

(11) Número de Publicação: **PT 1568772 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/18 (2007.10) **C07K 14/61** (2007.10)
A61P 5/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1996.09.20	(73) Titular(es): GENENTECH, INC. 1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990 US
(30) Prioridade(s): 1995.09.21 US 537067 1995.09.21 US 537068	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.08.31	(72) Inventor(es): ROSS G. CLARK US HENRY B. LOWMAN US JAMES A. WELLS US KENNETH OLSON US GERMAINE G. FUH US
(45) Data e BPI da concessão: 2010.01.13 071/2010	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

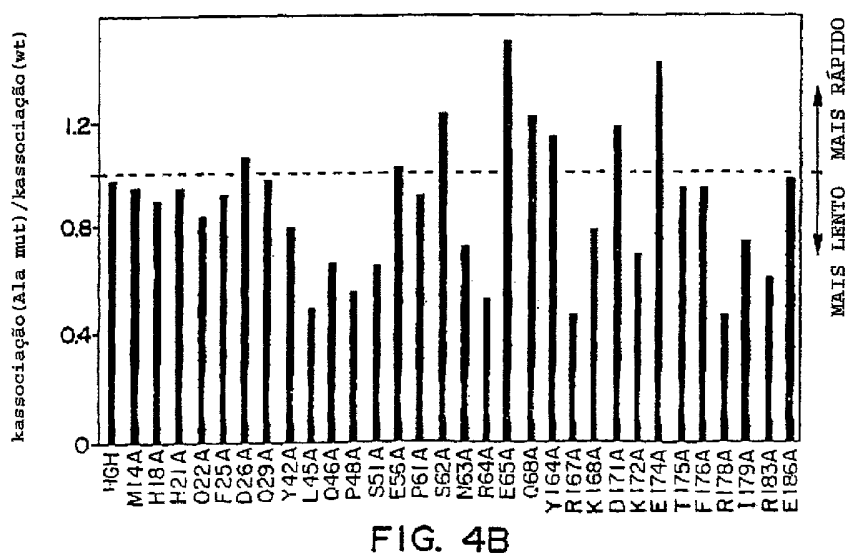
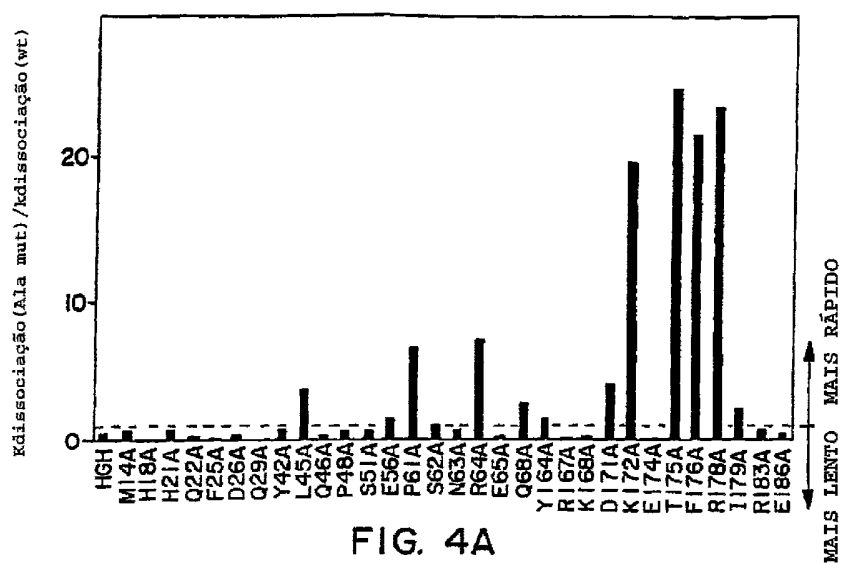
(54) Epígrafe: **VARIANTES DA HORMONA DO CRESCIMENTO HUMANA**

(57) Resumo:

RESUMO

"Variantes da hormona do crescimento humana"

São divulgadas variantes da hormona do crescimento humana possuindo uma maior afinidade para o receptor da hormona do crescimento. São também divulgadas variantes da hormona do crescimento humana conjugadas com um ou mais grupos químicos, tais como polietilenoglicol, que se acredita prolongar a semivida *in vivo* das variantes.



DESCRIÇÃO

"Variantes da hormona do crescimento humana"

Antecedentes do Invento

Campo do Invento

Este invento refere-se a certas variantes da hormona do crescimento e a formas "PEGuiladas" destas, para utilizar como agonistas ou antagonistas da hormona do crescimento humana.

Descrição da Arte Relacionada

A hormona do crescimento humana (hGH) participa em muita da regulação do crescimento e desenvolvimento humano normal. Esta hormona pituitária de 22000 dalton exhibe uma multiplicidade de efeitos biológicos, incluindo crescimento linear (somatogénese), lactação, activação de macrófagos e efeitos semelhantes aos da insulina e diabetogénicos, entre outros. Chawla, *Ann. Rev. Med.* 34: 519 (1983); Edwards *et al.*, *Science* 239: 769 (1988); Isaksson *et al.*, *Ann. Rev. Physiol.* 47: 483 (1985); Thorner e Vance, *J. Clin. Invest.* 82: 745 (1988); Hughes e Friesen, *Ann. Rev. Physiol.* 47: 469 (1985). Estes efeitos biológicos derivam da interacção entre hGH e receptores celulares específicos. A deficiência da hormona do crescimento em crianças conduz a nanismo, que foi tratado com sucesso durante mais de uma década através de administração exógena de hGH. Existe também interesse na antigenicidade de hGH para distinguir entre formas genéticas e modificadas pós-tradução de hGH (Lewis, *Ann. Rev. Physiol.* 46: 33 [1984]), para caracterizar qualquer resposta imunológica a hGH quando esta é administrada clinicamente e para quantificar os níveis de hormona em circulação.

hGH é um membro de uma família de hormonas homólogas que inclui lactogénios placentários, prolactinas e outras variantes genéticas e da espécie da hormona do crescimento. Nichol *et al.*, *Endocrine Reviews* 7: 169 (1986). A hGH é invulgar entre estes por exhibir uma ampla especificidade de espécie e por se ligar ao receptor somatogénico (Leung *et al.*, *Nature* 330: 537 [1987]) ou da prolactina (Boutin *et al.*, *Cell*

53: 69 [1988]) clonado. O gene clonado para hGH foi expresso numa forma segregada em *E. coli* (Chang *et al.*, *Gene* 55: 189 [1987]) e as suas sequências de ADN e de aminoácidos foram relatadas. Goeddel *et al.*, *Nature* 281: 544 (1979); Gray *et al.*, *Gene* 39: 247 (1985). O padrão de dobragem tridimensional para a hormona do crescimento suína (pGH) foi relatado a resolução e refinação moderadas. Abdel-Meguid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6434 (1987). O receptor e os epítomos do anticorpo de hGH foram identificados através de mutagénese por pesquisa com homólogos e mutagénese por pesquisa com alanina tal como descrito no pedido prioritário a este pedido e em Cunningham *et al.*, *Science* 243: 1330-1336 (1989) e Cunningham e Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989).

Existe um grande número de estruturas de alta resolução que mostram os detalhes moleculares de interfaces proteína-proteína (para revisões, ver Argos, *Protein Eng.* 2: 101-113 [1988]; Janin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 204: 155-164 [1988]; Miller, *Protein Eng.* 3: 77-83 [1989]; Davies *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 59: 439-473 [1990]). Estas definem os resíduos de contacto, mas não a energética para eles nem mostram como ocorre a atracagem. Uma compreensão abrangente do papel dos resíduos de contacto que afectam a associação e dissociação é fundamental para os processos de reconhecimento molecular e é importante em termos práticos para uma racional concepção da proteína e de fármacos.

Talvez o complexo hormona-receptor melhor caracterizado seja aquele entre hGH e o domínio extracelular do seu receptor (hGHbp). Para uma revisão, ver Wells e De Vos, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22: 329-351 (1993). A análise estrutural e mutacional de alta resolução (Cunningham e Wells *supra*; Cunningham *et al.*, *Science* 254: 821-825 [1991]) e a análise estrutural (De Vos *et al.*, *Science* 255: 306-312 [1992]) mostrou que uma molécula de hGH se liga a duas moléculas de receptor sequencialmente utilizando locais distintos na hormona, chamados Locais 1 e 2.

Foram identificados vários mutantes de ocorrência natural da hGH. Estes incluem hGH-V (Seeberg, *DNA* 1: 239 (1982); Pat. U.S. N^{os} 4446235, 4670393 e 4665180) e hGH 20K contendo uma deleção dos resíduos 32-46 de hGH. Kostyo *et al.*, *Biochem.*

Biophys. Acta 925: 314 (1987); Lewis *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253: 2679 (1978).

Um investigador relatou a substituição da cisteína na posição 165 em hGH por alanina para desfazer a ligação dissulfureto que existe normalmente entre Cys-53 e Cys-165. Tokunaga *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 153: 445 (1985). Esta substituição simples produziu um mutante que aparentemente manteve a estrutura terciária de hGH e foi reconhecido pelos receptores de hGH.

Outro investigador relatou a síntese *in vitro* de hGH num suporte sólido de resina. O primeiro relatório deste investigador divulgou uma sequência incorrecta de 188 aminoácidos para hGH. Li *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 88: 2050 (1966); Pat. U.S. N° 3853832. Um segundo relatório divulgou uma sequência de 190 aminoácidos. Pat. U.S. N° 3853833. Esta última sequência também está incorrecta. Em particular, hGH tem uma glutamina adicional a seguir à posição 68, um ácido glutâmico em vez de glutamina na posição 73, um ácido aspártico em vez de asparagina na posição 106 e uma asparagina em vez de ácido aspártico na posição 108.

Para além do antecedente, foram relatados interferões híbridos que têm a ligação alterada a um determinado anticorpo monoclonal. Camble *et al.*, "Properties of Interferon- α 2 Analogues Produced from Synthetic Genes" em Peptides: Structure and Function, Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium, Deber *et al.*, eds., (Pierce Chemical Co., Chicago, Ill., 1985), págs. 375-384. Tal como aqui divulgado, os resíduos de aminoácidos 101-114 do interferão α -1 ou os resíduos 98-114 do interferão γ foram substituídos no interferão α -2. O interferão α -2 liga-se ao anticorpo monoclonal NK-2, enquanto que o interferão α -1 não. Esta região em particular no interferão α -2 foi aparentemente escolhida devido a 7 das 27 diferenças de aminoácidos entre o interferão α -1 e α -2 se situarem nesta região. Os híbridos assim obtidos tinham tal como relatado uma actividade substancialmente reduzida com o anticorpo monoclonal NK-2. Quando testados quanto a actividade antiviral, tais híbridos demonstraram actividade antiviral em igualdade de condições

com a actividade do interferão α -2 de tipo selvagem. Foram também relatadas substituições de secções menores dentro destas regiões. Foi também proposta a substituição sequencial de grupos de 3 a 7 resíduos de alanina. No entanto, foi apenas divulgado um análogo [Ala-30,32,33] IFN- α 2.

Foram também relatados a substituição de alanina dentro de um pequeno fragmento peptídico de lisozima da clara de ovo de galinha e o efeito de tais substituições na estimulação de células 2A11 ou 3A9. Allen *et al.*, *Nature* 327: 713-715 (1987).

Outros relataram que as propriedades de ligação podem ser modificadas através de substituição de unidades inteiras de estrutura secundária incluindo voltas de ligação ao antigénio (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 [1986]) ou hélices de reconhecimento de ADN. Warton *et al.*, *Nature* 316: 601-605 (1985).

Foi mostrada a estrutura da hormona do crescimento bovina (bGH) com metionilo amino-terminal contendo uma sequência inserida de hGH incluindo a histidina 18 e a histidina 21. Pat. U.S. N° 4880910. Variantes adicionais de hGH estão descritas nos pedidos prioritários para este pedido e nos N°s de Série U.S. co-pendentes 07/715300 apresentado a 14 de Junho de 1991 e 07/743614 apresentado a 9 de Agosto de 1991, e WO 92/09690 publicado a 11 de Junho de 1992. Estão também divulgadas variantes de hGH (WO 93/00109 publicado a 7 de Janeiro de 1993) possuindo a porção GH covalentemente ligada a polietilenoglicol (PEG) num ou mais aminoácidos, incluindo aqueles em que a molécula de PEG se liga à lisina na posição 41.

Estão também relatadas variantes da hGH em WO 92/21029 publicado a 26 de Novembro de 1992, que divulga o dímero complexo de 1:2 entre GH e duas moléculas de receptor. A variante é um ligando polipeptídico monomérico que compreende na sua conformação nativa quatro hélices alfa anfipáticas e que se liga ao seu receptor através de dois locais por ordem sequencial. Esta variante compreende uma mutação introduzida no local 1 ou no local 2, desde que quando o ligando é GH, estejam mutados pelo menos dois resíduos, cada um no terminal N a cerca de 15 resíduos da hormona de tipo selvagem

e na hélice C, ou o local 1 esteja mutado de forma a aumentar a afinidade do ligando para o seu receptor no local 1.

Foi anteriormente mostrado que pode ser utilizada apresentação fágica monovalente (Bass *et al.*, *Proteins* 8: 309-314 [1990]) para melhorar a afinidade do Local 1 na hGH para a hGHbp. Lowman *et al.*, *Biochemistry* 30: 10832-10838 (1991). Foram produzidas melhorias modestas na afinidade de ligação (3 a 8 vezes mais forte que a hGH de tipo selvagem) através da selecção de três bibliotecas independentes cada uma mutada em quatro codões diferentes no Local 1. Um mutante de hGH com uma afinidade de ligação no Local 1 ligeiramente aumentada e bloqueado na sua capacidade para se ligar ao Local 2 foi um melhor antagonista do receptor de hGH que apenas o mutante do Local 2. Fuh *et al.*, *Science* 256: 1677-1680 (1992). Seria desejável melhorar mais a afinidade do Local 1 para obter um antagonista ainda melhor que possa ter utilidade no tratamento de condições de excesso de GH tais como acromegalia.

Melhorias adicionais na afinidade do Local 1 poderiam ser obtidas através de mutação de mais resíduos por biblioteca. No entanto, não era praticável gerar transformantes suficientes para assegurar que todas as combinações possíveis de resíduos estavam representadas quando eram tornados aleatórios simultaneamente mais de cerca de cinco codões. Lowman e Wells, *Methods: Companion Methods Enzymol.* 3: 205-216 (1991). Mutações nas interfaces proteína-proteína exibem normalmente efeitos aditivos após ligação. Wells, *Biochemistry* 29: 8509-8517 (1990).

É desejável obter-se melhorias muito maiores na afinidade. Foi divulgado que os resíduos de lisina de hGH e bGH estão envolvidos na interacção de hGH e bGH com receptores somatotróficos, com a relação estrutura-função implicando particularmente os resíduos de lisina ou arginina nas posições 41, 64, 70 e 115. Martal *et al.*, *FEBS Lett.* 180: 295-299 (1985). Os resíduos de lisina foram quimicamente modificados através de metilação, etilação, guanidinação e acetimidinação, resultando em reduzida actividade através de ensaio de radio-receptor.

A eficácia *in vivo* de hGH e das variantes de hGH é determinada, em parte, através da afinidade pelo receptor de hGH e pela taxa de eliminação da circulação. A semivida *in vivo* de determinadas outras proteínas terapêuticas foi aumentada através da conjugação das proteínas com PEG, o que é designado "PEGuilação". Ver, p. ex., Abuchowski et al., *J. Biol. Chem.* 252: 3582-3586 (1977). PEG é tipicamente caracterizado como um polímero não imunogénico sem carga com três moléculas de água por monómero de óxido de etileno. Crê-se que PEG atrase a eliminação renal proporcionando maior volume hidrodinâmico nas proteínas "PEGuiladas". Maxfield et al., *Polymer* 16: 505-509 (1975). Num estudo, Katre e colaboradores (Knauf, M.J. et al., *J. Biol. Chem.* 363: 15064-15070 [1988]; Goodson, R.J. & Katre, N.V., *Bio/Technology* 8: 343-346 [1990]) mostraram que a semivida *in vivo* de PEG-interleucina-2 aumentou com um peso molecular eficaz. Adicionalmente, foi relatado que a "PEGuilação" reduz a imunogenicidade e toxicidade de certas proteína terapêuticas. Abuchowski et al., *J. Biol. Chem.* 252: 3578-3581 (1977).

Em WO 92/21029 divulga-se que as hormonas do crescimento formam complexos 1:2 com os seus receptores em que um primeiro local do ligando, local 1, se liga a um receptor e um segundo local do ligando, local 2, se liga a um segundo receptor. Este documento divulga adicionalmente um número de resíduos de aminoácido que são relevantes para a ligação da hormona do crescimento aos receptores.

Sumário do Invento

O presente invento proporciona uma variante da hormona do crescimento humana (hGH) incluindo o seguinte conjunto de substituições de aminoácidos: H18D, H21N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T.

