crossover"; a inserção pode também ser num local de restrição de uma enzima concebido no gene de baculovirus desejado. Miller et al., (1989), Bioassays 4:91. A sequência de DNA, quando clonada em lugar do gene da polihedrina no vector de expressão, é flanqueada tanto em 5' com em 3' por sequências específicas de polihedrina e está posicionada a jusante do promotor da polihedrina.

O vector de expressão de baculovirus acabado de formar é subsequentemente empacotado num baculovirus recombinante infeccioso. A recombinação homóloga ocorre a baixa frequência (entre 1% e cerca de 5%); e assim, a maior parte dos virus produzidos após a co-transfecção são ainda do tipo selvagem. Por isso, é necessário um método para identificar os virus recombinantes. A perfeição do sistema de expressão consiste numa verificação visual, permitindo que os virus recombinantes sejam distinguidos. A proteína polihedrina, que é produzida pelo virus nativo, é produzida a níveis muito elevados no núcleo de células infectadas a tempos tardios após a infecção viral. A proteína

polihedrina acumulada forma corpos de oclusão que também contêm partículas incrustadas. Estes corpos de oclusão, até 15  $\mu\text{m}$  de tamanho, têm elevada refracção, dando-lhes uma aparência brilhante e luminosa que é imediatamente visualizada num microscópio óptico. As células infectadas com vírus recombinantes não têm corpos de oclusão. Para distinguir vírus recombinantes de vírus do tipo selvagem, o sobrenadante da transfecção é plaqueado numa monocamada de células de insecto por técnicas conhecidas pelos especialistas neste ramo. Nomeadamente, as placas são verificadas no microscópio óptico para detectar a presença (indicativa do vírus tipo selvagem) ou ausência (indicativo de vírus recombinantes) de corpos de oclusão. "Current Protocols in Microbiology" Vol. 2 (Ausubel et al., eds) em 16.8 (Supp. 10. 1990); Summers e Smith, supra; Miller et al. (1989).


Vectores de expressão de baculovirus recombinantes têm sido desenvolvidos para a infecção em várias células de insectos. Por exemplo, baculovirus recombinantes foram desenvolvidos para, inter alia: Aedes aegypti, Autographa californica, Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperda, e Trichoplusia ni (Publicação P.C.T. No W089/046699; Carbonell et al., (1985) J. Virol. 56:153; Wright (1986) Nature 321:718; Smith et al., (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156; e ver genericamente, Fraser, et al. (1989) In Vitro Cell. Dev. Biol. 25:225).

As células e o meio de cultura das células estão disponíveis comercialmente para a expressão directa e fusão de polipéptidos heterólogos num sistema de expressão baculovirus; a tecnologia da cultura de células é geralmente conhecida pelos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Summers e Smith

supra.

As células de insecto modificadas podem depois crescer num meio de nutrientes adequado, que permite a manutenção estável do plasmídeo(s) presente no insecto hospedeiro modificado. Enquanto o produto de expressão do gene estiver sob controlo induzido, o hospedeiro pode crescer até uma alta densidade, e a expressão é induzida. Alternativamente, quando a expressão é constitutiva, o produto será expresso continuamente para o meio, e o meio de nutrientes tem que estar em circulação contínua, enquanto se retira o produto de interesse e se aumentam os nutrientes em défice. O produto pode ser purificado por técnicas tal como a cromatografia, por exemplo, HPLC, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iónica, etc., electroforese; centrifugação em gradiente de densidade; extracção por solvente; e semelhantes. Quando apropriado, o produto pode ser ainda mais purificado, se necessário, de modo a remover substancialmente qualquer proteína de insecto que também sejam secretadas para o meio ou resultem de lise das células de insecto, de modo a fornecer um produto que é pelo menos substancialmente livre dos restos de hospedeiro, por exemplo, proteínas, lípidos e polissacáridos.

Com o objectivo de obter a expressão da IGFBP-6, células hospedeiras recombinantes derivadas a partir de transformantes são incubadas em condições que permitem a expressão da sequência recombinante que codifica a IGFBP-6. Estas condições irão variar, dependendo da célula hospedeira seleccionada. Contudo, as condições são facilmente ajustáveis para os especialistas na técnica, baseado no que se conhece na



técnica.

### iii. Sistemas bacterianos

As técnicas de expressão bacterianas são conhecidas no ramo. Um promotor bacteriano é uma sequência de DNA qualquer, capaz de se ligar à RNA polimerase bacteriana e iniciar a transcrição a jusante (3') de uma sequência codificadora (por exemplo, gene estrutural) em mRNA. Um promotor terá uma região de iniciação da transcrição que está usualmente colocada proximalmente à extremidade 5' da sequência codificadora. Esta região de iniciação da transcrição, inclui tipicamente um local de ligação da RNA polimerase e um local de iniciação da transcrição. Um promotor bacteriano pode também conter um segundo domínio chamado operador, que pode cobrir um local de ligação adjacente da RNA polimerase no qual começa a síntese de RNA. O operador permite a regulação negativa (induzível) da transcrição, à medida que uma proteína repressora do gene pode ligar-se ao operador e assim inibir a transcrição de um gene específico. A expressão constitutiva pode ocorrer na ausência de elementos de regulação negativos, tal como o operador. Adicionalmente, a regulação positiva pode ser conseguida por uma sequência proteica de ligação activadora do gene, que, se presente, é usualmente proximal (5') à sequência de ligação da RNA polimerase. Um exemplo de uma proteína activadora do gene é a proteína catabólica activadora (CAP), que ajuda a iniciar a transcrição do operão lac em *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud et al. (1984) Annu. Rev. Genet. 18:173]. A expressão regulada pode assim ser quer positiva ou negativa, tendo como consequência um aumento ou redução da transcrição.



As sequências que codificam enzimas de vias metabólicas fornecem sequências promotoras particularmente úteis. Exemplos incluem as sequências promotoras derivadas das enzimas do metabolismo dos açúcares, tal como a galactose, lactose (lac) [Chang et al. (1977) Nature 198:1056], e maltose. Exemplos adicionais incluem as sequências promotoras derivadas das enzimas biossintéticas tal como o triptofano (trp) [Goeddel et al. (1980) Nuc. Acids Res. 8:4057; Yelverton et al. (1981) Nuc. Acids Res. 9:731; Patente Norte Americana com o No. 4.738.921; Publicações EPO Nos 036.776 e 121.775]. O sistema promotor da g-lactamase (bla) [Wiessman (1981) "The cloning of interferon and other mistakes", em Interferon 3 (ed. I. Gresser)], os sistemas promotores do bacteriófago lambda PL [Shimatake et al. (1981) Nature 292:128] e do T5 [Patente Norte Americana com o No. 4.689.406] também fornecem sequências promotoras úteis.

Adicionalmente, promotores sintéticos que não ocorrem na natureza também funcionam como promotores bacterianos. Por exemplo, sequências de activação da transcrição de um promotor de bactéria ou bacteriófago podem ser agrupadas com as sequências do operão de outro promotor de bactéria ou bacteriófago, criando um promotor híbrido sintético [Patente Norte Americana No 4.551.433]. Por exemplo, o promotor tac é um promotor híbrido trp-lac compreendendo o promotor trp e as sequências do operão lac que é regulada pelo repressor lac [Amann et al. (1983) Gene 25:167; de Boer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:21]. Além disso, um promotor bacteriano pode incluir promotores de ocorrência natural de origem não bacteriana que têm a capacidade de se ligar à RNA polimerase bacteriana e iniciar a transcrição.



Um promotor de ocorrência natural de origem não bacteriana pode também ser acoplado com uma RNA polimerase compatível, de modo a produzir elevados níveis de expressão de alguns genes em procariotas. O sistema promotor/ bacteriófago T7 RNA polimerase é um exemplo de um sistema promotor acoplado [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; Tabor et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:1074]. Adicionalmente, um promotor híbrido pode também compreender um promotor de um bacteriófago e uma região do operador de E. coli (publicação EPO no 267.851).


Adicionalmente a uma sequência promotora funcional, também é útil um local de ligação ao ribossoma para a expressão de genes estranhos em procariotas. Em E. coli, o local de ligação ao ribossoma é chamado sequência Shine-Dalgarno (SD) e inclui um códon de iniciação (ATG) e uma sequência com 3 a 9 nucleótidos de comprimento localizada 3 a 11 nucleótidos a montante do códon de iniciação [Shine et al. (1975) Nature 254:34]. Pensa-se que a sequência SD promove a ligação do mRNA ao ribossoma pelo emparelhamento de bases entre a sequência SD e a 3' do rRNA 16S de E. coli [Steiz et al. (1979) "Genetics signals and nucleotide sequences in messenger RNA", em Biological Regulation and Development: Gene Expression (ed. R. F. Goldberger)]. Para a expressão de genes eucariotas e genes procariotas com fracos locais de ligação ao ribossoma [Sambrook et al. (1989) "Expression of cloned genes in Escherichia coli". em Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

Uma molécula de DNA pode ser expressa intracelularmente. Uma sequência promotora pode estar directamente ligada com a molécula de DNA, caso em que o primeiro



aminoácido na extremidade N será sempre uma metionina, que é codificada pelo codão de iniciação ATG. Se desejado, a metionina na extremidade N pode ser clivada da proteína por incubação in vitro com brometo cianogénico ou por incubação in vivo ou in vitro com uma peptidase N-terminal para a metionina bacteriana (Publicação EPO no 219.237).