Estas substituições aumentam a afinidade de ligação para com o receptor de hGH do Local 1. Uma variante de hGH incluindo o conjunto de substituições de aminoácidos actua como agonista de hGH na ausência de uma modificação adicional que desfaz a ligação ao receptor de hGH no Local 2.

A substituição de um aminoácido diferente em G120 é uma modificação que desfaz a ligação ao Local 2. Em concordância, uma variante de hGH incluindo uma substituição de aminoácido em G120 actua como um antagonista de hGH. O presente invento proporciona variantes de hGH em que uma substituição de aminoácido G120 é combinada com um dos conjuntos de substituições de aminoácidos do Local 1. Assim, numa concretização, uma variante de hGH inclui o seguinte conjunto de substituições de aminoácidos:

H18D, H21N, G120K, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T (daqui em diante a "variante B2036")

Outros aspectos do presente invento incluem sequências de ácido nucleico, vectores, células hospedeiras e processos para expressão destas variantes de hGH.

O invento inclui também variantes de hGH conjugadas com um ou mais grupos químicos que aumentam o peso molecular da variante, tal como determinado através de espectrometria de massa (daqui em diante "peso molecular real"), até pelo menos cerca de 40 quilodaltons. Numa concretização, uma variante de hGH é conjugada com um ou mais polióis, tais como polietilenoglicol (PEG). É também proporcionado um método de produção de uma variante de hGH conjugada com PEG.

Outro aspecto do invento é um método para inibição da acção da hormona do crescimento num paciente compreendendo a administração ao paciente de uma quantidade eficaz de uma variante de hGH antagonista do presente invento.

Breve Descrição dos Desenhos

As Figuras 1A e 1B mostram a reacção (Fig. 1A) e a cinética (Fig. 1B) para a ligação da hormona do crescimento humana (hGH) ou (G120R)hGH ao (S237C)hGHbp conjugado com o biossensor BIAcore™. O (S237C)hGHbp foi imobilizado na matriz de tiol-dextrano (Fig. 1A) a um nível de 1220 RU, o que corresponde a 1,2 ng/mm². No exemplo de perfil de ligação (Fig. 1B), hGH (símbolos vazios) ou (G120R)hGH (símbolos a cheio) foi injectada a concentrações saturantes (>200 nM) para acompanhar a associação e estabelecer a quantidade limitante de hormona ligada a partir da qual foi calculada uma

estequiometria. Após saturação, a volta do injector foi mudada para tampão para acompanhar a dissociação (indicada pela seta).

As Figuras 2A e 2B mostram a reacção (Fig. 2A) e a cinética (Fig. 2B) para a ligação de hGH (símbolos vazios) ou (G120R)hGH (símbolos a cheio) ao (S201C)hGHbp conjugado com o biossensor BIAcore™. O (S201C)hGHbp foi imobilizado a um nível de 1480 RU (1,48 ng/mm²) no biossensor. As condições de ligação e perfis são análogos aos das Fig. 1A e 1B.

A Figura 3 mostra a correlação entre a alteração na energia livre de ligação ($\Delta\Delta G_{(\text{mut-wt})}$) calculada para mutantes de alanina de hGH relativamente a hGH de tipo selvagem (wt) quando formam um complexo de 1:1 com o hGHbp a partir dos dados obtidos através de RIA (eixo dos yy) ou biossensor BIAcore™ (eixo dos xx). Os valores foram tomados da Tabela 2.

As Figuras 4A e 4B mostram a mudança relativa na taxa de dissociação (*off*) (Fig. 4A) ou na taxa de associação (*on*) (Fig. 4B) para mutantes de alanina nos resíduos de contacto. Os dados são tomados da Tabela 2.

As Figuras 5A e 5B mostram a relação entre a alteração na afinidade de ligação após substituição da alanina e a alteração na área superficial oculta (Å²) (Fig. 5A) ou o número de contactos de van der Waals (Fig. 5B) para os átomos em contacto com as cadeias laterais para além do carbono β . Os círculos fechados são para resíduos ocultos na interface que fazem ligações de hidrogénio ou pontes salinas com o receptor no Local 1 e os círculos abertos são para resíduos que não o fazem. Os dados são representados a partir da Tabela 2.

As Figuras 6A, 6B e 6C mostram uma comparação dos epítomos de ligação ao receptor definidos através de mutagénesse por pesquisa com alanina, estrutura cristalina por raios X ou apresentação fágica, respectivamente.

A Fig. 6A mostra o epítipo funcional do local 1 de hGH. Os resíduos envolvidos na ligação ao receptor, de acordo com mutagénesse por pesquisa com alanina, são mostrados num modelo desenhado de hGH, derivado da estrutura cristalina de

hGH(hGHbp)₂. de Vos *et al.*, *supra*. Os efeitos das substituições de alanina (ou substituições de Gln no caso de K41) são mostrados com base em medições da cinética por BIAcore™, excepto para os locais M14, H21, F54, E56, I58, S62, N63 e Y164. Nestes locais, os dados de BIAcore™ não estavam disponíveis ou indicavam um efeito desprezível na ligação e assim o efeito mostrado baseia-se nos dados de RIA. A alteração na energia livre de ligação ($\Delta\Delta G$) foi calculada como $-RT \ln[K_d(\text{mutante Ala})/K_d(\text{hGH})]$. As esferas negras mostram substituições de alanina que melhoraram a ligação ($\Delta\Delta G = -1$ a $-0,5$ kcal/mol). As quatro esferas brancas de tamanho crescente denotam substituições de alanina que reduziram a energia de ligação em $+0,5$ a $1,0$ kcal/mol, $+1,0$ a $1,5$ kcal/mol, $+1,5$ a $2,0$ kcal/mol, ou $+2,0$ a $2,5$ kcal/mol, respectivamente.

A Fig. 6B é o epítopo estrutural do local 1 de hGH. As quatro esferas brancas de tamanho crescente representam uma alteração na área acessível ao solvente de -20 a 0 \AA^2 , 0 a 20 \AA^2 , 20 a 40 \AA^2 ou 40 a 60 \AA^2 , respectivamente, em cada resíduo após substituição de alanina, tal como calculado a partir da estrutura cristalina de raios X de hGH(hGHbp)₂.

A Fig. 6C denota a conservação de resíduos de hGH em bibliotecas fágicas tornadas aleatórias. Os resíduos que foram tornados aleatórios, quatro posições de cada vez, em bibliotecas de hGH apresentadas por fagos são mostrados: hélice-1 [F10, M14, H18, H21]; mini-hélice-1 [K41, Y42, L45, Q46]; Volta-A [F54, E56, I58, R64]; hélice-4A [K172, E174, F176, R178]; hélice-4B [R167, D171, T175, I179]. A fracção de resíduos de hGH de tipo selvagem verificada em cada posição após selecção de ligação a hGHbp [dados aqui relatados e em Lowman *et al.*, *supra*] está indicada pelo tamanho das esferas negras: A esfera negra mais pequena é conservada em 0-10%, a segunda maior é conservada em 10-25%, a seguinte maior é conservada em 25-50% e a maior é conservada em >50%.

A Fig. 7 mostra a estratégia para combinar mutações derivadas de fagos que aumentam a afinidade de ligação ao receptor. Os melhores seleccionados são mostrados com as vezes de aumento da afinidade sobre o tipo selvagem. O número de mutações em relação ao tipo selvagem verificado em cada uma

destas variantes é também mostrado (p.ex., 4 muts.). As bibliotecas tornadas aleatórias em quatro codões cada na hélice-1, hélice-4, mini-hélice-1 ou na volta que une as hélices 1 e 2, foram seleccionadas separadamente. Duas mutações (E174S/F176Y) identificadas na Hélice-4a, foram utilizadas como fundo para mais aleatorização e selecção noutros locais da hélice-4 (Hélice-4B; Lowman et al., *supra*). As mutações identificadas na Hélice-1 e Hélice-4b foram combinadas para produzir a variante BD; as mutações na Mini-hélice-1 e Volta-A foram combinadas para produzir a variante 852b. Finalmente, as mutações destas duas variantes foram combinadas para produzir a variante 852d.

As Figuras 8A, 8B e 8C representam a relação entre o epítipo estrutural de hGH, o epítipo derivado de fagos e as variantes evolutivas, respectivamente. O logaritmo natural da frequência com a qual os resíduos de hGH de tipo selvagem surgem nos bancos de hGH-fagemídeo (Lowman et al., *supra*) escolhidos para ligação ao receptor é mostrado no eixo dos xx. Os dados das bibliotecas Combinatórias não foram incluídos. Foi escolhida a escala logarítmica para comparação com as áreas superficiais ocultas. Os resíduos M14, H18, K41, Q46, R167 e E174 não aparecem neste gráfico, porque não se verificaram resíduos de tipo selvagem entre nenhuma das bibliotecas seleccionadas.

A Fig. 8A representa uma comparação com a estrutura de raios X de hGH(hGHbp)₂. Está representada a área da cadeia lateral dos resíduos de hGH ocultados pela ligação ao receptor-1 (área acessível ao solvente de: [hGH livre] - [complexo hGH-hGHbp]).

A Fig. 8B representa os resultados da apresentação fágica e da mutagénesse por pesquisa com alanina. O efeito funcional das substituições de Ala em hGH é representado como $\ln [K_d(\text{mutante Ala})/k_d(\text{hGH})]$. Os dados da ligação foram tomados a partir de medições do biossensor BIAcoreTM, excepto onde os dados da cinética não estavam disponíveis. Para estes resíduos de não contacto (F10, F54, I58), foram utilizados os valores para K_d obtidos a partir de ensaios de radioimunoprecipitação. Cunningham et al., 1989, *supra*.

A Fig. 8C denota conservação de resíduos entre variantes evolutivas. As sequências de aminoácidos (GenBank, vol. 75, Fev. de 1993) de hormonas do crescimento de macaco, porco, elefante, *hamster*, baleia, alpaca, raposa, cavalo, ovelha, rato, tartaruga, galinha, marta, vaca, salmão, rã e truta, bem como lactogénio placentário humano, hGH(20K), e hGH-V foram comparadas com a de hGH de tipo selvagem. As variantes evolutivas de prolactina não foram incluídas. Está representado o logaritmo natural da frequência com que aparecem os resíduos de hGH de tipo selvagem entre estas variantes.

A Figura 9 divulga a aditividade de mutações derivadas de fagos. A alteração ($\Delta\Delta G$) na energia livre de ligação *versus* a de hGH de tipo selvagem foi comparada com a soma de $\Delta\Delta G$ para as mutações componentes. Os pontos mostrados correspondem às combinações de (1) variante BD vs. [B mais D]; (2) variante 852b vs. [mini-hélice-1 mais volta-A]; (3) variante BF vs. [B mais F] e (4) variante 852d vs. [BD mais 852b]. As barras de erro foram estimadas a partir de desvios padrão utilizando um cálculo de propagação de erros. Bevington, Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences, pág. 56-65 (McGraw-Hill, New York, 1969). A linha mostrada é $y = -0,94 + 0,60x$; $R^2 = 0,96$.

A Figura 10 mostra um mapa plasmídico para um vector exemplar utilizado para expressar uma variante de hGH antagonista do presente invento (a variante B2036), tal como descrito no Exemplo V.

A Figura 11 mostra o efeito de injeções subcutâneas diárias (0,25 mg/kg) de várias variantes de hGH antagonistas do presente invento nos níveis do factor de crescimento-I semelhante a insulina (IGF-I) em macacos *Rhesus*. Foram testadas ambas as formas "PEGuilada" e não "PEGuilada" das variantes. Ver Exemplo XIII.

A Figura 12 mostra a farmacodinâmica da dose única de uma preparação de uma variante de hGH antagonista "PEGuilada" (B2036) injectada intravenosamente ou subcutaneamente em macacos *Rhesus*. O efeito antagonista foi medido como redução percentual no nível de IGF-I. Ver Exemplo XIV.

Descrição das Concretizações Preferidas

Variantes

As sequências de ADN e de aminoácidos da hormona do crescimento humana (hGH) foram relatadas. Goeddel *et al.*, *supra*; Gray *et al.*, *supra*. O presente invento descreve novas variantes de hGH produzidas utilizando a metodologia de pesquisa com alanina ou métodos de selecção de fagemídeos. As variantes de hGH do presente invento podem ser expressas em qualquer sistema recombinante que seja capaz de expressar hGH de tipo selvagem ou met.

A notação das sequências de hGH variantes define as substituições de aminoácidos reais presentes nas variantes de hGH do presente invento. Para uma variante, as substituições estão indicadas por uma letra que representa o resíduo de tipo selvagem (no código de uma letra), um número que indica a posição do aminoácido na sequência de tipo selvagem e uma segunda letra que indica o resíduo de aminoácido substituído. Por exemplo, R64K indica uma mutação em que Arg 64 é convertido em Lys. Mutantes múltiplos são indicados através de uma série de mutantes simples separados por vírgulas.

Mutagénesse por Pesquisa com Alanina

Numa concretização, o presente invento aqui utiliza uma análise sistemática de hGH para determinar um ou mais locais activos no polipéptido que estejam envolvidos na interacção do polipéptido com o seu receptor. Tal análise é convenientemente efectuada utilizando tecnologia de ADN recombinante. Em geral, a sequência de ADN que codifica hGH é clonada e manipulada para que possa ser expressa num hospedeiro conveniente. O ADN que codifica hGH pode ser obtido a partir de uma biblioteca genómica, a partir de ADNC derivado de ARNm em células que expressam a hGH ou através de construção sintética da sequência de ADN. Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1982).

O ADN de hGH de tipo selvagem é então inserido num plasmídeo ou vector apropriado que é utilizado para

transformar uma célula hospedeira. São preferidos procariotas para clonagem e expressão de sequências de ADN para produzir as variantes de hGH. Por exemplo, pode ser utilizada a estirpe 294 de *E. coli* K12 (ATCC N° 31446), bem como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC N° 31537) e *E. coli* c600 e c600hf1 e *E. coli* W3110 (F^- , γ^- , prototrófica, ATCC N° 27325), bacilos tais como *Bacillus subtilis* e outras *Enterobacteriaceae* tais como *Salmonella typhimurium* ou *Serratia marcescens* e várias espécies de *Pseudomonas*. O procariota preferido é *E. coli* W3110 (ATCC 27325). Quando expressa intracelularmente em procariotas, a hGH contém tipicamente um metionina N-terminal ou uma formilmetionina e não é glicosilada. Quando expressa extracelularmente para o meio ou o periplasma, a hGH não contém uma metionina N-terminal. Pretende-se que estes exemplos sejam, é claro, ilustrativos em vez de limitantes.

Para além dos procariotas, podem ser utilizados organismos eucarióticos, tais como culturas de levedura ou células derivadas de organismos multicelulares. Em princípio, qualquer tal cultura celular é praticável. No entanto, o interesse tem sido maior em células de vertebrado e a propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um procedimento reprodutível. Tissue Culture, Academic Press, Kruse e Patterson, editores (1973). Exemplos de tais linhas celulares hospedeiras úteis são as linhas celulares VERO e HeLa, de ovário de *hamster* chinês (CHO), W138, BHK, COS-7 e MDCK.

Em geral, são utilizados em conjunto com estes hospedeiros vectores plasmídicos contendo sequências de replicação e de controlo que sejam derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira. O vector possui vulgarmente um local de replicação, bem como sequências que codificam proteínas que são capazes de proporcionar selecção fenotípica em células transformadas. Por exemplo, *E. coli* pode ser transformada utilizando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli*. Mandel *et al.*, *J. Mol. Biol.* 53: 154 (1970). O plasmídeo pBR322 contém genes para resistência a ampicilina e tetraciclina e proporciona assim um meio fácil para selecção. Um vector preferido é pB0475, descrito no Exemplo 1 de um pedido prioritário a este pedido (U.S.S.N. 07/428066 apresentado a 26 de Outubro de 1989). Este vector

contém origens de replicação para fagos e *E. coli* que lhe permitem ser transportado entre tais hospedeiros, facilitando deste modo a mutagénese e a expressão. "Vector de expressão" refere-se a uma construção de ADN contendo uma sequência de ADN que está operativamente ligada a uma sequência de controlo adequada capaz de efectuar a expressão do referido ADN num hospedeiro adequado. Tais sequências de controlo incluem um promotor para efectuar a transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar tal transcrição, uma sequência codificando locais adequados de ligação ao ARNm pelo ribossoma e sequências que controlam a terminação da transcrição e da tradução. O vector pode ser um plasmídeo, uma partícula fágica ou simplesmente uma potencial inserção genómica. Uma vez transformado para um hospedeiro adequado, o vector pode replicar-se e funcionar independentemente do genoma do hospedeiro, ou pode, nalguns casos, integrar-se no próprio genoma. No presente fascículo, "plasmídeo" e "vector" são por vezes utilizados alternadamente uma vez que actualmente o plasmídeo é a forma de vector mais vulgarmente utilizada. No entanto, pretende-se que o presente invento inclua outras formas de vectores de expressão que tenham funções equivalentes e que sejam, ou se tornem, conhecidos na arte.