As proteínas de fusão fornecem uma alternativa à expressão directa. Tipicamente, a sequência de DNA que codifica a porção N-terminal de uma proteína bacteriana endógena, ou outra proteína estável, é fundida na extremidade 5' das sequências codificadoras heterólogas. Além da expressão, esta construção fornecerá a fusão de duas sequências de aminoácidos. Por exemplo, o gene celular do bacteriófago lambda pode ser ligado à extremidade 5' de um gene estranho e expresso em bactérias. A resultante proteína de fusão retém preferencialmente um local para o processamento da enzima (factor Xa) para clivar a proteína do bacteriófago do gene estranho [Nagai et al. (1984) Nature 309:810]. As proteínas de fusão podem também ser feitas com sequências dos genes lacZ [Jia et al. (1987) Gene 60:197], trpE [Allen et al. (1987) J. Biotechnol. 5:93; Makoff et al. (1989) J. Gen. Microbiol. 135:11], e Chey [publ. EPO no 324647]. A sequência de DNA na junção das duas sequências de aminoácidos pode ou não codificar um local de clivagem. Um outro exemplo é a proteína ubiquitina de fusão. Uma tal proteína de fusão é feita com uma região da ubiquitina que retém preferencialmente um local para uma enzima de processamento (por exemplo, uma protease específica de processamento da ubiquitina) para clivar a ubiquitina da proteína estranha. Através deste método, a proteína



estranha nativa pode ser isolada [Miller et al. (1989) Bio/Technology 7:698].

Alternativamente, as proteínas estranhas podem também ser secretadas a partir da célula através da criação de moléculas de DNA quiméricas que codificam uma proteína de fusão compreendida de um fragmento da sequência do péptido sinal que fornece a secreção da proteína estranha na bactéria [Patente Norte Americana com o No 4.336.336]. O fragmento da sequência sinal codifica tipicamente um péptido sinal composto de aminoácidos hidrofóbicos que direccionam a secreção da proteína a partir da célula. A proteína é secretada quer para o meio de crescimento (bactérias gram positivas) quer para dentro do espaço periplasmático, localizado entre a membrana interior e exterior da célula (bactérias gram negativas). Preferencialmente existem locais de processamento, que podem ser clivados quer in vivo quer in vitro codificados entre o fragmento do péptido sinal e o gene estranho.

O DNA que codifica a sequência sinal adequada pode ser derivado de genes para proteínas bacterianas secretadas, tal como o gene da proteína da membrana externa (ompA) de E. coli [Masui et al. (1983), em: Experimental Manipulation of Gene Expression; Ghayeb et al. (1984) EMBO J. 3:2437] e a sequência sinal da fosfatase alcalina (phoA) de E. coli [Oka et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7212]. Como exemplo adicional, a sequência sinal do gene da alfa-amilase de várias estirpes de Bacillus pode ser usada para secretar proteínas heterólogas a partir de B. subtilis [Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; Publicação EPO No 244.042].



Tipicamente, as sequências de terminação da transcrição reconhecidas pela bactéria são regiões reguladoras localizadas 3' em relação ao codão stop da tradução, e assim, em conjunto com o promotor, flanqueiam a sequência codificadora. Estas sequências direccionam a transcrição de um mRNA, que pode ser traduzido em polipéptidos codificados pelo DNA. As sequências de terminação da transcrição incluem frequentemente sequências de DNA de cerca de 50 nucleótidos capazes de formar estruturas em forma de loop que ajudam na terminação da transcrição. Exemplos incluem sequências de terminação da transcrição derivadas de genes com fortes promotores, tal como o gene trp em E. coli, bem como outros genes biossintéticos.

Tipicamente, os componentes acima descritos, compreendendo um promotor, uma sequência sinal (se desejada), a sequência codificadora de interesse, e a sequência de terminação da transcrição, são colocados em conjunto na construção de expressão. As construções de expressão são muitas vezes mantidas num replicon, tal como um elemento extracromossómico (por exemplo, plasmídeos) capazes de as manter estavelmente num hospedeiro, tal como uma bactéria. O replicon terá um sistema de replicação, permitindo assim que este seja mantido num hospedeiro procariota quer para expressão quer para clonagem e ampliação. Adicionalmente, o replicon pode ser um plasmídeo de elevado ou baixo número de cópias. Um plasmídeo com um elevado número de cópias terá geralmente um número de cópias entre 5 e 200, e tipicamente cerca de 10 a 150. Um hospedeiro contendo um plasmídeo de elevado número de cópias irá conter preferencialmente pelo menos cerca de 10, e mais




preferencialmente cerca de 20 plasmídeos. Pode ser seleccionado um vector quer de elevado ou baixo número de cópias, dependendo do efeito do vector e da proteína estranha no hospedeiro.

Alternativamente, a construção de expressão pode estar integrada no genoma bacteriano com um vector de integração. Os vectores de integração contêm tipicamente pelo menos uma sequência homóloga ao cromossoma bacteriano que permite ao vector integrar-se. A integração parece resultar de recombinações entre DNA homólogo no vector e o cromossoma bacteriano. Por exemplo, vectores de integração construídos com DNA de várias estirpes de *Bacillus* integram-se no cromossoma do *Bacillus* (Publicação EPO No. 127.328). Os vectores de integração podem também ser compreendidos de sequências de bacteriófagos ou de transposões.

Tipicamente, as construções de expressão de integração e extracromossómicas podem conter marcadores selectivos para permitir a selecção de estirpes bacterianas que foram transformadas. Os marcadores selectivos podem ser expressos em hospedeiros bacterianos e podem incluir genes que conferem resistência à bactéria a fármacos tal como a ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina), e tetraciclina [Davies *et al.* (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32:469]. Marcadores selectivos podem também incluir genes biossintéticos, tal como os das vias biossintéticas da histidina, triptofano e leucina.

Alternativamente, alguns dos compostos acima descritos podem ser colocados em conjunto em vectores de transformação. Os vectores de transformação são tipicamente compostos de um marcador selectivo que é ou mantido no replicon ou desenvolvido



num vector de integração, como descrito acima.

Vectores de expressão e transformação, quer replicons extra-cromossómicos quer vectores de integração, têm sido desenvolvidos para a transformação em muitas bactérias. Por exemplo, foram desenvolvidos vectores de expressão para, inter alia, as seguintes bactérias: *Bacillus subtilis* [Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; Publicações EPO Nos 036.259 e 063.953; PCT WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake et al. (1981) Nature 292:128; Amann et al. (1985) Gene 40:183; Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; Publicações EPO no 036.776, 136.829 e 136.907], *Streptococcus cremoris* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]; *Streptococcus lividans* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655], *Streptomyces lividans* [Patente Norte Americana com o no 4.745.056].

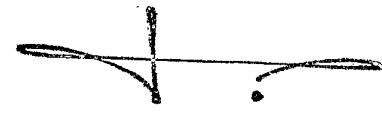
Métodos para introduzir DNA exógeno em hospedeiros bacterianos são bem conhecidos na técnica, e incluem tipicamente quer a transformação da bactéria tratada com  $\text{CaCl}_2$  ou outros agentes, tal como cations divalentes e DMSO. O DNA pode também ser introduzido em células bacterianas por electroporação. Os procedimentos da transformação variam usualmente com as espécies bacterianas a ser transformadas. Ver, por exemplo, [Masson et al. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; Publicações EPO Nos 036.259 e 063.953; PCT WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:949, *Campylobacter*], [Cohen et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127;



Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids", em Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H. W. Boyer e S. Nicosia); Mandel et al (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*, [Chassy et al. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173 *Lactobacillus*]; [Fiedler et al. (1988) Anal. Biochem 170:38, *Pseudomonas*]; [Augustin et al. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203, *Staphylococcus*], [Barany et al. (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlender (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, em: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti e R. Curtiss III); Perry et al. (1981) Infec. Immun. 32:1295; Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti et al. (1987) Proc. 4th Euv. Cong. Biotechnology 1:412. *Streptococcus*].

#### iv. Expressão em leveduras

Os sistemas de expressão em leveduras são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Um promotor de levedura é qualquer sequência de DNA capaz de se ligar à RNA polimerase de levedura e iniciar a transcrição a jusante (3') da sequência codificadora (por exemplo, o gene estrutural) em mRNA. Um promotor terá uma região de iniciação da transcrição que está usualmente colocada proximalmente à extremidade 5' da sequência codificadora. Esta região de iniciação da transcrição inclui tipicamente um local de ligação da RNA polimerase (a "TATA box") e um local de iniciação da transcrição. Um promotor de levedura pode também ter um segundo domínio chamado sequência activadora a



montante (SAM), a qual, se presente, é geralmente distal em relação ao gene estrutural. A SAM permite uma expressão regulada (induzível). A expressão constitutiva ocorre na ausência da SAM. A expressão regulada pode ser ou positiva ou negativa, aumentando ou reduzindo desta forma a transcrição.