"Operativamente ligado" quando se descreve a relação entre duas regiões de ADN ou polipeptídicas significa simplesmente que estão funcionalmente relacionadas uma com a outra. Por exemplo, uma pré-sequência está operativamente ligada a um péptido se funcionar como sequência sinal, participando na secreção da forma madura da proteína, muito provavelmente envolvendo clivagem da sequência sinal. Um promotor está operativamente ligado a uma sequência de codificação se controlar a transcrição da sequência; um local de ligação ao ribossoma está operativamente ligado a uma sequência de codificação se estiver posicionado de forma a permitir a tradução.

Uma vez clonada a hGH, pode ser efectuada mutagénese específica do local (Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 13: 4331 [1986]; Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 10: 6487 [1987]), mutagénese de cassette (Wells *et al.*, *Gene* 34: 315 [1985]), mutagénese por selecção de restrição (Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA* 317: 415 [1986]), ou outras

técnicas conhecidas no ADN de hGH clonado para produzir o ADN variante que codifica para as alterações na sequência de aminoácidos definidas pelos resíduos a substituir. Quando operativamente ligado a um vector de expressão apropriado, são obtidas variantes de hGH com os domínios activos substituídos. Nalguns casos, a recuperação da variante de hGH pode ser facilitada através da expressão e secreção de tais moléculas pelo hospedeiro de expressão através da utilização de uma sequência sinal apropriada operativamente ligada à sequência de ADN que codifica a hGH original ou variante. Tais métodos são bem conhecidos dos peritos na arte. Claro que podem ser empregues outros métodos para produzir tais polipéptidos tais como a síntese química *in vitro* da variante de hGH desejada. Barany *et al.*, em The Peptides, eds. E. Gross e J. Meienhofer (Academic Press: N.Y. 1979), Vol. 2, pág. 3-254.

Uma vez produzidas, as diferentes variantes de GH são postas em contacto com o receptor e é determinada a interacção, se houver, entre o receptor e cada variante. Estas actividades são comparadas com a actividade da hGH de tipo selvagem com o mesmo receptor para determinar quais os resíduos de aminoácidos no domínio activo que estão envolvidos na interacção com o receptor. O aminoácido pesquisado utilizado numa tal análise pode ser qualquer aminoácido diferente do substituído, *i.e.*, qualquer um dos outros 19 aminoácidos de ocorrência natural.

O receptor alvo pode ser isolado a partir de fontes naturais ou preparado através de métodos recombinantes através de procedimentos conhecidos na arte. Como ilustração, o receptor pode ser preparado através da técnica descrita por McFarland *et al.*, *Science* 245: 494-499 (1989).

A interacção entre o receptor e a hGH original ou variante pode ser medida através de qualquer ensaio conveniente *in vitro* ou *in vivo*. Assim, ensaios *in vitro* podem ser utilizados para determinar qualquer interacção detectável entre um receptor e hGH. Tal detecção pode incluir a medição de alterações colorimétricas, alterações na radioactividade, alterações na solubilidade, alterações no peso molecular medidas através de electroforese em gel e/ou métodos de exclusão em gel, etc. Ensaio *in vivo* incluem, mas não se limitam a, ensaios para detectar efeitos fisiológicos, p. ex., ganho de peso ou alteração no equilíbrio electrolítico.

Geralmente pode ser utilizado qualquer ensaio *in vivo* desde que exista um parâmetro variável de forma a detectar-se uma alteração na interacção entre o receptor e a hGH de interesse.

Embora possam ser utilizadas várias medições analíticas para comparar actividades, uma conveniente para a ligação do receptor é a constante de dissociação K_d do complexo formado entre a variante de hGH e o receptor em comparação com a K_d para a hGH de tipo selvagem. Geralmente, um aumento ou diminuição de duas vezes na K_d por resíduo análogo substituído pela substituição indica que o resíduo ou resíduos substituídos são activos na interacção da hGH de tipo selvagem com o alvo.

Quando um resíduo de aminoácido activo suspeito ou conhecido é sujeito a análise de pesquisa de aminoácidos, os resíduos de aminoácidos imediatamente adjacentes a este deviam ser pesquisados. Podem ser feitos polipéptidos com três resíduos substituídos. Um contém um aminoácido de pesquisa, de preferência alanina, na posição N que é o aminoácido activo suspeito ou conhecido. Os outros dois contêm o aminoácido de pesquisa na posição N+1 e N-1. Se cada hGH substituída causa um efeito maior que cerca de duas vezes na K_d para o receptor, o aminoácido de pesquisa é substituído na posição N+2 e N-2. Isto é repetido até ser identificado pelo menos um, e de preferência quatro, resíduos em cada direcção que tenham um efeito de menos de cerca de duas vezes na K_d ou seja alcançada uma das extremidades da hGH de tipo selvagem. Deste modo, pode ser identificado um ou mais aminoácidos ao longo de uma sequência de aminoácidos contínua que estejam envolvidos na interacção com o receptor em particular.

O resíduo de aminoácido activo identificado através de pesquisa com aminoácidos é tipicamente um que contacta o alvo receptor directamente. No entanto, os aminoácidos activos podem também contactar indirectamente o alvo através de pontes salinas formadas com outros resíduos ou pequenas moléculas tais como H_2O ou espécies iónicas tais como Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} .

Nalguns casos, a substituição de um aminoácido de pesquisa num ou mais resíduos resulta num polipéptido de resíduos substituídos que não é expresso a níveis que permitam o isolamento de quantidades suficientes para realizar análise da sua actividade com o receptor. Em tais casos, pode ser

utilizado um aminoácido de pesquisa diferente, de preferência um aminoácido isostérico.

Entre os aminoácidos de pesquisa preferidos estão aminoácidos relativamente pequenos, neutros. Tais aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e cisteína. A alanina é o aminoácido de pesquisa preferido entre este grupo porque elimina a cadeia lateral para além do carbono beta e é menos provável que altere a conformação da cadeia principal da variante. A alanina é também preferida porque é o aminoácido mais vulgar. Mais, é frequentemente verificado tanto em posições ocultas como expostas. Creighton, The Proteins (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia; *J. Mol. Biol.* 150: 1 (1976). Se a substituição por alanina não produzir quantidades adequadas de variante de hGH, pode ser utilizado um aminoácido isostérico. Alternativamente, podem ser utilizados os seguintes aminoácidos por ordem decrescente de preferência: Ser, Asn e Leu.

Uma vez identificados os resíduos de aminoácidos activos, os aminoácidos isostéricos podem ser substituídos. Tais substituições isostéricas não precisam de ocorrer em todas as circunstâncias e podem ser efectuadas antes de qualquer aminoácido activo ser identificado. Tal substituição de um aminoácido isostérico é efectuada para minimizar os potenciais efeitos destrutivos na conformação que algumas substituições podem causar. Aminoácidos isostéricos são mostrados na tabela abaixo:

<u>Aminoácido do</u> <u>Polipéptido</u>	<u>Aminoácido de</u> <u>Pesquisa Isostérico</u>
Ala (A)	Ser, Gly
Glu (E)	Gln, Asp
Gln (Q)	Asn, Glu
Asp (D)	Asn, Glu
Asn (N)	Ala, Asp
Leu (L)	Met, Ile
Gly (G)	Pro, Ala
Lys (K)	Met, Arg
Ser (S)	Thr, Ala
Val (V)	Ile, Thr
Arg (R)	Lys, Met, Asn

Thr	(T)	Ser, Val
Pro	(P)	Gly
Ile	(I)	Met, Leu, Val
Met	(M)	Ile, Leu
Phe	(F)	Tyr
Tyr	(Y)	Phe
Cys	(C)	Ser, Ala
Trp	(W)	Phe
His	(H)	Asn, Gln

O método aqui pode ser utilizado para detectar resíduos de aminoácidos activos dentro de diferentes domínios activos. Uma vez feita esta identificação, várias modificações à hGH de tipo selvagem podem ser feitas para modificar a interacção entre a hGH original e um ou mais dos alvos.

Para a hGH em particular, exemplar do presente invento é uma concretização preferida em que os domínios activos e os resíduos activos que determinam a sua actividade com o seu receptor somatogénico (hGHbp) são identificados. Na realização desta concretização do presente invento, foram produzidas ou identificadas variantes de hGH, incluindo as variantes de hGH com resíduos de aminoácidos substituídos, que têm interacções de ligação diferentes com hGHbp em comparação com hGH de ocorrência natural. Algumas podem ter uma afinidade maior para hGHbp e uma maior potência para somatogénese em ratos. Outras têm uma actividade menor com hGHbp. Tais variantes de hGH são úteis como agonistas ou antagonistas de hGH e podem ter uma maior potência para estimular outros receptores de hGH, se tais variantes forem libertadas de interacção substancial com hGHbp. Mais, tais variantes são úteis em imunoensaios para hGH como um padrão ou marcador de hGH. Podem ser identificadas algumas variantes que têm uma significativa diminuição da reactividade com soro humano e de ratinho contendo anticorpos policlonais anti-hGH. Outras têm a mesma afinidade de ligação para hGHbp que hGH mas maior potência para estimular o crescimento.

O método para determinação dos domínios e resíduos activos para hGH que interagem com o seu receptor somatogénico do fígado é mostrado esquematicamente na Figura 1 e os

segmentos seleccionados são mostrados na Figura 2, de um pedido prioritário a este pedido (U.S.S.N. 07/428066 apresentado a 26 de Outubro de 1989).

Método de Apresentação em Fagemídeos

Adicionalmente, as variantes podem ser analisadas através de apresentação em fagemídeos. Este método envolve (a) construção de um vector de expressão replicável compreendendo um primeiro gene codificando a hGH, um segundo gene codificando pelo menos uma porção de uma proteína de revestimento fágico natural ou de tipo selvagem em que o primeiro e segundo genes são heterólogos, e um elemento regulador da transcrição operativamente ligado ao primeiro e segundo genes, formando deste modo uma fusão génica codificando uma proteína de fusão; (b) mutação do vector numa ou mais posições seleccionadas dentro do primeiro gene formando deste modo uma família de plasmídeos relacionados; (c) transformação de células hospedeiras adequadas com os plasmídeos; (d) infecção das células hospedeiras transformadas com um fago ajudante possuindo um gene codificando a proteína de revestimento fágico; (e) cultura das células hospedeiras infectadas transformadas sob condições adequadas para formação de partículas de fagemídeo recombinantes contendo pelo menos uma porção do plasmídeo e capazes de transformar o hospedeiro, as condições ajustadas de forma a que não mais do que uma pequena quantidade de partículas de fagemídeo apresentem mais de uma cópia da proteína de fusão à superfície da partícula; (f) colocação das partículas de fagemídeo em contacto com uma molécula de receptor de hGH (hGHbp) de forma a que pelo menos uma porção das partículas de fagemídeo se ligue à molécula de receptor; e (g) separação das partículas de fagemídeo que se ligam das que não se ligam. De preferência, o método compreende ainda transformação de células hospedeiras adequadas com partículas de fagemídeo recombinantes que se ligam à hGHbp e repetição dos passos (d) a (g) um ou mais vezes.

De preferência neste método o plasmídeo está sob forte controlo do elemento regulador da transcrição e as condições de cultura são ajustadas para que a quantidade ou o número de partículas de fagemídeo que apresentam mais de uma cópia da

proteína de fusão à superfície da partícula seja inferior a cerca de 1%. Também, de preferência, a quantidade de partículas de fagemídeo que apresentam mais de uma cópia da proteína de fusão é inferior a 10% da quantidade de partículas de fagemídeo que apresentam uma única cópia da proteína de fusão. De preferência, a quantidade é inferior a 20%.

Tipicamente neste método, o vector de expressão contém ainda uma sequência sinal de secreção fundida com o ADN que codifica cada subunidade do polipéptido e o elemento regulador da transcrição é um sistema promotor. Sistemas promotores preferidos são seleccionados a partir dos promotores de *lacZ*, λ_{PL} , *tac*, polimerase de T7, triptofano e fosfatase alcalina e combinações destes. Também normalmente o método emprega um fago ajudante seleccionado a partir de M13K07, M13R408, M13-VCS e $\Phi \times 174$. O fago ajudante preferido é M13K07 e a proteína de revestimento preferida é a proteína de revestimento do gene III do Fago M13. O hospedeiro preferido é *E. coli* e estirpes de *E. coli* deficientes em proteases. Foram detectadas novas variantes de hGH seleccionadas através do método do presente invento.

Foram construídos vectores de expressão de fagemídeos que contêm um codão de terminação reprimível funcionalmente situado entre os ácidos nucleicos que codificam o polipéptido e a proteína de revestimento fágico.

Em detalhe, ciclos repetidos de selecção de hGH são utilizados para seleccionar para uma ligação de afinidade cada vez maior através da selecção de fagemídeos ou de múltiplas alterações de aminoácidos que são seleccionadas através de múltiplos ciclos de selecção. Após um primeiro ciclo de selecção de fagemídeos, envolvendo uma primeira região ou selecção de aminoácidos no polipéptido ligando, são conduzidos ciclos adicionais de selecção de fagemídeos noutras regiões ou aminoácidos do polipéptido ligando. Os ciclos de selecção de fagemídeos são repetidos até serem alcançadas as propriedades de afinidade desejadas do polipéptido ligando. Para ilustrar este processo, a selecção de fagemídeos de hGH foi conduzida em ciclos. No primeiro ciclo podem ser mutados os aminoácidos de hGH 172, 174, 176 e 178 e seleccionados em fagemídeos. Num segundo ciclo, podem ser seleccionados em fagemídeos os

aminoácidos de hGH 167, 171, 175 e 179. Num terceiro ciclo podem ser seleccionados em fagemídeos os aminoácidos de hGH 10, 14, 18 e 21. As alterações de aminoácidos óptimas de um ciclo anterior podem ser incorporadas no polipéptido antes do ciclo seguinte de selecção. Por exemplo, as substituições de aminoácidos de hGH 174 (serina) e 176 (tirosina) foram incorporadas na hGH antes da selecção em fagemídeos dos aminoácidos de hGH 167, 171, 175 e 179.

A partir do antecedente será apreciado que os resíduos de aminoácidos que formam o domínio de ligação da hGH não estejam ligados sequencialmente e possam residir em diferentes subunidades do polipéptido. Isto é, o domínio de ligação coincide com a estrutura secundária em particular no local de ligação e não com a estrutura primária. Assim, geralmente, as mutações são introduzidas em codões codificando aminoácidos dentro de uma determinada estrutura secundária em locais dirigidos para fora do interior do polipéptido de forma a terem potencial para interagir com o receptor. A localização de resíduos de hGH que modula fortemente a sua ligação ao receptor de hGH (Cunningham *et al.*, *Science*, 1990, *supra*) é conhecida. Assim, locais representativos adequados para mutagénese incluiriam os resíduos 172, 174, 176 e 178 na hélice-4, bem como o resíduo 64 situado numa estrutura secundária "não ordenada".

Neste método de apresentação em fagemídeos, uma vez isolado o gene de hGH, este pode ser inserido num vector adequado (de preferência um plasmídeo) para amplificação, tal como descrito geralmente em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York 1989. Embora estejam disponíveis vários tipos de vectores e possam ser utilizados para realizar este invento, os vectores plasmídicos são os vectores preferidos para utilizar aqui, uma vez que podem ser construídos com relativa facilidade e podem ser prontamente amplificados. Os vectores plasmídicos contêm geralmente uma variedade de componentes, incluindo promotores, sequências sinal, genes de selecção fenotípica, locais de origem de replicação e outros componentes necessários tal como são conhecidos dos vulgares peritos na arte.

Os promotores mais vulgarmente utilizados em vectores procarióticos incluem o sistema promotor de *lacZ*, o promotor *pho A* da fosfatase alcalina, o promotor do bacteriófago λ_{PL} (um promotor sensível à temperatura), o promotor de *tac* (um promotor híbrido *trp-lac* que é regulado pelo repressor de *lac*), o promotor do triptofano e o promotor do bacteriófago T7. Para descrições gerais de promotores, ver a secção 17 de Sambrook *et al.*, *supra*. Embora estes sejam os promotores mais vulgarmente utilizados, podem também ser utilizados outros promotores microbianos adequados.

Promotores preferidos para praticar este invento para apresentação em fagemídeos são aqueles que podem ser fortemente regulados para que possa ser controlada a expressão do gene de fusão. Crê-se que o problema que não foi reconhecido na arte anterior foi que a apresentação de múltiplas cópias da proteína de fusão à superfície da partícula de fagemídeo conduzia a uma união multipontos do fagemídeo com o alvo. Crê-se que este efeito, referido como "efeito de quelato", resulte em selecção de falsos polipéptidos de "alta afinidade" quando múltiplas cópias da proteína de fusão são apresentadas na partícula de fagemídeo em grande proximidade umas com as outras de forma que o alvo era "quelado". Quando ocorre união multipontos, a K_d efectiva ou aparente pode ser tão elevada como o produto das K_d s individuais para cada cópia da proteína de fusão apresentada.

Foi descoberto que através de forte regulação da expressão da proteína de fusão para que não mais de uma quantidade menor, *i.e.*, menos de cerca de 1%, das partículas de fagemídeos contivesse múltiplas cópias da proteína de fusão, o "efeito de quelato" é superado, permitindo uma selecção correcta de polipéptidos de alta afinidade. Assim, dependendo do promotor, as condições de cultura do hospedeiro são ajustadas para maximizar o número de partículas de fagemídeos contendo uma única cópia da proteína de fusão e minimizar o número de partícula de fagemídeos contendo múltiplas cópias da proteína de fusão.

Promotores preferidos utilizados para praticar este invento são o promotor de *lacZ* e o promotor de *phoA*. O promotor de *lacZ* é regulado através da proteína repressora de

lac, *lac i* e assim a transcrição do gene de fusão pode ser controlada através da manipulação do nível da proteína repressora de *lac*. Para fins de ilustração, o fagemídeo contendo o promotor de *lacZ* é criado numa estirpe celular que contém uma cópia do gene repressor *laci*, um repressor para o promotor de *lacZ*. Estirpes celulares exemplares contendo o gene *laci* incluem JM 101 e XL-blue. Em alternativa, a célula hospedeira pode ser co-transfectada com um plasmídeo contendo ambos o repressor *laci* e o promotor de *lacZ*. Ocasionalmente ambas as técnicas de cima são utilizadas simultaneamente, isto é, são criadas partículas de fagemídeos contendo o promotor de *lacZ* em estirpes celulares contendo o gene *laci* e as estirpes celulares são co-transfectadas com um plasmídeo contendo ambos os genes *lacZ* e *laci*.

Normalmente quando se deseja expressar um gene, ao hospedeiro transfectado de cima adicionar-se-ia um indutor tal como isopropiltiogalactósido (IPTG). No presente invento, no entanto, este passo é omitido para (a) minimizar a expressão da proteína de fusão do gene III, minimizando deste modo o número de cópias (*i.e.*, o número de fusões do gene III por número de fagemídeos) e para (b) prevenir um empacotamento fraco ou incorrecto do fagemídeo causado por indutores tais como IPTG mesmo a baixas concentrações. Tipicamente, quando não é adicionado nenhum indutor, o número de proteínas de fusão por partícula de fagemídeo é de cerca de 0,1 (número de proteínas de fusão brutas/número de partículas de fagemídeo). O promotor mais preferido utilizado para praticar este invento é *phoA*. Crê-se que este promotor seja regulado pelo nível de fosfato inorgânico na célula onde o fosfato actua regulando negativamente a actividade do promotor. Assim, esgotando o fosfato das células, a actividade do promotor pode ser aumentada. O resultado desejado é alcançado criando células num meio enriquecido em fosfato tal como 2YT ou LB, controlando deste modo a expressão da fusão do gene III.

Outro componente útil de vectores utilizados para praticar este invento é uma sequência sinal. Esta sequência está tipicamente localizada imediatamente a 5' do gene que codifica a proteína de fusão e é assim transcrita no terminal amino da proteína de fusão. No entanto, em certos casos, demonstrou-se que a sequência sinal se situava em posições que

não a 5' em relação ao gene que codificava a proteína a segregar. Esta sequência direcciona-se para a proteína à qual está ligada através da membrana interna da célula bacteriana. O ADN codificando a sequência sinal pode ser obtido como um fragmento de endonucleases de restrição a partir de qualquer gene codificando uma proteína que tenha uma sequência sinal. Sequências sinal procarióticas adequadas podem ser obtidas a partir dos genes que codificam, por exemplo, lamB ou ompF (Wong *et al.*, *Gene* 68: 193 [1983]), MalE, PhoA e outros genes. Uma sequência sinal procariótica preferida para praticar este invento é a sequência sinal da enterotoxina II termoestável de *E. coli* (STII) tal como descrita por Chang *et al.*, *supra*.

Outro componente útil dos vectores utilizados para praticar o método de apresentação fágica é genes de selecção fenotípica. Genes de selecção fenotípica típicos são aqueles que codificam proteínas que conferem à célula hospedeira resistência a antibióticos. Para fins de ilustração, o gene de resistência à ampicilina (*amp*) e o gene de resistência à tetraciclina (*tet*) são facilmente empregues para este fim.

A construção de vectores adequados compreendendo os componentes acima mencionados bem como o gene que codifica a hGH (gene 1) é preparada utilizando procedimentos de ADN recombinante padrão tais como descritos em Sambrook *et al.*, *supra*. Os fragmentos de ADN isolados a combinar para formar o vector são clivados, talhados e ligados um com o outro numa ordem e orientação específicas para criar o vector desejado.

O ADN é clivado utilizando a enzima ou enzimas de restrição apropriadas num tampão adequado. Em geral, são utilizados cerca de 0,2-1 µg de plasmídeo ou fragmentos de ADN com cerca de 1-2 unidades da enzima de restrição apropriada em cerca de 20 µl de solução tampão. Os tampões, as concentrações de ADN e os tempos e temperaturas de incubação adequados são especificados pelos fabricantes das enzimas de restrição. Geralmente, tempos de incubação de cerca de uma ou duas horas a 37°C são adequados, embora várias enzimas requeiram temperaturas mais elevadas. Após incubação, as enzimas e outros contaminantes são removidos através de extracção da solução de digestão com uma mistura de fenol e clorofórmio e o

ADN é recuperado a partir da fracção aquosa através de precipitação com etanol.

Para ligar os fragmentos de ADN uns aos outros para formar um vector funcional, as extremidades dos fragmentos de ADN têm de ser compatíveis umas com as outras. Nalguns casos, as extremidades ficam directamente compatíveis após digestão com endonucleases. No entanto, pode ser necessário converter primeiro as extremidades coesivas produzidas vulgarmente por digestão com endonucleases em extremidades cegas para as tornar compatíveis para ligação. Para tornar as extremidades cegas, o ADN é tratado num tampão adequado durante pelo menos 15 minutos a 15°C com 10 unidades do fragmento de Klenow da ADN-polimerase I (Klenow) na presença dos quatro desoxinucleótidos-trifosfato. O ADN é então purificado através de extracção com fenol-clorofórmio e precipitação em etanol.

Os fragmentos de ADN clivados podem ser separados por tamanho e seleccionados utilizando electroforese em gel de ADN. O ADN pode ser sujeito a electroforese através de uma matriz de agarose ou de poliacrilamida. A selecção da matriz depende do tamanho dos fragmentos de ADN a separar. Após electroforese, o ADN é extraído da matriz através de electroeluição ou, se for utilizada agarose de baixo ponto de fusão como matriz, derretendo a agarose e extraíndo o ADN a partir desta, tal como descrito nas secções 6.30-6.33 de Sambrook *et al.*, *supra*.

Os fragmentos de ADN a ligar um ao outro (previamente digeridos com as enzimas de restrição apropriadas de forma a que as extremidades de cada fragmento a ligar sejam compatíveis) são postos em solução em quantidades próximas do equimolar. A solução contém também ATP, tampão de ligase e uma ligase tal como ADN-ligase de T4 a cerca de 10 unidades por 0,5 µg de ADN. Se o fragmento de ADN for para ligar num vector, o vector é em primeiro lugar linearizado através de corte com a(s) endonuclease(s) de restrição apropriada(s). O vector linearizado é então tratado com fosfatase alcalina ou fosfatase intestinal de vitelo. Este tratamento com fosfatase previne a auto-ligação do vector durante o passo de ligação.

Após ligação, o vector com o gene estranho agora inserido é transformado numa célula hospedeira adequada. Os procariotas são as células hospedeiras preferidas para este invento. Células hospedeiras procarióticas adequadas incluem a estirpe JM101 de *E. coli*, a estirpe 294 de *E. coli* K12 (ATCC número 31446), a estirpe W3110 de *E. coli* (ATCC número 27325), *E. coli* X1776 (ATCC número 31537), *E. coli* XL-1Blue (Stratagene) e *E. coli* B; no entanto, podem também ser utilizadas muitas outras estirpes de *E. coli*, tais como HB101, NM522, NM538 e NM539 e muitas outras espécies e géneros de procariotas. Para além das estirpes de *E. coli* listadas acima, bacilos tais como *Bacillus subtilis*, outras *enterobacteriaceae* tais *Salmonella typhimurium* ou *Serratia marcescens* e várias espécies de *Pseudomonas* podem todas ser utilizadas como hospedeiros.

A transformação de células procarióticas é facilmente alcançada utilizando o método de cloreto de cálcio tal como descrito na secção 1.82 de Sambrook et al., supra. Alternativamente, para transformar estas células pode ser utilizada electroporação (Neumann et al., EMBO J. 1: 841 [1982]). As células transformadas são seleccionadas através de crescimento num antibiótico, vulgarmente *tet* ou *amp*, ao qual são tornadas resistentes devido à presença do gene de resistência *tet* e/ou *amp* no vector.

Após selecção das células transformadas, estas células são criadas em cultura e o ADN plasmídico (ou outro vector com o gene estranho inserido) é então isolado. O ADN plasmídico pode ser isolado utilizando métodos conhecidos na arte. Dois métodos adequados são a preparação em pequena escala de ADN e a preparação em grande escala de ADN tal como descrito nas secções 1.25-1.33 de Sambrook et al., supra. O ADN isolado pode ser purificado através de métodos conhecidos na arte tais como os descritos na secção 1.40 de Sambrook et al., supra. Este ADN plasmídico purificado é então analisado através de mapeamento de restrição e/ou sequenciação de ADN. A sequenciação de ADN é geralmente efectuada através do método de Messing et al., Nucleic Acids Res. 9: 309 (1981), o método de Maxam et al., Meth. Enzymol. 65: 499 (1980) ou o método de Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977).

O método de apresentação em fagemídeos aqui contempla a fusão do gene que codifica a hGH (gene 1) com um segundo gene (gene 2) de forma que a proteína de fusão seja criada durante a transcrição. O gene 2 é tipicamente um gene de uma proteína de revestimento de um fago, e de preferência é a proteína de revestimento do gene III do fago M13, ou um fragmento desta. A fusão dos genes 1 e 2 pode ser alcançada através da inserção do gene 2 num determinado local num plasmídeo que contenha o gene 1 ou através da inserção do gene 1 num determinado local num plasmídeo que contenha o gene 2.

A inserção de um gene num plasmídeo requer que o plasmídeo seja cortado na localização exacta em que se inserir o gene. Assim, tem de existir um local de endonuclease de restrição nesta localização (de preferência um local único de forma a que o plasmídeo seja apenas cortado numa única localização durante a digestão com a endonuclease de restrição). O plasmídeo é digerido, sujeito a fosfatase e purificado tal como descrito acima. O gene é então inserido neste plasmídeo linearizado através de ligação dos dois ADN um ao outro. A ligação pode ser alcançada se as extremidades do plasmídeo forem compatíveis com as extremidades do gene a inserir. Se as enzimas de restrição forem utilizadas para cortar o plasmídeo e isolar o gene a inserir para criar extremidades cegas ou extremidades coesivas compatíveis, os ADN podem ser ligados um ao outro directamente com uma ligase tal como a ADN-ligase do bacteriófago T4 através de incubação da mistura a 16°C durante 1-4 horas na presença de ATP e tampão de ligase tal como descrito na secção 1.68 de Sambrook *et al.*, *supra*. Se as extremidades não forem compatíveis, têm de ser primeiro tornadas cegas utilizando o fragmento de Klenow da ADN-polimerase I ou da ADN-polimerase do bacteriófago T4, ambos os quais requerem os quatro desoxirribonucleótidos-trifosfato para preencher as extremidades de cadeia simples pendentes do ADN digerido.

Alternativamente, as extremidades podem ser tornadas cegas utilizando uma nuclease tal como a nuclease S1 ou a nuclease de feijão mung, ambas as quais funcionam cortando de novo as cadeias simples pendentes de ADN. O ADN é então novamente ligado utilizando uma ligase tal como descrito

acima. Nalguns casos, pode não ser possível tornar cegas as extremidades do gene a inserir, uma vez que o enquadramento de leitura da região de codificação ficará alterado. Para superar este problema, podem ser utilizados ligantes oligonucleotídicos. Os ligantes servem como ponte para unir o plasmídeo ao gene a inserir. Estes ligantes podem ser produzidos sinteticamente como ADN de cadeia dupla ou de cadeia simples utilizando métodos padrão. Os ligantes têm uma extremidade que é compatível com as extremidades do gene a inserir; os ligantes são primeiro ligados a este gene utilizando métodos de ligação descritos acima. A outra extremidade dos ligantes é desenhada para ser compatível com o plasmídeo para ligação. Ao desenhar os ligantes, tem de se ter cuidado para não desfazer o enquadramento de leitura do gene a inserir ou o enquadramento de leitura do gene contido no plasmídeo. Nalguns casos, pode ser necessário desenhar os ligantes para que codifiquem parte de um aminoácido ou para que codifiquem para um ou mais aminoácidos.

Entre o gene 1 e o gene 2, pode ser inserido ADN codificando um codão de terminação, sendo tais codões de terminação UAG (âmbar), UAA (ocre), UGA (opala). Davis *et al.*, Microbiology (Harper e Row: New York, 1980), páginas 237, 245-247 e 274. O codão de terminação expresso numa célula hospedeira de tipo selvagem resulta na síntese do produto proteico do gene 1 sem a proteína do gene 2 ligada. No entanto, o crescimento numa célula hospedeira supressora resulta na síntese de quantidades detectáveis de proteína fundida. Tais células hospedeiras supressoras contêm um ARNt modificado para inserir um aminoácido na posição do codão de terminação do ARNm, resultando deste modo na produção de quantidades detectáveis da proteína de fusão. Tais células hospedeiras supressoras são bem conhecidas e estão descritas, tais como a estirpe supressora de *E. coli*. Bullock *et al.*, *BioTechniques* 5: 376-379 (1987). Qualquer método aceitável pode ser utilizado para colocar um tal codão de terminação no ARNm codificando o polipéptido de fusão.

O codão reprimível pode ser inserido entre o gene de hGH e um segundo gene codificando pelo menos uma porção de uma proteína de revestimento fágica. Alternativamente, o codão de terminação reprimível pode ser inserido adjacente ao local de

fusão através da substituição do último triplete de aminoácidos do polipéptido ou do primeiro aminoácido na proteína de revestimento fágica. Quando o fagemídeo contendo o codão reprimível é posto a crescer numa célula hospedeira supressora, resulta na produção detectável de um polipéptido de fusão contendo a hGH e a proteína de revestimento. Quando o fago é posto a crescer numa célula hospedeira não supressora, a hGH é sintetizada substancialmente sem fusão com a proteína de revestimento fágica devido a terminação no triplete reprimível inserido codificando UAG, UAA ou UGA. Na célula não supressora o polipéptido é sintetizado e segregado pela célula hospedeira devido à ausência da proteína de revestimento fágica fundida que de outro modo o ancorava à célula hospedeira.

O gene de hGH pode ser alterado num ou mais dos codões seleccionados. Uma alteração é definida como uma substituição, deleção ou inserção de um ou mais codões no gene que codifica a hGH que resulta numa alteração na sequência de aminoácidos da hGH em comparação com a sequência inalterada ou de tipo selvagem da hGH. De preferência, as alterações são feitas através de substituição de pelo menos um aminoácido por qualquer outro aminoácido numa ou mais regiões da molécula. As alterações podem ser produzidas através de uma variedade de métodos conhecidos na arte. Estes métodos incluem, mas não se limitam a, mutagénese mediada por oligonucleótidos e mutagénese de cassette.

A mutagénese mediada por oligonucleótidos é o método preferido para preparação de variantes de substituição, deleção ou inserção de hGH. A técnica é bem conhecida na arte tal como descrito por Zoller *et al.*, *supra*. Resumidamente, o gene de hGH é alterado através de hibridação de um oligonucleótido codificando a mutação desejada com um ADN molde, onde o molde é a forma de cadeia simples do plasmídeo contendo a sequência de ADN inalterada ou de tipo selvagem para hGH. Após hibridação é utilizada uma ADN-polimerase para sintetizar a segunda cadeia complementar inteira do molde que incorpora assim o iniciador oligonucleotídico e codifica para a alteração seleccionada no gene de hGH.

Geralmente, são utilizados oligonucleótidos de pelo menos 25 nucleótidos de comprimento. Embora possam ser empregues oligonucleótidos menores, um oligonucleótido óptimo tem 12 a 15 nucleótidos que são complementares ao molde de cada lado do(s) nucleótido(s) codificando para a mutação. Isto assegura que o oligonucleótido hibride correctamente com a molécula de ADN molde de cadeia simples. Os oligonucleótidos são facilmente sintetizados utilizando técnicas conhecidas na arte tais como as descritas por Crea *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5765 (1978).