A levedura é um organismo fermentador com uma via metabólica activa, e por isso sequências que codificam enzimas na via metabólica fornecem sequências promotoras particularmente úteis. Exemplos incluem, a álcool desidrogenase (ADH) (Publ. EPO nº 284.044), enolase, glucocinase, glucose-6-fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAP ou GAPDH), hexocinase, fosfofrutocinase, 3-fosfoglicerato mutase, e piruvato cinase (PyK) (publ. EPO nº 329 203). O gene de levedura PHO5, que codifica a fosfatase ácida, também fornece sequências promotoras úteis [Myanohara et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1].


Adicionalmente, promotores sintéticos que não ocorrem na natureza também funcionam como promotores da levedura. Por exemplo, sequências SAM de um promotor de levedura podem ser postas em conjunto com a região de activação da transcrição de outro promotor de levedura, criando um promotor híbrido sintético. Exemplos de tais promotores híbridos incluem as sequências reguladoras ADH ligadas à região GAP de activação da transcrição (Patentes Norte Americanas com os Nos. 4.876.197 e 4.880.734). Outros exemplos de promotores híbridos incluem promotores que consistem de sequências reguladoras de qualquer dos genes ADH2, GAL4, GAL10, ou PHO5, combinadas com a região activadora da transcrição de um gene de uma enzima glicolítica tal como o GAP ou PyK (publ. EPO nº 164.556). Além disso, um



promotor de levedura pode incluir promotores de ocorrência natural de origem que não as leveduras, que têm a capacidade de se ligar à RNA polimerase de levedura e iniciar a transcrição. Exemplos de tais promotores incluem, inter alia, [Cohen et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1078; Henikoff et al. (1981) Nature 283:835; Hollenberg et al. (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:119; Hollenberg et al. (1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", em: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (eds. K. M. Timmis e A. Puhler); Mercerau-Puigalon et al. (1980) Gene 11:163; Panthier et al. (1980) Curr. Genet. 2:109].

Uma molécula de DNA pode ser expressa intracelularmente na levedura. Uma sequência promotora pode estar directamente ligada com uma molécula de DNA, caso em que o primeiro aminoácido na extremidade N-terminal da proteína recombinante será sempre uma metionina, que é codificada pelo codão de iniciação ATG. Se desejado, a metionina N-terminal pode ser clivada da proteína por incubação in vitro com brometo cianogénico.

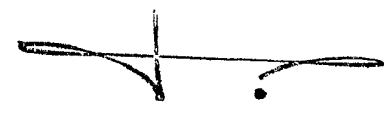
As proteínas de fusão fornecem uma alternativa para os sistemas de expressão em leveduras, bem como para os sistemas de expressão em mamíferos, baculovirus e bactérias. Tipicamente, a sequência de DNA que codifica a porção N-terminal de uma proteína endógena de levedura, ou outra proteína estável, é fundida com a extremidade 5' das sequências codificadoras heterólogas. Durante a expressão, esta construção fornecerá uma fusão de duas sequências de aminoácidos. Por exemplo, o gene da superóxido dismutase (SOD) de levedura ou humano, pode ser ligado



à extremidade 5' de um gene estranho e expresso na levedura. A sequência de DNA na junção das duas sequências de aminoácidos pode ou não codificar um local de clivagem. ver, por exemplo, a Publ. EPO no 196 056. Um outro exemplo é a proteína de fusão ubiquitina. Tal proteína de fusão é feita com a região da ubiquitina que retém preferencialmente um local para uma enzima de processamento (por exemplo, a protease específica de processamento da ubiquitina), para clivar a ubiquitina da proteína estranha. Através deste método, conseqüentemente, as proteínas estranhas nativas podem ser isoladas (ver, por exemplo, PCT WO 88/024066). Este sistema é um sistema preferido para a produção de IGFBP-6.

Alternativamente, as proteínas estranhas podem também ser secretadas da célula para o meio de crescimento através da criação de moléculas de DNA quiméricas que codificam uma proteína de fusão composta de um fragmento da sequência condutora que permite a secreção na levedura da proteína estranha. Preferencialmente, existem locais de processamento codificados entre o fragmento da sequência condutora e o gene estranho que podem ser clivados in vivo ou in vitro. O fragmento da sequência condutora codifica tipicamente um péptido sinal composto de aminoácidos hidrofóbicos que direccionam a secreção da proteína a partir da célula.

O DNA que codifica sequências sinal apropriadas pode ser derivado a partir de genes para proteínas secretadas de levedura, tal como o gene da invertase de levedura (Publicação EPO No 012.873; Publicação JPO No 62.096.086) e o gene do factor A (Patente Norte Americana com o no de série 4.588.684).



Alternativamente, existem sequências condutoras com origem diferente de levedura, tal com uma sequência condutora de interferon, que também possibilitam a secreção em leveduras (Publ. EPO no 060.057).

Uma classe preferida de sequências condutoras da secreção são aquelas que utilizam um fragmento do gene do factor alfa de levedura que contém ambas, a sequência de pré sinal e a região pró. Os tipos de fragmentos do factor alfa que podem ser utilizados incluem a sequência condutora do factor alfa pré-pró no total do comprimento (cerca de 83 resíduos de aminoácidos), bem como sequências condutoras do factor alfa truncadas (tipicamente cerca de 25 a 50 resíduos de aminoácidos) (Patentes Norte Americanas com os Nos 4.546.083 e 4.870.008; Publ. EPO no 324.274). Sequências condutoras adicionais empregando um fragmento da sequência condutora do factor alfa que possibilitam a secreção, incluem sequências condutoras híbridas do factor alfa feitas com uma pré-sequência de uma primeira levedura, mas uma pró-região de um factor alfa de uma segunda levedura. (Ver, por exemplo, PCT WO 89/02463).

Tipicamente, as sequências de terminação da transcrição reconhecidas pela levedura são regiões reguladoras localizadas em 3' em relação ao códon stop da tradução, e assim, em conjunto com o promotor, flanqueiam a sequência codificadora. Estas sequências direccionam a transcrição de um mRNA que pode ser traduzido no polipéptido codificado pelo DNA. Exemplos de sequências de terminação da transcrição e outras sequências de terminação reconhecidas pelas leveduras, incluem as que codificam para as enzimas glicolíticas.



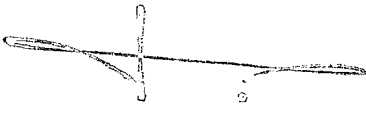
Tipicamente, os componentes acima descritos, compreendendo o promotor, a sequência condutora (se desejada), a sequência codificadora de interesse, e a sequência de terminação da transcrição, são colocados em conjunto na construção de expressão. As construções de expressão são muitas vezes mantidas num replicon, tal como um elemento extracromossômico (por exemplo, plasmídeos), capazes de as manter estavelmente num hospedeiro, tal como leveduras ou bactérias. O replicon pode ter dois sistemas de replicação, permitindo assim que seja mantido, por exemplo, em leveduras para expressão e em hospedeiros procariotas para clonagem e ampliação. Exemplos de tais vectores vai-vem de levedura-bactéria incluem o YEp24 [Botstein et al. (1979) Gene 8:17-24], pCl/1 [Brake et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:4642-4646], e YRp17 [Stinchcomb et al. (1982) J. Mol. Biol. 158:157]. Adicionalmente, um replicon pode ter quer um plasmídeo de elevado ou baixo número de cópias. Um plasmídeo com um elevado número de cópias terá geralmente um número de cópias entre cerca de 5 a cerca de 200, e tipicamente de cerca de 10 a 150. Um hospedeiro contendo um plasmídeo com um elevado número de cópias terá de preferência pelo menos 10, e mais preferencialmente pelo menos 20. Pode ser seleccionado um vector com um elevado ou baixo número de cópias, dependendo do efeito do vector e da proteína estranha no hospedeiro. Ver por exemplo, Brake et al., supra.

Alternativamente, as construções de expressão podem ser integradas no genoma da levedura com um vector de integração. Os vectores de integração contêm tipicamente pelo menos uma sequência homóloga ao cromossoma da levedura que permite ao



vector integrar-se, e preferencialmente contém duas sequências homólogas a flanquear a construção de expressão. A integração parece resultar de recombinações entre DNA homólogos no vector e cromossoma da levedura [Orr-Weaver et al. (1983) Methods in Enzymol. 101:228245]. Um vector de integração pode estar direccionado para um locus específico na levedura através da selecção da sequência homóloga apropriada para a inclusão no vector. Ver Orr-Weaver et al., supra. Uma ou mais construções de expressão podem ser integradas, afectando possivelmente os níveis de proteína recombinante produzida [Rine et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6750]. As sequências cromossómicas incluídas no vector podem ocorrer ou como segmentos simples no vector, que resulta na integração da totalidade do vector, ou dois segmentos homólogos a segmentos adjacentes no cromossoma e flanqueando a construção de expressão no vector, que pode resultar na integração estável de apenas a construção de expressão.

Tipicamente, construções de expressão extracromossómicas e de integração podem conter marcadores selectivos para permitir a selecção de estirpes de leveduras que foram transformadas. Marcadores selectivos podem incluir genes biossintéticos que podem ser expressos no hospedeiro levedura, tal como os genes ADE2, HIS4, LEU2, TRP1, e ALG7, e o gene de resistência G418, os quais conferem resistência nas células de levedura à tunicamicina e ao G418, respectivamente. Adicionalmente, um marcador apropriado selectivo pode também fornecer leveduras com a capacidade de crescerem na presença de compostos tóxicos, tal como metais. Por exemplo, a presença de




CUP1 permite que a levedura cresça na presença de iões cobre [Butt et al. (1987) Microbiol. Rev. 51:351].

Alternativamente, alguns dos componentes acima descritos podem ser postos em conjunto em vectores de transformação. Os vectores de transformação são tipicamente compostos de um marcador selectivo que é ou mantido num replicon ou desenvolvido num vector de integração, como descrito acima.

Vectores de expressão e transformação, quer replicons extracromossómicos quer vectores de integração, têm sido desenvolvidos para a transformação em muitas leveduras. Por exemplo, vectores de expressão têm sido desenvolvidos para, inter alia, as seguintes leveduras: *Candida albicans* [Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142], *Candida maltosa* [Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141]. *Hansenula polymorpha* [Gleeson, et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302], *Kluyveromyces fragilis* [Das, et al. (1984) J. Bacteriol. 158:1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154:737; Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8:135], *Pichia guillermondii* [Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141], *Pichia pastoris* [Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376; Patentes Norte Americanas com os no 4.837.148 e 4.929.555], *Saccharomyces cerevisiae* [Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153:163], *Schizosaccharomyces pombe* [Beach e Nurse (1981) Nature 300:706], e *Yarrowia lipolytica* [Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10:380471; Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10:49].

Métodos para introduzir DNA exógeno em leveduras



hospedeiras são bem conhecidos na técnica, e incluem tipicamente ou a transformação de esferoplastos ou de células intactas de levedura tratadas com cationes alcalinos. Os procedimentos de transformação variam usualmente com a espécie de levedura a ser transformada. Ver, por exemplo, [Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; Candida]; [Gleeson, et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302; Hansenula]; [Das, et al. (1984) J. Bacteriol. 158:1165; [De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154:1165; Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8:135; Kluyveromyces]; [Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; Patentes Norte Americanas com os Nos 4.837.148 e 4.929.555; Pichia]; [Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153:163; Saccharomyces]; [Beach e Nurse (1981) Nature 300:706; Schizosaccharomyces]; [Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10:39; Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10:49; Yarrowia].

g. Produção de Anticorpos para a IGFBP-6

Anticorpos específicos para a IGFBP-6 são produzidos através da imunização de um hospedeiro vertebrado apropriado, por exemplo, coelho, com IGFBP-6 purificada ou derivados polipeptídicos da IGFBP-6, por si só, ou em conjunto com um adjuvante convencional. Usualmente estarão envolvidas duas ou mais imunizações, e o sangue ou baço serão recolhidos uns dias depois da última injeção. Para o antisoro policlonal, as imunoglobulinas podem ser precipitadas, isoladas e purificadas



por uma variedade de técnicas padronizadas, incluindo a purificação por afinidade usando IGFBP-6 ligado a uma superfície sólida, tal como gel ou contas numa coluna de afinidade. Para anticorpos monoclonais, os esplenócitos serão normalmente fundidos com um linfócito imortalizado, por exemplo, uma linha de células mieloides, em condições selectivas para a formação de hibridomas. Os hibridomas podem ser clonados em condições de diluição limite e os seus sobrenadantes verificados para os anticorpos que possuam a especificidade desejada. Técnicas para a produção de anticorpos são bem conhecidas na literatura e são exemplificadas pela publicação Antibodies: A Laboratory Manual (1988) eds. Harlow e Lane, Cold Spring Harbor Laboratories Press, e nas Patentes Norte Americanas com os Nos 4.381.292, 4.451.570, e 4.618.577.

Para ambas as utilizações in vivo de anticorpos para a IGFBP-6 e de anticorpos anti-idiotipo e para uso em diagnóstico, poderá ser preferível usar anticorpos monoclonais. Anticorpos monoclonais anti-partículas virais ou anticorpos anti-idiotipo podem ser produzidos da forma que se segue. O baço ou linfócitos de um animal imunizado são removidos e imortalizados, ou usados para preparar hibridomas por métodos conhecidos pelos especialistas na técnica. Para produzir um hibridoma humano-humano, é seleccionado um dador de linfócitos humano. O vírus Epstein-Barr (VEB) pode ser utilizado para imortalizar linfócitos humanos, ou pode ser utilizado um parceiro de fusão humano para produzir hibridomas humano-humano. A imunização primária in vitro com péptidos pode também ser usada na geração de anticorpos monoclonais humanos. Os anticorpos secretados pelas células




imortalizadas são verificados para determinar os clones que secretam os anticorpos com a especificidade desejada.

h. Métodos de diagnóstico usando antígenos, material genético dos anticorpos.

As composições compreendendo antígenos ou anticorpos do presente invento, bem como o material genético, podem ser usadas em ensaios de diagnóstico. Entre a informação biológica útil que se pode obter, os níveis de proteínas de ligação são excessivos devido à presença de tumores, que resultam num aumento de produção quer de IGF quer de uma das proteínas de ligação IGFBP (dado que as proteínas de ligação são produzidas na presença de excesso de IGF). Adicionalmente, um número de distúrbios conhecidos pode estar relacionado com as concentrações de IGF. Por exemplo, alguns tipos de osteoporoses estão relacionados com os níveis de IGF. Adicionalmente, as proteínas de ligação podem ser usadas na identificação, produção e purificação das IGF produzidas por recombinação. Métodos para detectar a presença da IGFBP-6 compreendem a análise de uma amostra biológica, tal como uma amostra de sangue, de fluido cerebrospinal ou de tumores ou tecido ósseo.

Tipicamente, métodos para detectar analisados como as proteínas de ligação do invento, são baseados em imunoenaios. Tais técnicas são bem conhecidas e não necessitam de ser aqui descritas em detalhe. Exemplos incluem ambas as técnicas de imunoenaios heterogêneos e homogêneos. Ambas as técnicas são baseadas na formação de um complexo imunológico entre a proteína de ligação e o correspondente anticorpo específico. Enaios heterogêneos para a IGFBP-6 usam tipicamente um anticorpo



específico monoclonal ou policlonal, ligado a uma superfície sólida. Os ensaios sandwich são cada vez mais populares. Podem também ser usados ensaios homogêneos, que são realizados em solução sem a presença de uma fase sólida, por exemplo, através da determinação da diferença na actividade enzimática conduzida pela ligação de anticorpos livres a um conjugado enzima--antígeno. Vários ensaios apropriados estão descritos nas Patentes Norte Americanas com os Nos 3.817.837, 4.006.360, 3.996.345.

O reagente da superfície sólida do ensaio acima é preparado por técnicas conhecidas para ligar material proteico a um material de suporte sólido, tal como contas poliméricas, adesivos imersos, ou material de filtração. Estes métodos de ligação incluem geralmente a absorção não específica da proteína ao suporte ou ligação covalente da proteína, tipicamente através de grupos amina livres, para um grupo quimicamente reactivo no suporte sólido, tal como um grupo activo carboxilo, hidroxilo ou aldeído.


Numa segunda configuração de diagnóstico, conhecida como ensaio homogêneo, a ligação do anticorpo ao analisado produz alguma mudança no meio de reacção, a qual pode ser directamente detectada no meio. Os tipos de ensaios homogêneos gerais conhecidos e propostos a partir de agora incluem (a) registadores de marcação spin, em que o anticorpo ligado ao antígeno é detectado por uma mudança da mobilidade registada (alargamento dos picos de desdobramento do spin), (b) registadores fluorescentes, em que a ligação é detectada por uma mudança na eficiência de fluorescência, (c) registadores enzimáticos, em que



a ligação do anticorpo tem efeito nas interações enzima/substrato, e (d) registadores de ligação a lipossomas, em que a ligação leva à lise dos lipossomas e liberta o registador encapsulado. A adaptação destes métodos para a proteína antigénio do presente invento segue os métodos convencionais de preparação de reagentes de ensaios homogéneos.

i. Aplicações de diagnóstico utilizando sondas genéticas

O material genético do invento pode, por si só, ser usado em numerosos ensaios como sondas para o material genético presente em materiais de ocorrência natural. O analisado pode ser uma sequência de nucleótidos que hibrida com uma sonda que compreende uma sequência de (usualmente) pelo menos cerca de 16 nucleótidos consecutivos, usualmente 30 a 200 nucleótidos, até substancialmente a sequência total das sequências ilustradas em cima (sequências de cDNA). O analisado pode ser RNA ou cDNA. A amostra é tipicamente como a descrita na secção anterior. Um resultado positivo é geralmente caracterizado pela identificação de um material genético compreendendo uma sequência homóloga em pelo menos 70% a uma sequência de pelo menos 12 nucleótidos consecutivos da sequência dada aqui, usualmente cerca de pelo menos 80% homóloga a pelo menos cerca de 60 nucleótidos consecutivos dentro das sequências, e pode compreender uma sequência substancialmente homóloga ao comprimento total das sequências. Com o objectivo de detectar um analisado, em que o analisado hibrida com uma sonda, a sonda pode conter um marcador detectável. Sondas que são particularmente úteis para detectar



proteínas de ligação são baseadas em regiões permanentes destas proteínas, particularmente nos aminoácidos 181 a 191 (PNCD) e nos aminoácidos 212 a 215 (CWCV) da BP6. Estes aminoácidos são altamente conservados em todas as proteínas de ligação IGF relacionadas. Apenas a IGFBP-1 tem uma diferença: um N em vez de um D na posição 191.