O ADN molde pode apenas ser gerado através dos vectores que sejam derivados de vectores do bacteriófago M13 (os vectores comercialmente disponíveis M13mp18 e M13mp19 são adequados), ou dos vectores que contêm uma origem de replicação do fago de cadeia simples tal como descrito por Vieira e Messing, *Meth. Enzymol.* 153: 3-11 (1987). Assim, o ADN a mutar tem de ser inserido num destes vectores para criar um molde cadeia simples. A produção do molde de cadeia simples é descrita nas secções 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, *supra*.

Para alterar a sequência de ADN de tipo selvagem, o oligonucleótido é hibridado com o molde de cadeia simples sob condições de hibridação adequadas. Uma enzima de polimerização de ADN, normalmente o fragmento Klenow da ADN-polimerase I, é então adicionada para sintetizar a cadeia complementar do molde utilizando o oligonucleótido como iniciador para a síntese. Forma-se assim uma molécula de heterodúplex em que uma cadeia de ADN codifica a forma mutada do gene de hGH e a outra cadeia (o molde original) codifica a sequência de tipo selvagem inalterada do gene de hGH. Esta molécula de heterodúplex é então transformada para uma célula hospedeira adequada, normalmente um procariota tal como *E. coli* JM101. Após se crescerem as células, estas são plaqueadas em placas de agarose e pesquisadas utilizando os iniciadores oligonucleotídicos radiomarcados com Fosfato-32 para identificar as colónias bacterianas que contêm o ADN mutado.

O método descrito imediatamente acima pode ser modificado para que seja criada uma molécula de homodúplex em que ambas as cadeias do plasmídeo contenham a mutação ou mutações. As modificações são como se segue: O oligonucleótido de cadeia

simples é ligado ao molde de cadeia simples tal como descrito acima. Uma mistura de três desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) e desoxirribotimidina (dTTP) é combinada com uma tiodesoxirribocitosina chamada dCTP-(aS) (que pode ser obtida em Amersham). Esta mistura é adicionada ao complexo molde-oligonucleótido. Após adição de ADN-polimerase a esta mistura, é gerada uma cadeia de ADN idêntica à do molde excepto quanto às bases mutadas. Adicionalmente, esta nova cadeia de ADN contém dCTP-(AS) em vez de dCTP, o que serve para a proteger de digestão por endonucleases de restrição. Após a cadeia molde do heterodúplex de cadeia dupla ser cortada com a enzima de restrição apropriada, a cadeia molde pode ser digerida com nuclease *ExoIII* ou outra nuclease apropriada a seguir à região que contém o local ou locais a mutar. A reacção é então parada para deixar uma molécula que é apenas parcialmente de cadeia simples. É então formado um homodúplex de ADN de cadeia dupla completo utilizando ADN-polimerase na presença de todos os quatro desoxirribonucleótidos-trifosfato, ATP e ADN-ligase. Esta molécula de homodúplex pode então ser transformada para uma célula hospedeira adequada tal como *E. coli* JM101, tal como descrito acima.

Mutantes com mais de um aminoácido a substituir podem ser gerados num de vários modos. Se os aminoácidos se situarem próximos na cadeia polipeptídica, podem ser mutados simultaneamente utilizando um oligonucleótido que codifique para todas as substituições de aminoácidos desejadas. Se, no entanto, os aminoácidos se situarem a alguma distância uns dos outros (separados por mais de cerca de dez aminoácidos), é mais difícil gerar um único oligonucleótido que codifique todas as mudanças desejadas. Em vez disso, pode ser empregue um de dois métodos alternativos.

No primeiro método, é gerado um oligonucleótido separado para cada aminoácido a substituir. Os oligonucleótidos são então ligados ao ADN molde de cadeia simples simultaneamente e a segunda cadeia de ADN que é sintetizada a partir do molde codifica todas as substituições de aminoácidos desejadas. O método alternativo envolve dois ou mais ciclos de mutagénesis para produzir o mutante desejado. O primeiro ciclo é tal como descrito para os mutantes simples: é utilizado ADN de tipo

selvagem para o molde, um oligonucleótido codificando a primeira ou primeiras substituições de aminoácidos desejadas é ligado a este molde e é então gerada a molécula de ADN de heterodúplex. O segundo ciclo de mutagénese utiliza o ADN mutado produzido no primeiro ciclo de mutagénese como molde. Assim, este molde contém já uma ou mais mutações. O oligonucleótido codificando a substituição ou substituições de aminoácidos desejadas adicionais é então ligado a este molde, e a cadeia de ADN resultante codifica agora mutações de ambos o primeiro e segundo ciclos de mutagénese. Este ADN resultante pode ser utilizado como molde num terceiro ciclo de mutagénese e por aí adiante.

A mutagénese de cassette é também um método preferido para preparação de variantes do ADN de hGH de substituição, deleção e inserção. O método baseia-se no descrito por Wells *et al.*, *Gene, supra*. O material de partida é o plasmídeo (ou outro vector) compreendendo o gene de hGH a mutar. É identificado o codão ou codões a mutar no gene de hGH. Optimamente, existe um único local de endonuclease de restrição de cada lado do local ou locais de mutação identificados; no entanto, isto não é um requisito. Se não existirem tais locais de restrição, estes podem ser criados utilizando o método de mutagénese mediada por oligonucleótidos acima descrito para os introduzir em locais apropriados no gene de hGH. Após terem sido introduzidos no plasmídeo os locais de restrição, o plasmídeo é cortado nestes locais para ser linearizado. Um oligonucleótido de cadeia dupla codificando a sequência do ADN entre os locais de restrição mas contendo a mutação ou mutações desejadas é sintetizado utilizando procedimentos padrão. As duas cadeias são sintetizadas separadamente e depois hibridadas umas com as outras utilizando técnicas padrão. Este oligonucleótido de cadeia dupla é referido como a cassette. Esta cassette é desenhada para ter extremidades 3' e 5' que sejam compatíveis com as extremidades do plasmídeo linearizado, para que esta possa ser directamente ligada ao plasmídeo. Este plasmídeo contém agora a sequência de ADN mutada de hGH.

Para preparação da molécula receptora e para a ligar ao fagemídeo, o receptor purificado é ligado a uma matriz adequada tal como contas de agarose, contas de acrilamida,

contas de vidro, celulose, vários copolímeros acrílicos, géis de hidroxialquilmetacrilato, ácido poliacrílico, copolímeros polimetacrílicos, *nylon*, transportadores neutros e iónicos e semelhantes. A ligação do receptor à matriz pode ser alcançada através de métodos descritos em *Meth. Enzymol.* 44: ? (1976) ou através de outros meios conhecidos na arte.

Após ligação do receptor à matriz, o alvo imobilizado é posto em contacto com a biblioteca de partículas de fagemídeo sob condições adequadas para ligação de pelo menos uma porção das partículas de fagemídeo com o alvo imobilizado. Normalmente, as condições, incluindo pH, força iónica, temperatura e semelhantes imitam as condições fisiológicas.

As partículas de fagemídeo ligadas ("ligantes") que possuem elevada afinidade para o receptor imobilizado são separadas das que possuem uma baixa afinidade (e assim não se ligam ao alvo) através de lavagem. Os ligantes podem ser dissociados do alvo imobilizado através de uma variedade de métodos. Estes métodos incluem dissociação competitiva utilizando o ligando de tipo selvagem, alterando o pH e/ou a força iónica, e métodos conhecidos na arte.

Células hospedeiras adequadas são infectadas com os ligantes e o fago ajudante, e as células hospedeiras são cultivadas sob condições adequadas para amplificação das partículas de fagemídeo. As partículas de fagemídeo são então recolhidas e o processo de selecção é repetido uma ou mais vezes até serem seleccionados ligantes com a afinidade desejada para a molécula alvo.

Opcionalmente, a biblioteca de partículas de fagemídeo pode ser sequencialmente posta em contacto com mais de um receptor imobilizado para melhorar a selectividade para um determinado receptor. Assim, hGH tem mais de um receptor natural: o receptor de GH e o receptor da prolactina. Pode ser desejável melhorar a selectividade de hGH para o receptor de GH em relação ao receptor da prolactina. Isto pode ser alcançado pondo primeiro a biblioteca de partículas de fagemídeo em contacto com o receptor de GH imobilizado, permitindo que ocorra ligação na presença de uma concentração muito elevada de receptor da prolactina em solução e

seleccionando os ligantes. Neste caso, um mutante de hGH com uma afinidade mais baixa para o receptor de prolactina teria utilidade terapêutica mesmo que a afinidade para o receptor de GH fosse de algum modo inferior à da hGH de tipo selvagem.

Produção de Variantes de hGH

As variantes de hGH do presente invento podem ser convenientemente produzidas através de técnicas recombinantes padrão. Mais especificamente, uma variante de hGH pode ser expressa utilizando um sistema vector-célula hospedeira, tal como descrito acima na discussão da pesquisa com alanina.

Numa concretização, é utilizado um fagemídeo do presente invento para produzir uma variante de hGH isenta de proteína fágica. Por exemplo, pS0643 e derivados podem ser simplesmente criados numa estirpe não supressora tal como 16C9. Neste caso, o codão âmbar (TAG) conduz à terminação da tradução, que produz hormona livre. A variante de hGH é segregada da célula hospedeira e pode ser isolada a partir do meio de cultura tal como descrito abaixo.

As células hospedeiras contendo um vector de expressão da variante de hGH são cultivadas sob condições adequadas para crescimento celular e para expressão da variante de hGH. Em particular, o meio de cultura contém nutrientes apropriados e factores de crescimento para a célula hospedeira empregue. Os nutrientes e factores de crescimento necessários para o crescimento de uma célula hospedeira seleccionada são, em muitos casos, bem conhecidos ou podem ser facilmente determinados empiricamente pelos peritos na arte. Condições de cultura adequadas para células hospedeiras de mamífero, por exemplo, estão descritas em Mammalian cell Culture (Mather, J.P. ed., Plenum Press, 1984) e Barnes e Sato, *Cell* 22: 649 (1980).

Adicionalmente, as condições de cultura devem permitir a transcrição, tradução e transporte da proteína entre os compartimentos celulares. Os factores que afectam estes processos são bem conhecidos e incluem, por exemplo, número de cópias de ADN/ARN; factores que estabilizam o ARN; nutrientes, suplementos e indutores ou repressores da transcrição

presentes no meio de cultura; temperatura, pH e osmolalidade da cultura; e densidade celular. O ajuste destes factores para promover a expressão num determinado sistema vector-célula hospedeira está dentro do nível de perícia na arte.

O procedimento de cultura celular empregue na produção de uma variante de hGH do presente invento pode ser qualquer um de vários procedimentos bem conhecidos para produção de proteínas em grande ou pequena escala. Estes incluem, mas não se limitam à utilização de: um biorreactor de leito fluidificado, um biorreactor de fibra oca, um sistema de cultura em garrafas rolantes e um sistema de biorreactor de tanque agitado. Um variante de hGH pode ser produzida, por exemplo, num processo em modo de fornadas, fornadas alimentadas ou contínuo.

Os métodos para recuperação de proteínas recombinantes produzidas tal como descrito acima são bem conhecidos e variam dependendo do sistema de expressão empregue. Por exemplo, se, tal como é típico, o vector de expressão contiver uma sequência sinal, a variante de hGH é recuperada do meio de cultura ou do periplasma. Convenientemente, a variante é segregada para o espaço periplasmático como uma proteína completamente processada (*i.e.*, sem a sequência sinal de secreção). No entanto, a variante de hGH pode também ser expressa intracelularmente e recuperada a partir de lisados celulares.

A variante de hGH pode ser purificada a partir do meio de cultura ou de um lisado celular através de qualquer método capaz de separar a variante dos componentes da célula hospedeira ou do meio de cultura. Tipicamente a variante de hGH é separada dos componentes da célula hospedeira e/ou do meio de cultura que interfeririam com a "PEGuilação", se desejado, ou com a utilização de diagnóstico ou terapêutica da variante de hGH.

Como primeiro passo, o meio de cultura ou o lisado celular é normalmente centrifugado ou filtrado para remover os restos celulares. O sobrenadante é então tipicamente concentrado ou diluído até um volume desejado ou diafiltrado para um tampão adequado para condicionar a preparação para

mais purificação. Posterior purificação da variante de hGH inclui tipicamente a separação das formas desamidadas e cortadas da variante de hGH da forma intacta. Por exemplo, a variante de hGH intacta pode ser separada da variante des-phe-hGH, que não tem a fenilalanina N-terminal.

Numa variação desta concretização, a variante de hGH é purificada (1) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de uma sequência de aminoácidos N-terminal ou interna, utilizando um sequenciador de copo giratório, ou (2) até à homogeneidade através de SDS-PAGE sob condições não redutoras ou redutoras utilizando corante azul de Coomassie.

Qualquer um dos seguintes procedimentos exemplares pode ser empregue para purificação de uma variante de hGH: cromatografia de afinidade; cromatografia de permuta aniónica ou catiónica (utilizando, p.ex., DEAE-SEPHAROSE); cromatografia em sílica; HPLC de fase reversa; filtração em gel (utilizando, p.ex., SEPHADEX G-75); cromatografia de interacção hidrófoba; cromatografia metal-quelato; ultrafiltração/diafiltração; precipitação com etanol; precipitação com sulfato de amónio; cromatofocagem; e cromatografia de deslocamento. Protocolos exemplares para purificação de variantes de hGH (B2036 e B2024), utilizando uma combinação de cromatografia de permuta aniónica e cromatografia de interacção hidrófoba, são expostos nos Exemplos V e VI.

Modificação de Variantes de hGH

O presente invento proporciona variantes de hGH covalentemente ligadas (daqui em diante “conjugadas”) a um ou mais grupos químicos. Tal conjugação produz um conjugado de variante de hGH com um peso molecular real superior ao da variante de hGH não modificada. Tal como aqui se utiliza, o termo “peso molecular real” refere-se ao peso molecular, tal como medido através de espectrometria de massa (p.ex., espectrometria de massa de ionização/dessorção por laser assistida por matriz). O peso molecular real do conjugado de variante de hGH é normalmente de pelo menos cerca de 30 kD; de preferência, no intervalo de cerca de 35 kD a cerca de 55 kD; e de maior preferência, no intervalo de cerca de 40 kD a cerca

de 50 kD. Geralmente, o peso molecular real do conjugado de variante de hGH não excede 100 kD.

Os grupos químicos adequados para utilizar num conjugado de variante de hGH do presente invento não são de preferência significativamente tóxicos nem imunogénicos, *i.e.*, qualquer toxicidade ou imunogenicidade observada com um conjugado de variante de hGH não é significativamente (*i.e.*, menos de 50%) superior a qualquer toxicidade ou imunogenicidade observada com a variante de hGH não modificada correspondente. Tipicamente, é seleccionado um grupo químico que reduz a toxicidade e/ou a imunogenicidade associadas à variante de hGH não modificada. Adicionalmente, o grupo químico é convenientemente seleccionado para produzir um conjugado de variante de hGH que possa ser armazenado e utilizado sob condições adequadas para armazenamento e utilização da variante de hGH não modificada. Grupos químicos exemplares incluem hidratos de carbono, tais como, por exemplo, os hidratos de carbono que ocorrem naturalmente em glicoproteínas e polímeros não proteínáceos, tais como polióis.

Um poliol, por exemplo, pode ser conjugado com uma molécula variante de hGH num ou mais resíduos de aminoácidos, incluindo resíduos de lisina, tal como divulgado em WO 93/00109, *supra*. O poliol empregue pode ser qualquer polímero de poli(óxido de alquilenos) solúvel em água e pode ter uma cadeia linear ou ramificada. Polióis adequados incluem os substituídos numa ou mais posições hidroxilo com um grupo químico, tal como um grupo alquilo possuindo entre um e quatro carbonos. Tipicamente, o poliol é um poli(alquilenoglicol), tal como polietilenoglicol (PEG) e assim, para facilidade de descrição, o resto da discussão refere-se a uma concretização exemplar em que o poliol empregue é PEG e o processo de conjugação do poliol com uma variante de hGH é designado "PEGuilação". No entanto, os peritos na arte reconhecem que outros polióis, tais como, por exemplo copolímeros poli(propilenoglicol) e polietileno-polipropilenoglicol, podem ser empregues utilizando as técnicas para conjugação aqui descritas para PEG.

O peso molecular médio do PEG pode variar de cerca de 500 a cerca de 30000 daltons (D); de preferência, de cerca de 1000

a cerca de 25000 D; e de maior preferência, de cerca de 4000 a cerca de 20000 D. Numa concretização, a "PEGuilação" é efectuada com PEG possuindo um peso molecular médio de cerca de 5000 D (daqui em diante "PEG(5000)"). Tal como discutido abaixo e no Exemplo VII, as condições reaccionais são ajustadas para maximizar a produção de moléculas variantes de hGH conjugadas com entre cerca de quatro e cerca de seis moléculas de PEG(5000). Noutra concretização, a "PEGuilação" é efectuada com PEG possuindo um peso molecular médio de cerca de 20000 D sob condições ajustadas para maximizar a produção de moléculas de hGH conjugadas com uma molécula de PEG(20000). Ver Exemplo VIII. Numa variação desta concretização, é empregue um PEG de cadeia ramificada com duas cadeias de cerca de 10000 D cada. Ver Exemplo IX.