Um método para ampliação dos ácidos nucleicos alvo, para futura análise por ensaios de hibridação, é conhecido como a reacção de polimerase em cadeia ou técnica de PCR. A técnica de PCR pode ser aplicada para detectar a IGFBP-6 do invento em amostras em que se suspeita da sua existência, usando "primers" de oligonucleótidos separados uns dos outros e baseados nas sequências genéticas aqui descritas. Os primers são complementares às cadeias opostas de uma molécula de DNA de dupla cadeia e estão tipicamente separados por cerca de 50 a 450 nt ou mais (usualmente não mais que 200 nt). Este método tem como consequência a preparação de "primers" de oligonucleótidos específicos e, em seguida, a repetição de ciclos de desnaturação do DNA alvo, a ligação do "primer", e a extensão com uma DNA polimerase, de modo a obter fragmentos de DNA do tamanho esperado baseados no espaçamento do "primer". Os produtos de extensão gerados a partir um "primer" servem como sequências alvo adicionais para outro "primer". O grau de ampliação de uma sequência alvo é controlado pelo número de ciclos que são realizados e teoricamente calculado pela simples fórmula  $2^n$ , em que n é o número de ciclos. Posto isto, a média de eficiência por ciclo atinge de cerca de 65 a 85%, 25 ciclos produzem de 0,3 a 4,8 milhões de cópias da sequência alvo. O método PCR está

descrito em várias publicações, incluindo Saiki et al., Science (1985) 230:1350-1354; Saiki et al., Nature (1986) 324:163-166; e Scharf et al., Science (1986) 233:1076-1078. Ver também as Patentes Norte Americanas com os Nos. 4.683.194; 4.683.195; e 4.683.202.

O invento inclui um método de diagnóstico específico para determinação da IGFBP-6, baseado na ampliação selectiva de fragmentos de DNA que codificam a IGFBP-6. Este método utiliza um par de "primers" de cadeia simples derivados de regiões não homólogas de cadeias opostas de um fragmento de DNA duplete, seleccionado a partir das sequências ilustradas na Figura 1. Estes "fragmentos de primers", que constituem um aspecto do invento, são preparados a partir de fragmentos de IGFBP-6 como descrito acima. O método segue o processo para a ampliação de sequências de ácidos nucleicos seleccionadas, como descrito na Patente Norte Americana com o No. 4.683.202, discutida acima.

j. Ensaio para as propriedades biológicas da IGFBP-6

A propriedade de se ligar a um factor de crescimento semelhante à insulina é uma das actividades biológicas das proteínas do invento. Estas proteínas podem ser convenientemente testadas num ensaio de ligação usando IFG-1 [Rinderknecht, E. e Humbel, R. E., J. Biol. Chem. (1978) 253:2769] ou IGF-II [Rinderknecht, E. e Humbel, R. E., FEBS (1978) 89:283], preferencialmente IGF-II, numa forma marcada, por exemplo, forma iodinatada. Por exemplo, um tal ensaio pode incluir convenientemente a realização de uma electroforese em gel (SDS-PAGE) das proteínas do invento, seguindo-se um western blot do



gel, a posterior incubação das manchas na presença de [ $^{125}\text{I}$ ]IGF-I ou II, a lavagem das manchas para remover IGF-I ou II livre, e a detecção da radioactividade nas manchas.

k. Usos da IGFBP-6

Aplicações terapêuticas das proteínas de ligação do invento incluem o seu uso como agente terapêutico único e o seu uso em combinação com um IGF, sendo preferida a última utilização.

Quando usada em combinação com um IGF, a proteína de ligação do invento é adequada para usar nas indicações acima mencionadas, primariamente como indutor do crescimento, regenerador de tecidos e agente de cura de ferimentos.

Consequentemente, o invento possibilita:

i) a utilização da proteína de ligação do invento em conjunto com o IGF livre ou em combinação fixa, para estimular o crescimento de um sujeito, regeneração de tecido ou órgão ou cura de ferimentos, ou

ii) um método para estimular o crescimento de um sujeito, regeneração de tecido ou órgão ou cura de ferimento num sujeito, que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de ligação do invento em conjunto com uma quantidade terapêuticamente eficaz de um IGF, a um paciente com necessidade de tal tratamento, ou

iii) uma composição farmacêutica para estimular o crescimento do sujeito, regeneração de tecido ou órgão ou cura de ferimento, que compreende uma proteína de ligação do invento em conjunto com um IGF e com um transportador ou diluente




farmaceuticamente aceitável, ou

iv) um pacote contendo formas de dose separadas de uma proteína de ligação do invento e um IGF, em conjunto com as instruções para a mistura ou administração concomitante.

Em associação com um IGF, uma proteína de ligação do invento é de especial interesse para mediar a condrogênese ou hematopoiese. Isto pode ser ilustrado pelos testes que se seguem, de A a C.

A) Um IGF aumenta a formação do osso como indicado, por exemplo, por um aumento da incorporação de [3H]-prolina em proteínas colagénicas e não colagénicas no crâneo de feto de rato. Um efeito sinérgico ocorre quando o IGF é usado na presença de uma proteína de ligação do invento. Culturas de órgãos de tecidos de crâneo de rato são preparadas pela dissecação dos ossos frontal e parietal de fetos de ratos com 21 dias de idade, separados ao longo da sutura sagital e postos em cultura de acordo com o método de Kream et. al. (Endocrinology (1985) 116:296). Uma proteína de ligação ou IGF é adicionada em doses de 10 a 200 ng por ml de cultura. Quando são adicionados em combinação um com o outro, a razão molar é de 1:1. A cultura é efectuada por 24 a 48 horas. Para quantificar a incorporação de [3H]prolina em proteínas de colagénio digeríveis e proteínas não colagénicas, os homogeneizados de osso são digeridos com colagenase bacteriana de acordo com o método de Diegelman R. e Peterkofsky (Dev. Biol. (1972) 28:443) e modificado por Kream et al. (Endocrinology (1985) 116:296).

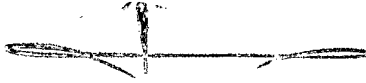
B) Um IGF diminui a reabsorção do osso como indicado por uma diminuição na libertação de [45]Ca a partir do osso. Um



efeito sinérgico ocorre quando um IGF é usado na presença de uma proteína de ligação do invento. O teste tem efeito de acordo com os princípios de Raisz (J. Clin. Invest. (1965) 44:103). Ratos fecundados são injectados subcutaneamente com [45]Ca no décimo oitavo dia de gestação. Um IGF, sózinho ou na presença da proteína de ligação do invento, é injectado numa dose de 10 a 200 ng por animal. A proteína de ligação é adicionada de modo a que a razão molar seja 1:1. No décimo nono dia, os animais são sacrificados, e os fetos são removidos. Os troços mineralizados do rádio e do cúbito são dissecados e colocados em cultura. A reabsorção é quantificada com base na libertação de [45]Ca dos explantes de osso.

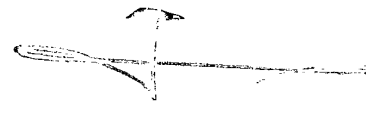
C) As proteínas de ligação IGF do invento, bem como outras proteínas de ligação IGF, potenciam o efeito semelhante à eritropoietina do IGF-I. Isto pode ser demonstrado, em particular, testando o IGF-I, por exemplo, 10 ng/ml de IGF-I, sózinho e em combinação com a proteína de ligação IGF completamente formada da Figura 1, por exemplo, uma alíquota de 50 µl de um sobrenadante derivado de uma cultura de linhas de células CHO que expressam a proteína de ligação completamente formada da Figura 1, num ensaio CFU-E, como descrito em Fagg, B., Roitsch, C. A. Cell. Physiol. (1986) 126:1. Enquanto que o resultado obtido com a proteína de ligação IGF sózinha não é significativamente diferente do controlo, é observado um efeito sinérgico na combinação, quando comparado com o IGF sózinho.

Além disso, a actividade mitogénica de um IGF combinado com uma proteína de ligação do invento pode ser testada da



seguinte forma: a incorporação de [3H] metil-timidina em células CCl 39 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) em cultura é medida como descrito por Plouet et al. Cell. Mol. Biol. (1984) 30:105. Neste ensaio, uma linha celular CCL 39 é colocada numa placa, numa densidade de 40000 células por cúpula em 0,5 ml de meio de cultura MEM (Gibco) contendo 10% de soro fetal de vitelo, 0,1% de penicilina, 0,4% de estreptomicina e 0,5% de fungizona. Após 72 horas de incubação a 37°C numa atmosfera carregada com 5% de CO<sub>2</sub>, as células são lavadas com meio MEM na ausência de soro fetal de vitelo e depois postas em cultura no seu meio durante 20 horas. Neste estado, a cultura de células é confluenta e um IGF ou proteína de ligação ou os dois em conjunto são inoculados cada um com uma dose de 10 a 200 ng por ml de meio de cultura. Quando adicionados em conjunto, a razão molar deve ser 1:1. A amostra teste é incubada a 37°C durante 24 horas e depois é-lhe adicionado 1mCi [3H] metiltimidina em 10 ml de PBS. Após 4 horas de incubação, a incorporação da metiltimidina é interrompida pela lavagem das células com PBS. As células são fixadas com 0,5 ml de ácido tricloroacético (5%) durante 30 min., depois lavadas com água e finalmente lisadas com 0,5 ml de NaOH 0,1 M durante 2 horas a 37°C. 0,5 ml do lisado são transferidos para um frasco de cintilações e misturado com 3 ml de líquido de cintilação para medir a radioactividade b. A proteína de ligação potencia a actividade mitogénica do IGF, embora o nível de radioactividade que é medido quando é utilizada a proteína de ligação sózinha não seja substancialmente diferente do da amostra controlo.

Mais particularmente, uma proteína de ligação do invento, em combinação com o IGF é útil a) para tratar o



hipopituitarismo, o nanismo do tipo Laron, a osteoporose, anemias, complicações especiais a seguir a uma falha renal crónica e deficiência de fígado ou rim, e b) para promover a cura de feridas tal como úlceras e queimaduras ou aquelas que ocorrem em acidentes ou resultantes de uma cirurgia.

Para usar em associação com uma proteína de ligação do invento, o IGF é preferencialmente seleccionado do IGF-I como descrito em Rinderknecht, E. e Humbel, R. E., J. Biol. Chem. (1978) 253:2769, do IGF II como descrito por Rinderknecht, E. e Humbel, R. E., FEBS (1978) 89:283 e qualquer derivado ou fragmento de IGF-I e IGF-II tendo uma actividade de factor de crescimento semelhante à insulina. Mais preferencialmente, é o IGF-II.

Para usar em associação com um IGF, é preferida uma proteína de ligação do invento com 85 a 100% de homologia com a pré IGF-BP ou IGF-BP, como ilustrado na Figura 1.

Quando não associadas com os IGF, as proteínas de ligação do invento têm mais aplicações terapêuticas em qualquer distúrbio fisiológico resultante de uma produção excessiva de IGF livre, por exemplo, cancros produtores de IGF tal como o cancro do peito ou do rim, a diabetes proliferativa que afecta a retina ou crescimento anormal de crianças altas com elevados níveis de IGF livre no soro.

Consequentemente, o invento também fornece:

(i) o uso de uma proteína de ligação do invento para tratar distúrbios fisiológicos resultantes de uma produção excessiva de IGF livre em mamíferos, por exemplo, no corpo humano, por exemplo, cancros produtores de IGF, a diabetes



proliferativa que afecta a retina ou crescimento anormal de sujeitos altos, ou

(ii) um método para tratar distúrbios fisiológicos resultantes de uma produção excessiva de IGF livre, por exemplo, cancros produtores de IGF, diabetes que afecta a retina ou crescimento anormal de sujeitos, que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de ligação do invento a um sujeito com necessidade de tal tratamento, ou

(iii) uma composição farmacêutica para tratar distúrbios fisiológicos resultantes de uma produção excessiva de IGF livre, por exemplo cancros produtores de IGF, diabetes que afecta a retina ou crescimento anormal de sujeitos, que compreende uma proteína de ligação do invento em associação com um transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável, ou

(iv) um método de libertação dos IGF's para órgãos ou tecidos específicos baseado nas diferentes propriedades de ligação da IGFBP-6, como indicado pelos testes biológicos.

Fragmentos de formas mutadas da pre-IGF-BP ou IGF-BP como se mostram na Figura 1 são de particular valor para tratar os distúrbios fisiológicos resultantes de uma produção excessiva de IGF livre no corpo humano.

Uma proteína de ligação do invento, sózinha ou em combinação com um IGF, pode ser administrada por qualquer via convencional apropriada a péptidos, ou, em particular, entericamente, por exemplo, na forma de tabletes ou cápsulas, ou de preferência parentericamente, por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente na forma de injeções ou de infusões. Além



disso, pode também ser usada topicamente, por exemplo, na forma de pomadas ou suspensões quando usados, por exemplo, como agentes de cicatrização de feridas.

Para todas as indicações acima, a dose apropriada irá, evidentemente, depender, por exemplo, da natureza e gravidade do distúrbio a ser tratado e do modo de administração. Por exemplo, resultados satisfatórios podem ser obtidos no tratamento da osteoporose ou anemia com doses diárias de cerca de 0,1 a 40 mg por Kg de peso de corpo, preferencialmente de cerca de 0,5 a cerca de 20 mg por Kg de peso de corpo de proteína de ligação do invento. Em mamíferos grandes, por exemplo humanos, quando indicada a dose diária, será de cerca de 5 mg, convenientemente administrados parentericamente, por exemplo, uma vez por dia. Para a cicatrização de feridas, uma dose diária de cerca de 0,1 a 10 mg de proteína do invento por cm<sup>2</sup> de área ferida, é apropriadamente indicada para mamíferos grandes, por exemplo, humanos. Será convenientemente administrado uma vez ao dia. Quando usadas em combinação com um IGF, a razão molar da proteína de ligação para o IGF é preferencialmente de 0,1:1 a 5:1, mais preferencialmente de 0,5:1 a 2:1, mais preferencialmente 1:1.

Composições farmacêuticas do invento podem ser fabricadas da forma convencional.

Outros usos das proteínas de ligação do invento incluem vários usos na produção de moléculas de IGF por técnicas recombinantes. As proteínas de ligação do invento podem ser usadas para detectar IGF produzido por leveduras na conformação nativa (activa) (como oposto das formas inactivadas). Adicionalmente, as proteínas do invento podem ser usadas como



transportadores (possivelmente na forma de proteínas co-expressas) na produção de IGF. Da mesma forma que as proteínas de ligação estabilizaram o IGF in vivo, espera-se que façam o mesmo in vitro. As proteínas de ligação podem também ser usadas para purificar IGF produzido em leveduras, através da sua ligação a uma superfície sólida (tal como numa cromatografia por afinidade).

Embora o invento tenha sido descrito com referência a configurações particulares, os métodos, a construção, e o seu uso particulares, será evidente para os especialistas na técnica que podem ser feitas várias mudanças e modificações sem que nos afastemos do invento.

### 3. Exemplos

#### Tecidos

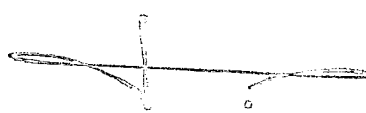
O tecido do osteosarcoma humano foi obtido do Dr. Marshall Urist (Univ. da Califórnia, Los Angeles).

#### Isolamento de RNA

O RNA foi isolado pelo método do tiocianato de guanidina [Chirgwin, J. M. et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299] com modificações [Freeman, G. J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4094-4098]. O RNA poly (A)<sup>+</sup> foi purificado por um único fraccionamento ao longo de celulose oligo(dT) [Aviv, H. e Leder, P. (1972) Proc. Natl Acad. Sci USA 69:1408-1412].

#### Síntese de oligonucleótidos

Adaptadores oligonucleotídicos, sondas e "primers"



foram sintetizados pelo método da fosforamidita com um sintetizador modelo 380A da Applied Biosystems, purificados por uma electroforese em gel de poliacrilamida e retirados os sais em cartuchos SepPak C18 (Waters, Milford, MA).


Um oligonucleótido de 14-mer (5'CCTGTAGATCTCCG 3') e um oligonucleótido de 18-mer (5'ATTCGGAGATCTACAGG-3') foram sintetizados e utilizados como adaptadores da EcoRI para a biblioteca de cDNA construída em ZAPII. O de 14-mer foi fosforilado [Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)], depois aquecido imediatamente a 95°C durante 15 minutos para inactivar a polinucleótido cinase. Os adaptadores também contêm uma local interno para a BglII.