As preparações de PEG que estão comercialmente disponíveis e são adequadas para utilizar no presente invento, são preparações não homogéneas que são vendidas de acordo com o peso molecular médio. Por exemplo, as preparações de PEG(5000) contêm tipicamente moléculas que variam ligeiramente no peso molecular, normalmente ± 500 D.

Foi descrita uma variedade de métodos para "PEGuilação" de proteínas. Ver, p. ex., Patente U.S. Nº 4179337 (concedida a Davis *et al.*) divulgando a conjugação de várias hormonas e enzimas com PEG e polipropilenoglicol para produzir composições não imunogénicas fisiologicamente activas. Geralmente, um PEG possuindo pelo menos um grupo hidroxil terminal é feito reagir com um agente de conjugação para formar um PEG activado possuindo um grupo reactivo terminal. *Id.* Este grupo reactivo pode então reagir com as α - e ϵ -aminas das proteínas para formar uma ligação covalente. Convenientemente, a outra extremidade da molécula de PEG pode ser "bloqueada" com um grupo químico não reactivo, tal como um grupo metoxi, para reduzir a formação de complexos de moléculas proteicas ligadas de forma cruzada por PEG.

Para "PEGuilação" de uma variante de hGH, o PEG activado é um que possa reagir com a variante sob condições que não quebrem a actividade de ligação no Local 1. Para variantes de hGH agonistas, a actividade de ligação ao Local 2 tem de ser também conservada. Para além disso, para variantes de hGH

agonistas e antagonistas, são normalmente evitados PEG activados que introduzam um grupo de ligação tóxico no conjugado.

PEG adequados podem ser produzidos através de várias reacções convencionais. Por exemplo, pode ser preparado um éster N-hidroxissuccinimida de um PEG (M-NHS-PEG) a partir do éter PEG-monometílico (que está comercialmente disponível em Union Carbide) através de reacção com N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e N-hidroxissuccinimida (NHS), de acordo com o método de Buckmann e Merr, *Makromol. Chem.* 182: 1379-1384 (1981).

Adicionalmente, um grupo hidroxil terminal de PEG pode ser convertido num grupo amino, por exemplo, através da reacção com brometo de tionilo para formar PEG-Br, seguido de aminólise com excesso de amónia para formar PEG-NH₂. O PEG-NH₂ é então conjugado com a proteína de interesse utilizando reagentes de conjugação padrão, tais como Reagente K de Woodward. Para além disso, um grupo -CH₂OH terminal de PEG pode ser convertido num grupo aldeído, por exemplo, através de oxidação com MnO₂. O grupo aldeído é conjugado com a proteína através de alquilação redutora com um reagente tal como cianoboro-hidreto.

Alternativamente, os PEG activados adequados para utilizar no presente invento podem ser adquiridos em vários vendedores. Por exemplo, Sherwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL) vende M-NHS-PEG como "SCM-PEG" para além de um succinimidilcarbonato de metoxi-PEG ("SC-PEG") e metoxi-PEG succinimidilpropionato ("SPA-PEG"); daqui em diante referido como "M-SPA-PEG" para indicar a presença do grupo de bloqueio metoxi). A utilização de M-SPA-PEG para "PEGuilar" a variante B2036 está exposta nos Exemplos VII e VIII. A Shearwater Polymers também vende um PEG de cadeia ramificada possuindo duas cadeias de 10000 D (daqui em diante "NHS-PEG2(20000)", cuja utilização está descrita no Exemplo IX.

O grau de "PEGuilação" de uma variante de hGH do presente invento pode ser ajustado para proporcionar um aumento desejável na semivida *in vivo* (daqui em diante "semivida") em comparação com a proteína não "PEGuilada" correspondente. Crê-

se que a semivida de uma variante de hGH "PEGuilada" aumente tipicamente de forma crescente com o aumento do grau de "PEGuilação". Em estudos de hGH de tipo selvagem "PEGuilada", os Requerentes observaram que um conjugado de hGH de tipo selvagem contendo dois grupos de PEG(5000) tinha uma semivida cerca de 4 vezes maior em ratos que a proteína não "PEGuilada", um conjugado contendo cinco grupos de PEG(5000) tinha uma semivida cerca de 11 vezes maior e um conjugado contendo sete grupos de PEG tinha uma semivida 18 vezes maior. Os pesos moleculares reais desses conjugados PEG-hGH de tipo selvagem eram aproximadamente de 33, 48 e 57 kD, respectivamente, em comparação com 22 kD para a proteína não "PEGuilada".

A maiores graus de "PEGuilação", crê-se que o aumento na semivida de uma variante de hGH "PEGuilada" seja parcialmente desfasado por um aumento da constante de dissociação (K_d) para a ligação no Local 1, indicando uma diminuição na afinidade para o Local 1. Crê-se que esta diminuição na afinidade seja acompanhada por uma diminuição correspondente na potência, que se reflecte num aumento da concentração de conjugado necessária para um efeito máximo a 50% (CE_{50}). Em estudos de hGH de tipo selvagem "PEGuilada" com PEG(5000), um conjugado contendo dois grupos de PEG(5000) tem uma potência cerca de 3 vezes menor num ensaio de dimerização com base em células que a proteína não "PEGuilada", um conjugado contendo cinco grupos de PEG(5000) tem uma potência cerca de 170 vezes menor e um conjugado contendo sete grupos de PEG tem uma potência cerca de 1500 vezes menor.

Como a ligação no Local 1 é essencial para as variantes de hGH agonistas e antagonistas do presente invento, uma maior "PEGuilação" reduz a potência de ambos os tipos de variantes de hGH. No entanto, o aumento da semivida geralmente compensa a redução da potência, de forma que se crê actualmente que a eficácia *in vivo* de variantes de hGH "PEGuiladas" seja comparável ou melhor que a observada com as proteínas não "PEGuiladas" correspondentes. Em concordância, um perito na arte pode facilmente determinar um grau adequado de "PEGuilação" para uma variante de hGH para produzir um conjugado possuindo uma desejável semivida aumentada, em

comparação com a proteína não "PEGuilada", mantendo ainda uma potência suficiente para ser eficaz *in vivo*.

Normalmente, a semivida é aumentada pelo menos cerca de cinco vezes; de preferência, pelo menos cerca de 10 vezes; sendo ainda preferível, pelo menos cerca de 50 vezes; e ainda de maior preferência pelo menos cerca de 100 vezes. Adicionalmente, o grau e locais de "PEGuilação" são tais que o conjugado PEG-variante de hGH é capaz de se ligar ao receptor de hGH no Local 1, tipicamente com uma K_d de cerca de 400 nM ou menor; de preferência, com uma K_d de 150 nM ou menor; e de maior preferência, com uma K_d de 100 nM ou menor, tal como medida através de um ensaio de ligação em equilíbrio, tal como o descrito em Spencer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263: 7862-7867 (1988).

Os conjugados PEG-variante de hGH agonistas do presente invento são capazes de se ligar no Local 2 bem como no Local 1, dimerizando assim os receptores de hGH. A capacidade de dimerização pode ser medida, por exemplo, através de homoeextinção de fluorescência, de acordo com o método de Cunningham *et al.*, *Science* 254: 821-825 (1991), ou num ensaio de dimerização com base em células, tal como o descrito em Fuh *et al.*, *Science* 256: 1677-1680 (1992), e nos Exemplos XI e XII. Convenientemente, a CE_{50} para variantes de hGH agonistas "PEGuiladas", tal como medida no ensaio de dimerização com base em células de Fuh *et al.*, é de cerca de 100 nM ou menor e de preferência, cerca de 50 nM ou menor. (A CE_{50} é tipicamente inferior à K_d , presumivelmente porque apenas uma fracção dos receptores de hGH disponíveis necessita de ser dimerizada para provocar uma resposta máxima). As variantes de hGH "PEGuiladas" que verificam estes critérios têm um peso molecular real de pelo menos cerca de 40 kD. Conjugados exemplares incluem conjugados possuindo cerca de quatro a seis, e de preferência, cinco, moléculas de PEG(5000) por molécula de variante de hGH e conjugados possuindo uma molécula de PEG(20000) por molécula de variante de hGH.

O grau e locais de "PEGuilação" de uma proteína são determinados (1) pelo número e reactividades dos locais de "PEGuilação" (*i.e.*, aminas primárias) e (2) pelas condições da reacção de "PEGuilação". A hGH de tipo selvagem contém dez

aminas primárias que estão teoricamente disponíveis para reagir com um PEG activo: o grupo α -amino da fenilalanina N-terminal e os grupos ϵ -amino de nove lisinas. No entanto, como algumas das aminas primárias em hGH e nas variantes de hGH são relativamente não reactivas, as reacções de "PEGuilação" padrão resultam tipicamente em menos que "PEGuilação" completa (p. ex., sete ou oito PEG por molécula para hGH de tipo selvagem).

Os locais de "PEGuilação" de uma proteína são também de algum modo constrangidos pelas reactividades das várias aminas primárias. Por exemplo, uma potencial lisina na interface de ligação hormona-receptor do Local 1 da variante B2036 (K41) é relativamente não reactiva com M-SPA-PEG(5000). Ver Exemplo X. Assim, preparações da variante B2036 moderadamente "PEGuilada", possuindo na ordem de quatro a seis PEG por molécula de variante, mantêm a capacidade de se ligar ao receptor de hGH no Local 1, apesar da presença de um potencial local de "PEGuilação" nesta interface de ligação.

Podem ser utilizadas técnicas de mutagénese padrão para alterar o número de lisinas na proteína. Assim, até ao ponto em que substituições de aminoácidos introduzem ou substituem lisinas, as variantes de hGH do presente invento podem conter um maior ou menor número de potenciais locais de "PEGuilação" que a hGH de tipo selvagem. A variante B2036 contém nove potenciais locais de "PEGuilação", um menos que a hGH de tipo selvagem, enquanto a variante B2024 que não faz parte do presente invento contém dez locais potenciais.

Para além disso, as substituições de aminoácidos que introduzem ou substituem lisinas alteram as localizações de potenciais locais de "PEGuilação". Por exemplo, na variante B2036, as substituições K168A e K172R reduzem o número de locais disponíveis para "PEGuilação" na interface de ligação hormona-receptor do Local 1. A substituição de G120 por um aminoácido diferente desfaz a ligação de hGH ao Local 2, convertendo a molécula num antagonista de hGH. A substituição de glicina por lisina nesta posição proporciona um potencial local de "PEGuilação" adicional no Local 2, que se espera impedir qualquer ligação residual neste local. As

reactividades das aminas primárias na variante B2036 são mostradas no Exemplo X.

O grau e locais de "PEGuilação" podem também ser manipulados ajustando as condições reaccionais, tais como as concentrações relativas do PEG activado e da proteína bem como o pH. As condições adequadas para um grau desejado de "PEGuilação" podem ser determinadas empiricamente. Resumidamente, são estabelecidas reacções padrão de "PEGuilação" nas quais são variados os parâmetros acima observados. Por exemplo, reacções de "PEGuilação" da variante de hGH (contendo 10 mg/ml de variante de hGH em tampão borato de sódio 0,05 M, pH 8,5) nas quais o número de equivalentes de M-NHS-PEG(5000) por grupo amino livre é variado entre um e três produzem as preparações mostradas abaixo:

<u>Preparação</u>	<u>Moléculas de PEG(5000)/Molécula de Variante de hGH</u>
1	2, 3, 4, 5
2	3, 4, 5, 6
3	4, 5, 6, 7

(Tal como utilizado em referência ao PEG activado, a frase "equivalente por grupo amino livre" refere-se a uma quantidade molar de PEG activado igual à quantidade molar da molécula a "PEGuilar" multiplicado pelo número de aminas livres na molécula). Em preparações sujeitas a "PEGuilação" limitada (tal como na preparação 1), a proteína é "PEGuilada" nos locais mais reactivos, enquanto que, se a "PEGuilação" for mais extensa (tal como na preparação 3), locais menos reactivos são também "PEGuilados".

A "PEGuilação" de variantes de hGH, tais como B2036, é efectuada através de qualquer método conveniente. Numa concretização exemplar, as variantes de hGH são "PEGuiladas" com M-SPA-PEG(5000). Ver, Exemplo VII. Resumidamente, é adicionado SPA-PEG(5000) sólido, com agitação, a uma solução aquosa de variante de hGH à temperatura ambiente. Tipicamente, a solução aquosa é tamponada com um tampão possuindo um pK_a próximo do pH ao qual se realiza a reacção (geralmente cerca de pH 4-10). Exemplos de tampões adequados para "PEGuilação" a pH 7,5, por exemplo, incluem HEPES, fosfato, borato, Tris-HCl,

EPPS e TES. O pH é continuamente monitorizado e ajustado se necessário. A reacção é deixada prosseguir durante cerca de uma a cerca de duas horas.

Os produtos da reacção são então sujeitos a cromatografia de interacção hidrófoba para seleccionar as variantes de hGH "PEGuiladas" de M-SPA-PEG(5000) livre e de quaisquer complexos de elevado peso molecular da variante de hGH "PEGuilada" (Complexos de elevado peso molecular surgem quando PEG desbloqueado é activado em ambas as extremidades da molécula, ligando de forma cruzada moléculas da variante de hGH). As condições durante a cromatografia de interacção hidrófoba são tais que M-SPA-PEG(5000) livre flui através da coluna, enquanto que quaisquer complexos de variante de hGH "PEGuilada" ligados de forma cruzada eluem após as formas desejadas, que contêm uma molécula de variante de hGH conjugada com um ou mais grupos de PEG. As condições adequadas variam dependendo dos tamanhos relativos dos complexos ligados de forma cruzada *versus* os conjugados desejados e são facilmente determinadas pelos peritos na arte. O eluente contendo os conjugados desejados é concentrado por ultrafiltração e dessalgado por diafiltração.

Esta preparação representa uma mistura heterogénea de conjugados PEG-variante de hGH possuindo entre três e seis grupos de PEG por molécula de variante de hGH. Numa concretização, esta mistura é sujeita a um passo de purificação adicional que produz uma preparação mais homogénea de variantes de hGH "PEGuiladas". Mais especificamente, a mistura é sujeita a cromatografia de permuta catiónica para fraccionar as variantes de hGH "PEGuiladas" de acordo com a extensão de "PEGuilação". As condições são tais que as variantes de hGH mais altamente "PEGuiladas" possuindo um número maior de grupos de PEG eluem inicialmente no gradiente.

Deste modo, é possível obter um banco de variantes de hGH "PEGuiladas" contendo primariamente uma ou duas formas. Tal como utilizado daqui em diante, uma "forma" de uma variante de hGH "PEGuilada" é um conjugado PEG-variante de hGH contendo um determinado número de grupos de PEG. Em concordância, diferentes "formas" de uma variante de hGH "PEGuilada" têm diferentes números de grupos de PEG conjugados com a mesma

variante de hGH. Numa concretização exemplar, obtém-se um banco de variantes de hGH "PEGuiladas" que contém primariamente duas formas, nomeadamente conjugados possuindo 4 ou 5 PEG por molécula de variante de hGH (daqui em diante uma "preparação de 4/5 PEG-variante de hGH"). Este banco pode então ser concentrado, dessalgado e formulado para administração, tal como discutido abaixo.

Uma composição contendo uma variante de hGH "PEGuilada" para utilizar numa formulação terapêutica pode ser heterogénea ou homogénea, *i.e.*, contendo uma única forma de PEG-hGH. Tipicamente, a composição contém pelo menos 70% de uma ou duas formas de conjugados PEG-variante de hGH; de preferência, pelo menos 80% de uma ou duas formas; sendo preferível, pelo menos 90% de uma ou duas formas.

Formulações Terapêuticas

As formulações das variantes de hGH do presente invento para administração terapêutica são preparadas para armazenamento através da mistura de uma variante de hGH possuindo o grau de pureza desejado com um transportador, excipiente ou estabilizador farmacologicamente aceitável opcional (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a Edição, Oslo, A., Ed., [1980]) na forma de um bolo liofilizado ou uma solução aquosa. Formulações parentéricas podem ser preparadas através da mistura da variante de hGH numa forma injectável de dosagem unitária (solução, suspensão ou emulsão) com um transportador farmacologicamente aceitável. Os transportadores, excipientes ou estabilizadores farmacologicamente aceitáveis são não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregues e são compatíveis com outros ingredientes da formulação. Por exemplo, a formulação de preferência não inclui agentes oxidantes nem outros compostos que se saiba serem deletérios para polipéptidos.

Transportadores adequados incluem tampões contendo fosfato, borato, HEPES, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona;

aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono, incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; iões metálicos bivalentes tais como zinco, cobalto ou cobre; álcoois de açúcares tais como manitol ou sorbitol; contra-iões formadores de sais tais como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como Tween, Pluronic ou PEG.