Os dois "primers" PCR de consenso usados para identificar a BP6 foram um "primer" com sentido consistindo de uma mistura de 32 de 24-mer (5'AGATCTGAATTCGCCXAA (C/T)TG(C/T)(A/G)A-3') e primer sem sentido consistindo de uma mistura de 16 de 25-mer (5' AGATCTAAGCTTCXAC(A/G)CACCA(A/G)CA 3'), em que X denomina todos os quatro desoxinucleótidos. Os locais EcoRI e HindIII foram incluídos nos "primers" com e sem sentido, respectivamente, para permitir a subclonagem de produtos da PCR em vectores de sequência M13.


As sondas BP6 usadas para verificar a biblioteca de cDNA eram dois de 19-mer, (5' GCAAAGGATTCTACAAGAG 3') e (5' CAAACCTTCCCGTGGCCGC 3').

#### Ampliação PCR

As reacções PCR foram realizadas com um kit PCR (Perkin



Elmer Cetus) de acordo com as instruções do fornecedor, usando os "primers" PCR descritos acima a concentrações finais de 8 M. O cDNA modelo foi sintetizado a partir de 2,5 g de osteosarcoma humano (Ost2) RNA poly (A)<sup>+</sup>. As condições de síntese do cDNA foram idênticas às da síntese da primeira cadeia do cDNA (ver construção de uma biblioteca de cDNA). O cDNA foi fraccionado num Biogel A-15m, recuperado por precipitação em etanol e ressuspenso em 100 l de água esterilizada. Foi usado 1 l de modelos de cDNA para a reacção PCR. Foram realizados 35 ciclos de PCR num ciclizador térmico de DNA Perkin Elmer Cetus. Os primeiros 10 ciclos consistiram numa etapa de desnaturação de 1 minuto a 94°C, uma etapa de 1 minuto de hibridação a 33°C, e 1 minuto de etapa de extensão a 33°C. Os 25 ciclos seguintes consistiram de uma etapa de desnaturação de 1 minuto a 94°C, uma etapa de hibridação de 1 minuto a 55°C e uma etapa de extensão de 1 minuto a 72°C. A etapa de extensão final do último ciclo foi de 7 minutos. A amostra foi extraída uma vez com fenol/clorofórmio/isoamilalcoól (1:1:0,04), uma vez com clorofórmio/isoamilalcoól (24:1) e recuperado por precipitação em etanol. O DNA produto da PCR foi depois incubado durante 20 minutos a 37°C com 10 unidades de DNA polimerase I, fragmento Klenow em Tris-HCl 10 mM a pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 50 mM, ditiotreitól 1 mM e dATP, dGTP, dTTP e dCTP 40 M cada. A amostra foi extraída como acima, recuperada por precipitação com etanol, digerida com EcoRI e Hind III, e fracionada por electroforese em gel de 7% de acrilamida, 1 X TBE (Tris/borato EDTA). O DNA com migração entre 80-100 pares de bases foi excisado do gel; eluído passivamente durante 16 horas, com agitação suave, em Tris-HCl 10




mM, pH 7,5, EDTA 1mM, purificado pela passagem ao longo de uma coluna elutip-D como descrito pelo fornecedor (Schleider e Schuell), ligado a um local de corte da EcoRI e HindIII no vector de sequência M13 (mp18) e introduzido na estirpe DH5αF' de E. coli.

#### Construção da biblioteca de cDNA

Uma biblioteca de cDNA de osteosarcoma humano/ZAPII foi construída a partir do RNA poly(a)<sup>+</sup> de osteosarcoma humano, como descrito por Zapf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:14892-14898. Foi obtida uma biblioteca de  $1,75 \times 10^7$  clones recombinantes independentes.

#### Verificação da biblioteca de cDNA

Aproximadamente 300.000 fagos recombinantes da biblioteca de cDNA de Ost4 foram plaqueados (50.000 fagos/ placa com 137 mm de diâmetro) em E.coli BB4 e cresceram por 5-6 horas a 37°C. Os fagos foram transferidos para filtros de nitrocelulose (Millipore, HAFT 137), processados [Benton, W. D. e Davies, R. W. (1977) Science 196:180-182] e verificados com duas sondas BP6. As sondas foram marcadas com a polinucleótido cinase de T4 e [32P]ATP [Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) para uma actividade específica de  $1-2 \times 10^8$  cpm/g. Os filtros foram pré-hibridizados durante 1-2 horas a 37°C como descrito por Zapf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:14892-14898. Foi adicionada uma sonda marcada a uma concentração de  $10^6$  cpm/ml e a hibridização continuou durante a noite a 37°C com suave



agitação. Os filtros foram lavados em 2XSSC (1XSSC= cloreto de sódio 0,15 M/ citrato de sódio 0,015 M, pH 7), SDS 0,1% a 50°C e expostos durante a noite a -80°C a películas Kodak XAR-2 com um écran intensificado Du Pont Lightning Plus. As áreas das placas com sinais duplicados foram repicadas, replicadas e novamente verificadas até se obterem placas puras.

#### Isolamento, subclonagem e sequenciação de plasmídeos

Os plasmídeos "Bluescript" SK(-) contendo inserções de cDNA de BP6 foram libertados da ZAP pelo protocolo de salvamento/excisão M13 descrito pelo fornecedor (Stratagene). O DNA do plasmídeo foi isolado pelo método da lise alcalina [Maniatis, T. et. al. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]. As inserções foram excisadas do vector Bluescript SK(-) pela digestão BglIII ou EcoRI e fraccionadas por electroforese em gel de agarose. As inserções foram retiradas do gel e eluidas durante 12 horas com suave agitação em Tris-hidrocloreto 10 mM, pH 7,5, EDTA 1mM (TE), purificados numa coluna elutip-D (ver acima) e subclonado no vector de sequência M13 [Yanish-Perron, C. et. al. (1985) Gene 33:103-119]. A sequenciação do DNA foi realizada pelo método de terminação da cadeia didesoxi [Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467] usando "primers" M13 bem com "primers" internos específicos. As regiões ambiguas foram resolvidas usando 7-deaza-2-deoxiguanosina-trifosfato [Barr, P. J. et al. (1986) Biotechniques 4:428-432] e sequenase (US Biochemicals).



### Análises Northern Blot

O RNA poly(A)<sup>+</sup> foi fraccionado em gel de agarose 1,4% na presença de formaldeído [Lehrach, H. et al (1977) Biochemistry 16:4743-4751], transferido directamente para a nitrocelulose, e processado como descrito [Thomas, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205]. Os filtros foram hibridizados com a inserção de cDNA purificado de BP6.1 como descrito acima (verificação da biblioteca de cDNA). Os filtros foram lavados duas vezes durante 20 minutos em 0,1XSSC, 0,1% SDS a 65°C. As sondas de cDNA foram marcadas como descrito [Thomas, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205] para uma actividade específica de  $2 \times 10^9$  cpm/mg.

### Resultados

#### Identificação e clonagem da BP6

Uma comparação da sequência de aminoácidos das cinco IGFBP humanas conhecidas revelou um elevado grau de homologia nas regiões terminais NH<sub>2</sub>- e COOH-. A porção mais longa de aminoácidos idênticos em todos os cinco resíduos de BP em duas áreas da terminação COOH- consistindo de três aminoácidos Pro-Asn-Cys e quatro aminoácidos Cys-Trp-Cys-Val. Estes aminoácidos conservados caem numa região das BP que se mostrou ser homóloga a 10 repetições dentro dos dois terços amina terminal da molécula de tiroglobulina.

Numa tentativa de identificar novos BP, foram concebidos "primers" degenerados baseados nestas sequências e a PCR foi realizada usando cDNA de osteosarcoma humano como modelo. A análise das sequências de DNA de oito produtos da PCR conseguiu



uma sequência idêntica à BP2, três idênticas à BP4, três idênticas à BP5 e uma única sequência, que foi designada de IGFBP6, que mostrou uma identidade para a sequência de DNA de 60% e uma identidade de aminoácidos para a BP3 de 76%.


Com base na sequência de DNA da PCR da BP6, foram sintetizadas duas únicas sondas de DNA de BP6 e usadas para verificar uma biblioteca de cDNA de osteosarcoma humano/ZAPII. Dos 300.000 clones recombinantes que foram verificados, foram identificados 12 clones que hibridizaram com ambas as sondas. Cinco clones foram mais purificados e as inserções de cDNA foram analisadas por digestão com as enzimas de restrição BglII e EcoRI e em electroforese em gel de agarose. Os cDNAs caíram em duas classes de tamanho de aproximadamente 1,7 kb e 6 kb, que estão exemplificadas pelos clones 1 e 12, respectivamente.

#### Expressão do mRNA da BP6

A análise northern blot de vários tecidos diferentes usando o clone 1 de cDNA marcado com 32P, confirmou que estas duas classes de tamanho mRNA de BP6 existiam e sugere que os osteoblastos são a principal fonte de mRNA da BP6. Todos os tecidos testados (fígado, rim e cérebro) produziram mRNA da BP6, mas a baixos níveis.

#### Análise da sequência da BP6

O cDNA do clone 1 da BP6 (BP6.1) foi sequenciado e está ilustrado na Figura 1 com a deduzida sequência de aminoácidos. A região amino terminal da BP6 é hidrofóbica e é presumivelmente um péptido sinal. O local de clivagem previsível da peptidase sinal

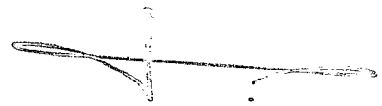


(↓ a) [von Heiji (1986) *Nucleic Acids Research* 11:4683-4690] é a seguir ao aminoácido 15, conseguindo-se uma molécula completamente formada de 257 aminoácidos com um PM de 29018 Da. Não existem locais de N-glicosilação. Existem 18 resíduos de cisteína na BP6, coincidindo todos com os resíduos de cisteína nas BPs (proteínas de ligação) de 1 a 5. Existe algum grau de homologia entre os aminoácidos da BP6 e das outras cinco BPs, que é mais pronunciado nas regiões terminais amina e carboxil das moléculas.

#### 4. Depósitos de material biológico

As células hospedeiras da estirpe HB101 de Escherichia coli transformadas com pBsBP6.1 foram depositadas em 18 de Dezembro de 1990, na American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, e dado o número de acesso 68496. Este depósito será mantido dentro dos termos do tratado de Budapeste respeitante ao reconhecimento internacional de Depósitos de Microorganismos para propósitos de procedimentos das patentes. O número de acesso está disponível na ATCC.

Este depósito é fornecido como mera conveniência aos especialistas na técnica, e não é uma admissão que o depósito seja requerido sob 35 U.S.C 112. A sequência de ácidos nucleicos deste plasmídeo, bem como a sequência de aminoácidos do polipeptídeo nele codificado, estão aqui incorporadas para referência e são controlos na eventualidade de algum conflito nesta descrição. Pode ser necessária uma licença para fazer, usar, ou vender o material depositado, e essa licença não é aqui garantida.



Todas as patentes, pedidos de patentes e referências aqui citadas estão incorporadas para referência.

### REIVINDICAÇÕES

1- Um processo de produção de IGFBP-6 ou de um fragmento da mesma, caracterizado pelo facto de compreender:

- o crescimento de um hospedeiro recombinante contendo uma molécula de DNA recombinante compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando a IGFBP-6 ou uma subsequência da mesma, compreendendo, pelo menos, 10 nucleótidos, sob condições em que a IGFBP-6 ou um fragmento da mesma é expressa pelo hospedeiro; e

- o isolamento da IGFBP-6 expressa ou um fragmento da mesma.

2- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto do hospedeiro ser um microorganismo.

3- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto do hospedeiro ser uma célula eucariota.

4- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o hospedeiro ser um animal não-humano, transgénico.

Lisboa, 8 de Janeiro de 1992

PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
O ADJUNTO





1

FIG. 1

CTCTCCTGCCCCACCCCGAGGTAAAGGGGGCGACTAAGAGAAG

1 Met Val Leu Leu Thr Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Ala Tyr Ala<sup>a</sup>Gly Pro Ala  
 44 ATG GTG TTG CTC ACC GCG GTC CTC CTG CTG CTG GCC GCC TAT GCG GGG CCG GCC

19 Gln Ser<sup>b</sup> Leu Gly Ser Phe Val His Cys Glu Pro Cys Asp Glu Lys Ala Leu Ser  
 98 CAG AGC CTG GGC TCC TTC GTG CAC TGC GAG CCC TGC GAC GAG AAA GCC CTC TCC

37 Met Cys Pro Pro Ser Pro Leu Gly Cys Glu Leu Val Lys Glu Pro Gly Cys Gly  
 152 ATG TGC CCC CCC AGC CCC CTG GGC TGC GAG CTG GTC AAG GAG CCG GGC TGC GGC

55 Cys Cys Met Thr Cys Ala Leu Ala Glu Gly Gln Ser Cys Gly Val Tyr Thr Glu  
 206 TGC TGC ATG ACC TGC GCC CTG GCC GAG GGG CAG TCG TGC GGC GTC TAC ACC GAG

73 Arg Cys Ala Gln Gly Leu Arg Cys Leu Pro Arg Gln Asp Glu Glu Lys Pro Leu  
 260 CGC TGC GCT CAG GGG CTG CGC TGC CTC CCC CGG CAG GAC GAG GAG AAG CCG CTG

91 His Ala Leu Leu His Gly Arg Gly Val Cys Leu Asn Glu Lys Ser Tyr Arg Glu  
 314 CAC GCC CTG CTG CAC GGC CGC GGG GTT TGC CTC AAC GAA AAG AGC TAC CGC GAG

109 Gln Val Lys Ile Glu Arg Asp Ser Arg Glu His Glu Glu Pro Thr Thr Ser Glu  
 368 CAA GTC AAG ATC GAG AGA GAC TCC CGT GAG CAC GAG GAG CCC ACC ACC TCT GAG

127 Met Ala Glu Glu Thr Tyr Ser Pro Lys Ile Phe Arg Pro Lys His Thr Arg Ile  
 422 ATG GCC GAG GAG ACC TAC TCC CCC AAG ATC TTC CGG CCC AAA CAC ACC CGC ATC

145 Ser Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val Lys Lys Asp Arg Arg Lys Lys Leu Thr Gln  
 476 TCC GAG CTG AAG GCT GAA GCA GTG AAG AAG GAC CGC AGA AAG AAG CTG ACC CAG

163 Ser Lys Phe Val Gly Gly Ala Glu Asn Thr Ala His Pro Arg Ile Ile Ser Ala  
 530 TCC AAG TTT GTC GGG GGA GCC GAG AAC ACT GCC CAC CCC CGG ATC ATC TCT GCA

181 Pro Glu Met Arg Gln Glu Ser Glu Gln Gly Pro Cys Arg Arg His Met Glu Ala  
 584 CCT GAG ATG AGA CAG GAG TCT GAG CAG GGC CCC TGC CGC AGA CAC ATG GAG GCT

199 Ser Leu Gln Glu Leu Lys Ala Ser Pro Arg Met Val Pro Arg Ala Val Tyr Leu  
 638 TCC CTG CAG GAG CTC AAA GCC AGC CCA CGC ATG GTG CCC CGT GCT GTG TAC CTG

217 Pro Asn Cys Asp Arg Lys Gly Phe Tyr Lys Arg Lys Gln Cys Lys Pro Ser Arg  
 692 CCC AAT TGT GAC CGC AAA GGA TTC TAC AAG AGA AAG CAG TGC AAA CCT TCC CGT

235 Gly Arg Lys Arg Gly Ile Cys Trp Cys Val Asp Lys Tyr Gly Met Lys Leu Pro  
 746 GGC CGC AAG CGT GGC ATC TGC TGG TGC GTG GAC AAG TAC GGG ATG AAG CTG CCA

253 Gly Met Glu Tyr Val Asp Gly Asp Phe Gln Cys His Thr Phe Asp Ser Ser Asn  
 800 GGC ATG GAG TAC GTT GAC GGG GAC TTT CAG TGC CAC ACC TTC GAC AGC AGC AAC

271 Val Glu OP  
 854 GTT GAG TGA TGGGTCCCCCCCCAACCTTTCCCTCACCCCTCCCACCCCGAGCCCCGACTCCAGCCAG  
 922 CGCCTCCCTCCACCCAGGACGCCACTCATTTTCATCTCATTTAAGGGAAAAATATATATCTATCTATTGA  
 993 GGAAACTGAGGACCTCGGAATCTCTAGCAAGGGCTCAACTTCGAAAATGGCAACAACAGAGATGCAAAAAG  
 1064 CTAAAAAGACACCCCCCCCCCTTTAAAATGGTTTTCTTTTTGAGGCAAGTTGGATGAACAGAGAAGGGAGAG  
 1135 AGGAAGAACGAGAGGAAGAGAAGGGAAGGAAGTGTGTTGTGTAAGAGAGAGAAAGACGAATAGAGTTAGG  
 1206 AAAAGGAAGACAAGCAGGTGGGCAGGAAGGACATGCACCGAGACCAGGCAGGGGCCCACTTTCACGTCCA  
 1277 GCCCTGGCCTGGGGTCGGGAGAGGTGGGCGCTAGAAGATGCAGCCCAGGATGTGGCAATCAATGACACTAT  
 1348 TGGGGTTTCCCAGGATGGATGGTCAGGGGGAGAAAGGAAAAGGCAAAACACTCCAGGACCTCTCCCGGAT  
 1419 CTGTCTCCTCCTCTAGCCAGCAGTATGGACAGCTGGACCCCTGAACCTTCTCTCTTACCTGGGCAGAG  
 1490 TGTTGTCTCTCCCCAAATTTATAAAAACTAAAATGCATTCATTCCTCTGAAAGCAAAAACAAATTCATAAT  
 1561 TGAGTGATATTAATAGAGAGGTTTTTCGGAAGCAGATCTGTGAATATGAAAT