As formulações do presente invento podem adicionalmente conter um tampão, aminoácido, agente espessante e/ou tensioactivo não iónico farmacologicamente aceitável. Estes incluem, por exemplo, tampões, agentes quelantes, antioxidantes, conservantes, co-solventes e semelhantes; exemplos específicos destes podem incluir sais de trimetilamina (tampão Tris) e edetato dissódico.

Adicionalmente, pode ser empregue a formulação de GH exposta em WO 89/09614, em que a variante de hGH está contida numa composição compreendendo glicina, manitol e um tampão, tal como um tampão fosfato. Uma versão exemplar desta formulação é: 0,68 g/l de glicina, 18,0 g/l de manitol, fosfato de sódio 5 mM, pH 7,4. Alternativamente, a variante de hGH pode ser contida numa formulação líquida que não contém necessariamente manitol ou glicina e compreende 0,1 a 5% (p/v) de um tensioactivo não iónico, tal como polissorbato ou um poloxâmico. Uma versão exemplar desta formulação é: 5 mg/ml de variante de hGH, 8,77 mg/ml de NaCl, 2,5 mg/ml de fenol, 2,0 mg/ml de polissorbato 20 e citrato de sódio 10 mM, pH 6,0.

A variante de hGH é também adequadamente administrada através de sistemas de libertação constante. Exemplos adequados de composições de libertação constante incluem matrizes poliméricas semi-permeáveis na forma de artigos com forma, p. ex., películas ou microcápsulas. As matrizes de libertação constante incluem polilactidos (Pat. U.S. N.º 3773919, EP 58481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato (U. Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22: 547-556 [1983]), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 [1981]); Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105 [1982]), etilenovinil-acetato (Langer *et al.*, *supra*) ou ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133988).

Composições de variante de hGH de libertação constante incluem também variantes de hGH aprisionadas lipossomicamente. Lipossomas contendo variantes de hGH são preparados através de métodos conhecidos *per se*: DE 3218121; Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949; EP 142641; Ped. Pat. Japonesa 83-118008; Pat. U.S. N^{os} 4485045 e 4544545; e EP 102324. Vulgarmente, os lipossomas são do tipo unilamelar pequeno (cerca de 200-800 Angstroms) nos quais o teor lipídico é superior a cerca de 30 mol. por cento de colesterol, sendo a proporção seleccionada ajustada para a terapia de variante de hGH óptima.

A variante de hGH pode também ser formulada para administração local. As formulações adequadas variam dependendo do local de administração e não diferem das conhecidas na arte. Por exemplo, hGH pode ser formulada numa solução salina equilibrada para administração no olho.

A formulação de variante de hGH para administração terapêutica é estéril. A esterilidade é facilmente alcançada por filtração através de membranas de filtração estéreis (p.ex., membranas de 0,2 micrómetros). As composições de variante de hGH terapêuticas são geralmente colocadas num recipiente com uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa com uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

As variantes de hGH são vulgarmente armazenadas em recipientes de doses unitárias ou múltiplas, por exemplo, ampolas ou frascos selados, como uma solução aquosa ou como uma formulação liofilizada para reconstituição. Como exemplo de uma formulação liofilizada, são enchidos frascos de 5 ml com 2 ml de solução aquosa de variante de hGH a 0,5% (p/v) esterilizada por filtração e a mistura resultante é liofilizada. A solução de infusão é preparada através da reconstituição da variante de hGH liofilizada utilizando água para injeção bacteriostática e semelhantes.

A formulação de variantes de hGH "PEGuiladas" do presente invento é efectuada tal como descrito acima para variantes de hGH em geral.

Utilizações Terapêuticas

O presente invento inclui variantes que actuam como agonistas de hGH e variantes que actuam como antagonistas de hGH, estas últimas contendo uma mutação disruptiva do Local 2. As variantes de hGH agonistas são úteis no aumento do anabolismo ou crescimento de um mamífero. O crescimento refere-se à dinâmica de crescimento da estatura experimentada por um indivíduo durante a primeira infância, infância e adolescência tal como representado por uma curva normal de crescimento. Assim, crescimento aqui refere-se ao crescimento da placa óssea de produção linear conduzido por condrócitos, distinto do crescimento de osteoblastos derivados de uma parte diferente do osso. A restauração de padrões normais de crescimento permitiria ao paciente aproximar-se de uma curva de crescimento mais satisfatória. Exemplos de pacientes que são relativamente resistentes a GH mas requerem tratamento para induzir um efeito anabólico incluem aqueles com Síndrome de Turner, crianças deficientes em GH, crianças que experimentam um abrandamento ou atraso na sua curva normal de crescimento cerca de 2-3 anos antes do fecho da sua placa de crescimento, isto é, as chamadas crianças normais pequenas e pacientes onde a resposta do factor de crescimento I semelhante à insulina (IGF-I) a GH foi quimicamente bloqueada (*i.e.*, através de tratamento com glucocorticóides) ou através de uma condição natural tal como em pacientes adultos onde a resposta de IGF-I a GH é naturalmente reduzida.

Distúrbios imunitários são também passíveis de tratamento com variantes de hGH agonistas do presente invento. A expressão "distúrbio imunitário" inclui qualquer condição na qual o sistema imunitário de humanos bem como de animais tem uma resposta de anticorpos a antigénios menor que o normal, seja devido ao tamanho do seu baço ser menor do que devia ser, seja devido ao seu baço ser apenas parcialmente funcional, seja devido a fármacos tais como agentes quimioterapêuticos que estejam a suprimir a função imunitária normal, seja porque o animal é funcionalmente deficiente em IGF-I (ou GH), ou devido a qualquer outro factor. Exemplos incluem pacientes idosos, pacientes sujeitos a quimioterapia ou terapia de radiação, a recuperar de uma doença grave ou próximo de serem

sujeitos a cirurgia, pacientes com SIDA, pacientes com deficiências em células B congénitas e adquiridas tais como hipogamaglobulinemia, agamaglobulinemia variada vulgar e deficiências em imunoglobulinas selectivas, p.ex., deficiência em IgA, pacientes infectados com um vírus tal como da raiva com um tempo de incubação mais curto que o da resposta imunitária do paciente, e pacientes com distúrbios hereditários tais como síndrome de diGeorge.

Uma variante de hGH agonista pode actuar estimulando o sistema imunitário de um mamífero através do aumento da sua função imunitária, seja o aumento devido a mediação de anticorpos ou mediação celular e seja o sistema imunitário endógeno ao hospedeiro tratado com a variante de hGH ou transplantado de um dador para o hospedeiro receptor que recebe a variante de hGH (tal como em transplantes de medula óssea). Por exemplo, a estimulação pode resultar de um maior número de células do baço tal como o número de linfócitos do baço, o número de populações de células T do baço (células T, CD₄ e CD₈) ou o número de células B do baço ou de um maior número de timócitos. Outras células envolvidas na resposta do sistema imunitário incluem células assassinas naturais, macrófagos e neutrófilos. Adicionalmente, a estimulação pode ser devida a um aumento na produção de anticorpos em resposta a um imunogénio.

As variantes de hGH agonistas do presente invento podem também ser utilizadas para estimular a função cardíaca.

As variantes de hGH antagonistas do presente invento, tais como a B2036, são úteis no tratamento de condições nas quais é desejável a inibição da acção de GH. Particularmente passível de tratamento com variantes de hGH antagonistas são condições nas quais uma redução dos níveis em circulação de GH ou de um mediador da acção de GH, tal como IGF-I, proporciona um benefício terapêutico. Tais condições incluem condições de excesso de GH tais como, por exemplo, gigantismo e acromegalia. O gigantismo resulta de excesso de GH antes da puberdade, quando o crescimento dos ossos longos é ainda possível.

A acromegalia resulta de excesso de GH após a puberdade, quando os ossos longos já se fundiram. A acromegalia caracteriza-se por sobre-crescimento ósseo e inchaço dos tecidos moles bem como hipertrofia dos órgãos internos, especialmente do coração. A acromegalia é tipicamente causada por um tumor pituitário que segrega GH. As características distintivas da doença são elevados níveis de GH e IGF-I em circulação. Crê-se actualmente que as variantes de hGH antagonistas do presente invento oferecem um benefício terapêutico significativo através da inibição da acção de GH.

As variantes de hGH antagonistas são também úteis no tratamento de outras condições nas quais a inibição da acção de GH proporcione um benefício terapêutico. Exemplos incluem diabetes e suas complicações, tais como por exemplo retinopatia diabética e nefropatia diabética. A retinopatia diabética caracteriza-se por proliferação das células que constituem os vasos sanguíneos da retina, crescimento de novos vasos sobre a retina (neovascularização), desenvolvimento de microaneurismas e derrame de líquido para o tecido circundante da retina. As características distintivas iniciais da nefropatia diabética são hipertrofia renal e a hiperfiltração. À medida que a doença progride, observa-se uma dilatação difusa das células mesangiais (que suportam o aparelho de filtração do rim), acompanhada por um aumento absoluto no número de células mesangiais.

Crê-se também que doenças vasculares do olho que, tal como a retinopatia diabética, envolvem neovascularização proliferativa, são passíveis de tratamento com variantes de hGH antagonistas. Exemplos incluem retinopatia da prematuridade, retinopatia associada a anemia de células falciformes e degenerescência macular relacionada com a idade, que é a causa mais frequente de perda de visão em pessoas com mais de 55 anos.

Outras condições nas quais se crê presentemente que a redução dos níveis de GH proporciona um benefício terapêutico incluem malignidades que respondem a GH, ou a um mediador da acção de GH (tal como IGF-I), crescendo (daqui em diante "malignidades que respondem a GH"). Exemplos de tais malignidades que respondem a GH incluem tumor de Wilm, vários

sarcomas (p. ex., sarcoma osteogénico) e cancro da mama, do cólon, da próstata e da tiróide.

As variantes de hGH antagonistas do presente invento inibem o crescimento de células que expressam receptores aos quais as variantes se ligam. Uma ampla variedade de tecidos expressa tais receptores. Por exemplo, o ARNm do receptor de GH é expresso em linhas celulares de placenta normal, timo, cérebro, glândula salivar, próstata, medula óssea, músculo-esquelético, traqueia, espinal-medula, retina, nódulo linfático e de linfoma de Burkitt, carcinoma colorrectal, carcinoma do pulmão, leucemia linfoblástica e melanoma. Assim, acredita-se actualmente que as variantes de hGH antagonistas do presente invento são geralmente úteis no tratamento de cancros que expressem receptores aos quais as variantes se liguem.

Para os vários fins deste invento, a variante de hGH agonista ou antagonista é directamente administrada ao mamífero através de qualquer técnica adequada, incluindo parentericamente e pode ser administrada localmente ou sistemicamente. A via específica de administração depende, p. ex., da história médica do paciente, incluindo quaisquer efeitos secundários notados ou antecipados utilizando a variante de hGH. Exemplos de administração parentérica incluem administração subcutânea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial e intraperitoneal.

A administração é através de infusão contínua (utilizando, p. ex., minibombas tais como bombas osmóticas) ou através de injeção utilizando, p. ex., meios intravenosos ou subcutâneos. Numa concretização, a variante de hGH é administrada subcutaneamente. A administração pode também ser como um único comprimido ou através de uma formulação de depósito de libertação lenta.

A composição da variante de hGH a utilizar na terapia é formulada e doseada de um modo consistente com a boa prática médica, tendo em conta a condição específica a tratar, a condição clínica de cada paciente (especialmente os efeitos secundários do tratamento com a variante de hGH sozinha), o local de distribuição da composição de variante de hGH, o

método de administração, o programa de administração e outros factores conhecidos dos médicos assistentes. A "quantidade eficaz" de variante de hGH para os fins aqui (incluindo uma quantidade eficaz de antagonista para neutralizar, p.ex., acromegalia) é assim determinada através de tais considerações.

Como proposição geral, a quantidade farmacologicamente eficaz total da variante de hGH administrada parentericamente por dose está no intervalo de cerca de 1 µg/kg/dia a cerca de 100 mg/kg/dia de peso corporal do paciente, embora, tal como observado acima, isto esteja sujeito a descrição terapêutica. Normalmente, esta dose está entre cerca de 0,01 e cerca de 10 mg/kg/dia e mais normalmente para humanos entre cerca de 0,01 e cerca de 1 mg/kg/dia. Se dada continuamente, a variante de hGH é tipicamente administrada a uma taxa de dose de cerca de 1 µg/kg/hora a cerca de 50 µg/kg/hora, através de uma a quatro injeções por dia ou através de infusões subcutâneas contínuas, por exemplo, utilizando uma minibomba. Pode também ser empregue uma solução intravenosa de saco. O factor chave na selecção de uma dose apropriada é o resultado obtido, tal como medido para agonistas, por exemplo, aumentos no crescimento dos ossos longos, da produção de anticorpos, do número de esplenócitos ou timócitos e de células B do baço, e tal como medido para antagonistas, por exemplo, redução da GH no soro, IGF-I no soro e crescimento de tumores, etc.

Em geral, uma variante de hGH "PEGuilada" do presente invento pode ser administrada através de qualquer uma das vias de administração descritas acima. No entanto, crê-se presentemente que uma variante de hGH "PEGuilada" não necessita de ser administrada tão frequentemente como uma variante de hGH não "PEGuilada". hGH e variantes de hGH não "PEGuiladas" são tipicamente administradas pelo menos três vezes por semana e frequentemente diariamente. No entanto, as formas "PEGuiladas" destas proteínas podem ser administradas entre cerca de uma vez de três em três dias a cerca de uma vez por mês, ou mais tipicamente entre cerca de uma vez cada 6-7 dias a uma vez de duas em duas semanas.

Os mamíferos potencialmente tratáveis pelas variantes de hGH aqui incluem mamíferos de importância económica tais como

animais bovinos, ovinos e suínos. O mamífero preferido aqui é um humano.

O que se segue é apresentado a título de exemplo e não deve ser entendido como uma limitação do âmbito do invento. Nos exemplos que se seguem, os Exemplos IV e VI estão incluídos para fins comparativos apenas e não caem no âmbito do invento.

EXEMPLO I

Foram avaliadas a cinética e afinidade de ligação das substituições de alanina em 30 resíduos de contacto no Local 1 de hGH. Foi utilizado um dispositivo biossensor, chamado um biossensor BIAcore™, que se baseia em ressonância num plasma de superfície para medir alterações no índice de refacção após ligação da hormona a um receptor imobilizado. Neste exemplo foi verificado que a afinidade é dominada por menos de um quarto das 31 cadeias laterais de contacto e este grupo é um pequeno pedaço próximo do centro do epítopo de contacto. Assim, o "epítopo estrutural" é consideravelmente maior que o "epítopo funcional de ligação".

Protocolo Experimental

As mutações de alanina dos resíduos ocultos no Local 1 em hGH estavam disponíveis a partir do trabalho descrito em Cunningham e Wells, *supra*, ou foram produzidas de novo através de mutagénesis dirigida ao local. Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154: 367-382 (1987). As proteínas variantes foram produzidas e purificadas tal como descrito em Cunningham e Wells, *supra*. Os rendimentos foram melhorados através do prolongamento da duração das precipitações com sulfato de amónio até uma hora.

hGHbp (Wells e De Vos, *supra*) foi imobilizado no biossensor BIAcore™ de Pharmacia e as alterações no índice de refacção após ligação da hormona foram utilizadas para medições cinéticas. As constantes de associação e dissociação foram calculadas utilizando suporte lógico proporcionado com o instrumento. Karlsson et al., *J. Immunol. Methods* 145: 229-240 (1991). O hGHbp foi imobilizado em orientações discretas no

chip do sensor por fixação do hGHbp através de um tiol livre. Isto foi alcançado através da introdução de um resíduo de cisteína num de dois locais específicos (S201C ou S237C) utilizando mutagénese dirigida ao local (Kunkel *et al.*, *supra*). As variantes de tiol do hGHbp foram expressas em *E. coli* e purificadas até à homogeneidade. Fuh *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 3111-3115 (1990). Estas proteínas foram conjugadas com a superfície do *chip* através de activação da matriz de carboxildextrano com N-etil-N'-(3-dietilaminopropil)carbodiimida (EDC) e fazendo-a reagir com N-hidroxissuccinimida (NHS). O NHS-éster reagiu com 2-(2-piridinilditio)etanoamina (PEDA). Os restantes grupos de NHS-éster que não reagiram foram deslocados através de adição de etanolamina. As variantes de hGHbp foram feitas reagir com a matriz (a 50 mg/ml em acetato de sódio 50 mM, pH 4,5) até estarem conjugados aproximadamente 1000 RU (1,0 ng/mm²; ver o manual de BIAcoreTM).

As taxas de associação foram medidas a partir de perfis de ligação obtidos através de injeção de concentrações crescentes de cada variante de hGH. Foram feitas cinco diluições em série (cada uma de 2 vezes) começando em 200 ou 1000 nM de hormona dependendo da afinidade para o hGHbp. Foi aplicado um caudal máximo de 20 µl/min para minimizar potenciais efeitos de transporte de massa. Foi utilizado um tampão de alta salinidade (NaCl 150 mM, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4) para prevenir efeitos electrostáticos de longo alcance e para imitar a força iónica fisiológica. Também incluído estava Tween 20 a 0,02% para reduzir a ligação não específica. A matriz foi regenerada através de lavagem durante 20 segundos com MgCl₂ 4,5 M. Experiências de controlo mostraram que isto era suficiente para remover toda a hormona ligada e a matriz podia ser reutilizada mais de 50 vezes sem alteração significativa na cinética de ligação.

As taxas de dissociação foram medidas através de saturação do biossensor com mutante de hGH 5 µM e mudando para tampão sem hormona. Os caudais de tampão e as condições de regeneração foram idênticos aos utilizados para medir os perfis de associação. Potenciais efeitos de re-ligação foram minimizados utilizando apenas os 10 minutos iniciais de cada perfil de dissociação para cálculo da constante de

dissociação. Ambas as constantes de associação e dissociação foram determinadas utilizando o suporte lógico Pharmacia Kinetics Evaluation para resolver as equações das taxas. Karlsson *et al.*, *supra*.

O desvio padrão médio dentro de determinações em triplicado das constantes de associação no mesmo *chip* do biossensor foi de $\pm 4\%$ do valor relatado. Os valores determinados entre diferentes *chips* do biossensor variam até 60%. No entanto, porque foi sempre incluída uma referência de tipo selvagem, os erros padrão para os valores relativos aqui relatados são os mesmos que nas determinações feitas no mesmo *chip*. A concentração de hGH e das variantes foi determinada através de densitometria de proteínas coradas com azul de Coomassie após electroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Este método confirma a pureza e integridade das hormonas variantes bem como proporciona uma concentração proteica independente da substituição com uma precisão de $\pm 10\%$. Cunningham e Wells, *supra*. Assim, os erros cumulativos médios nas constantes de associação, dissociação e afinidade relativas são cerca de 17%, 14% e 21%, respectivamente.

Resultados

A ligação de hGH ao hGHbp foi estudada através da imobilização de uma variante do hGHbp, (S237C)hGHbp [Ser237 é convertido em Cys no hGHbp] na matriz derivada de tiol num biossensor BIAcore™ através de uma ligação dissulfureto mista. Fig. 1A. A mutação S237C(hGHbp) não afecta a afinidade de ligação a hGH e foi utilizada para ligar uma única sonda fluorescente específica de tiol para acompanhar a dimerização induzida por hGH do hGHbp em solução. Cunningham *et al.*, 1991, *supra*. Esta ligação assegurou uma orientação uniforme do hGHbp na matriz ao contrário da obtida se tivesse sido utilizada conjugação aleatória através de grupos aminas primárias. A partir da alteração nas unidades de ressonância do índice de refração (RU) que ocorreram durante a reacção de conjugação, a quantidade de hGHbp ligada foi calculada a partir de curvas de calibração fornecidas por Pharmacia (ver o manual do biossensor BIAcore™).

Quando foi adicionado um excesso de hGH à matriz com (S237C)hGHbp, observou-se uma associação rápida e uma dissociação extremamente lenta. Fig. 1B. A partir da alteração em RU, foi calculada uma razão molar de 0,4 hGH ligada por hGHbp imobilizado. Ver Tabela 1. Isto indicou que hGH dimerizou o hGHbp imobilizado tal como o fez em solução. Fig. 1A. A dimerização na matriz foi ainda testada através da medição da ligação a hGHbp de um mutante de hGH não dimerizante, (G120R)hGH, que é bloqueado na sua capacidade para se ligar ao Local 2. Fuh *et al.*, 1992, *supra*. Quando foi adicionado um nível saturante de (G120R)hGH, verificou-se que se ligava até cerca de duas vezes mais hormona (Fig. 1B), com uma estequiometria calculada de 0,7 (G120R)hGH por hGHbp imobilizado (Tabela 1).

A análise dos perfis de taxa de associação e de dissociação mostrou que tanto hGH de tipo selvagem como (G120R)hGH se associam a taxas semelhantes (Tabela 1). No entanto, a taxa de dissociação para a de tipo selvagem foi demasiado lenta para calcular uma constante de dissociação de confiança. Estes dados são consistentes com o mecanismo de ligação sequencial proposto; isto é, ambas as hormonas se ligam do mesmo modo ao primeiro receptor e têm assim quase as mesmas taxas de associação. No entanto, a hormona de tipo selvagem ligou-se ao segundo receptor e foi assim extremamente lenta a dissociar-se.

Tabela 1

Constantes cinéticas para a ligação de hGH de tipo selvagem ou (G120R)hGH a (S237C)hGHbp ou (S201C)hGHbp imobilizado na matriz de tiol do biossensor BIAcore™. Os perfis da taxa de associação e de dissociação foram medidos a 25°C e analisados para hGH e (G120R)hGH; os erros padrão médios para a taxa de associação, taxa de dissociação e afinidades no mesmo *chip* do biossensor são de 17%, 14% e 21% do valor relatado. As estequiometrias da ligação foram calculadas a partir dos dados nas Fig. 1B e 2B de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{RU_{(máx)} \text{hormona}}{RU_{(ligado)} \text{hGHbp}} \times \frac{PM_{\text{hGHbp}}}{PM_{\text{hormona}}}$$

Hormona	Matriz	Estequiometria (hormona:hGHbp)	Taxa de associação (s ⁻¹ M ⁻¹)	Taxa de dissociação (s ⁻¹)	k _d (nM)
Tipo selvagem	(S237C) hGHbp	0,40	4,0×10 ⁵	<1,0×10 ⁻⁵	ND*
G120R	"	0,70	2,6×10 ⁵	4,3×10 ⁻⁴	1,6
Tipo selvagem	(S201C) hGHbp	0,84	3,0×10 ⁵	2,7×10 ⁻⁴	0,9
G120R	"	0,92	1,4×10 ⁵	3,7×10 ⁻⁴	2,7

* ND = não determinado.

Era desejado investigar em maior detalhe a ligação de mutantes no epítipo de contacto do Local 1 apenas sem a complicação da dimerização de hGHbp na matriz. De acordo com a estrutura de raios x do complexo hGH(hGHbp)₂ (De Vos *et al.*, *supra*), os dois hGHbp contactam um com o outro em Ser201. Por isso, a dimerização na matriz foi bloqueada através da substituição de Ser201 por Cys e ligando a variante S201C através do seu único tiol à matriz de tiol activado. Fig. 2A. De facto, quando foram adicionados níveis saturantes de hGH (Fig. 2B), foi calculada uma estequiometria máxima de 0,84 hGH por (S201C)hGHbp imobilizado (Tabela 1). A (G120R)hGH ligou-se com uma estequiometria de 0,94 por (S201C)hGHbp. Através da correcta colocação da conjugação por tiol, foi possível orientar o hGHbp na matriz para permitir a formação de um complexo 1:1 ou a formação de um complexo 1:2. Assim, as propriedades de ligação da solução de hGH a hGHbp podem ser reproduzidas no biossensor BIAcore™. A (G120R)hGH teve virtualmente a mesma cinética que hGH na matriz de (S201C)hGHbp e a mesma que (G120R)hGH na matriz de (S237C)hGHbp (Tabela 1). Em conjunto estes dados indicam que a matriz de (S201C)hGHbp é um meio de confiança para testar variantes de hGH quanto à ligação apenas no Local 1.

Uma cadeia lateral oculta em hGH foi definida como uma que contém átomos de cadeia lateral cuja acessibilidade ao solvente muda quando ligados ao hGHbp no Local 1. As acessibilidades ao solvente foram calculadas rodando uma sonda de rádio de 1,4 angstrom (Lee e Richards, *J. Mol. Biol.* 55: 379-400 [1971]) sobre a superfície de hGH quando livre ou ligada a um hGHbp através do Local 1. Para estes cálculos foi utilizado o conjunto de coordenadas de raios x para o complexo hGH(hGHbp)₂. De Vos et al., *supra*. Por estes critérios existem 30 cadeias laterais, todas maiores que alanina, que ficam até certo ponto ocultas após complexação. Tabela 2.

Tabela 2

Taxas de associação, taxas de dissociação e afinidades relativas para substituições de alanina em resíduos de hGH que estão ocultos em graus variáveis na interface do Local 1. As medições das taxas foram feitas utilizando a matriz de hGHbp(S201C) a 25°C tal como descrito na Tabela 1.

Resíduo de contacto do Local 1	Alterações na área acessível após ligação ¹ (Å ²)	Contactos Vdw ² (ligações de H, h; pontes salinas, s)	Alterações na cinética em relação a wt (tipo selvagem) ³			ΔΔG (kcal/mol) BIAcore TM (RIA) ⁴
			taxa de dissociação	1/ taxa de associação	dissociação /associação	
Tipo selvagem	-	-	(1)	(1)	(1)	(0)
M14	0,5 (0,6)	0	1,2	1	1	+0,1 (+0,5)
H18	23 (63)	24 (hN218)	0,41	1,1	0,44	-0,5 (-0,7)
H21	3,7 (27)	11	1,3	1,0	1,3	+0,2 (+0,3)
Q22	-2 (5,8)	1	0,62	1,1	0,69	-0,2
F25	44 (63)	21	0,47	1,0	0,47	-0,4 (-0,2)
D26	0 (0,1)	0	0,79	0,89	0,7	-0,2 (-0,3)
Q29	4,2 (4,4)	0	0,38	0,97	0,37	-0,6
Y42	60 (88)	30	1,2	1,2	1,4	+0,2
L45	-1,6 (44)	7	4,3	1,8	7,9	+1,2 (+1,4)
Q46	53 (88)	16 (hE120)	0,9	1,4	1,2	+0,1 (0)
P48	3,8 (5,1)	4	1,2	1,7	2,0	+0,4
S51	0 (0)	0	1,2	1,4	1,8	+0,3
E56	0,5 (0,9)	0	2,1	0,97	2,0	+0,4 (+0,8)
P61	0 (5,1)	0	7,2	1,1	7,7	+1,2
S62	1,8 (14)	1 (hS102)	1,6	0,8	1,3	+0,1

Resíduo de contacto do Local 1	Alterações na área acessível após ligação ¹ (Å ²)	Contactos Vdw ² (ligações de H, h; pontes salinas, s)	Alterações na cinética em relação a wt (tipo selvagem) ³			$\Delta\Delta G$ (kcal/mol) BIAcore TM (RIA) ⁴
			taxa de dissociação	1/ taxa de associação	dissociação /associação	
N63	7,1 (17)	2	1,2	1,4	1,7	+0,3 (+0,7)
R64	57 (101)	24 (sD164, sE44)	7,9	2,1	16	+1,6 (+1,8)
E65	3,3 (3,3)	0	0,69	0,66	0,45	-0,5 (-0,3)
Q68	6,4 (26)	2	3,3	0,8	2,7	+0,6 (+1,0)
Y164	-5,7 (24)	4	2,1	0,9	1,8	+0,3 (+0,8)
R167	5,9 (32)	8 (sE127)	0,49	3,3	1,6	+0,3 (-0,2)
K168	15 (60)	12 (hW104mc)	0,64	1,2	0,77	-0,2 (+0,1)
D171	19 (50)	16 (sR43)	4,6	0,83	3,8	+0,8 (+1,2)
K172	-6,5 (27)	15	20	1,5	30	+2,0 (+1,6)
E174	17 (25)	4 (hN218)	0,33	0,61	0,21	-0,9 (-0,9)
T175	-2,1 (47)	9 (hR43)	25	1,0	25	+2,0
F176	-14 (5,8)	4	22	1,1	2	+1,9 (+1,6)
R178	41 (70)	8 (hI165mc, hM 170mc)	24	2,5	60	+2,4 (+2,4)
I179	-10 (26)	9	2,9	1,3	3,9	+0,8 (+0,6)
R183	1,2 (1,5)	0	1,4	1,8	2,5	+0,5 (+0,4)
E186	3,4 (5,6)	0	0,97	1,0	0,98	0 (-0,1)

¹ Foi calculada a área de superfície acessível a uma sonda de 1,4 Å (Lee e Richards, *supra*) para cada cadeia lateral na hormona de tipo selvagem e para a de tipo selvagem sem átomos para além do carbono β (para imitar o mutante de alanina) e para os seus complexos correspondentes com o hGHbp, utilizando coordenadas de raios X. De Vos *et al.*, *supra*. A alteração na área oculta atribuída à mutação de alanina é a diferença na área acessível de (livre-ligada)_{wt}-(livre-ligada)_{Ala}. A única área utilizada foi a oculta para além do carbono β porque esta é a porção da cadeia lateral removida após substituição por alanina. Mostrada entre parêntesis está a área de cada cadeia lateral para átomos para além do carbono β de hGH que se torna inacessível ao solvente depois da ligação ao receptor.

² O numero total de contactos de van der Waals é o número de átomos do receptor a menos de 4,4 Å de qualquer átomo para além do carbono β da cadeia lateral de contacto com base na inspecção do complexo hGH(hGHbp)₂. Mais de 80% das distâncias de contacto são de 3,8 a 4,2 Å. Os grupos que

fazem ligações de hidrogénio (h) ou pontes salinas (s) são determinados através de pares dador-aceitador ou de cargas complementares a menos de 3,3 Å um do outro entre hGH e o hGHbp. Por exemplo, hN218 a seguir a H18 indica uma ligação de H entre H18 de hGH e N218 do hGHbp. mc indica uma ligação de H com uma amida da cadeia principal.

³ A mudança relativa na taxa de dissociação foi calculada a partir de

$$\frac{k_{\text{dissociação}}^{\text{wt}}}{k_{\text{dissociação}}^{\text{mut Ala}}}$$

e para 1/taxa de associação através de $\frac{k_{\text{associação}}^{\text{mut Ala}}}{k_{\text{associação}}^{\text{wt}}}$

A mudança de K_d do tipo selvagem (wt) foi calculada como:

$$\frac{k_d(\text{mut Ala})}{k_d(\text{wt})} = \frac{k_{\text{dissociação}}/k_{\text{associação}}(\text{mut})}{k_{\text{dissociação}}/K_{\text{associação}}(\text{wt})}$$

⁴ Os valores de $\Delta\Delta G$ foram calculados como $+RT\ln \frac{k_d(\text{mut Ala})}{k_d(\text{wt})}$ a partir dos

dados do biossensor BIAcore™ ou entre parêntesis a partir dos dados do radioimunoensaio que foi anteriormente relatado. Cunningham e Wells, *supra*; Cunningham e Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3407-3411 (1991).

A matriz de (S201C)hGHbp foi utilizada para medir as afinidades para mutantes de alanina nos 30 resíduos ocultos na interface do Local 1 (Tabela 2). Foi previamente utilizado um ensaio de radioimunoprecipitação (RIA) para medir as constantes de ligação para muitos destes mutantes. Cunningham e Wells, 1989 e 1991, *supra*. Um gráfico da mudança na energia livre relativo ao tipo selvagem para os mutantes de alanina calculado através dos dados de RIA *versus* os dados do biossensor BIAcore™ mostra uma forte correlação ($R^2=0,94$) com um declive próximo de um e uma intercepção próxima de zero. Fig. 3. Assim, os dados de afinidade adquiridos na matriz do biossensor coincidem intimamente com os medidos em solução através de RIA. Isto indica que a matriz não está a causar artefactos de ligação sistemáticos. O erro padrão médio na constante de afinidade é de cerca de 20% para a utilização do biossensor BIAcore™ *versus* cerca de 30% para o RIA. É também possível que possa ocorrer alguma dimerização do hGHbp no RIA que conduziria a erros sistemáticos nas afinidades; isto é evitado utilizando a matriz de (S201C)hGHbp.

Das 30 cadeias laterais ocultas, apenas 7 (L45, P61, R64, K172, T125, F176 e R178) podem contribuir para cerca de 85% da mudança total na energia livre de ligação resultante das substituições de alanina. Outras seis (P48, E56, Q68, D171,

I179 e R183) podem contribuir essencialmente para o restante (Tabela 2). Outras oito cadeias laterais (M14, H21, Q46, S62, N63, Y164, R167 e E186) não têm essencialmente qualquer efeito na afinidade global (cada uma causando uma redução na afinidade de menos de 2 vezes). Três outras cadeias laterais ocultas (Q22, D26 e K168) têm um pequeno mas significativo efeito na afinidade de ligação. Cinco cadeias laterais (H18, F25, Q29, E65 e E174) impedem de facto a ligação porque quando são convertidas em alanina, existem aumentos na afinidade de 2 a 5 vezes. A soma das reduções nas energias livres causadas pelas substituições de alanina (-14,2 kcal/mol) é comparável à energia livre total da ligação entre hGH e o hGHbp (-12,3 kcal/mol) tal como medida através do sensor BIAcoreTM.

Assim, um mutante de hGH com alterações em H18, Q22, F25, D26, Q29, E65, K168 e E174 tem uma maior afinidade de ligação a hGHbp. Calcula-se que a variante com todos os resíduos Ala nestas posições tenha uma afinidade de ligação cerca de 200 vezes maior que a da hGH de tipo selvagem com base na aditividade das mudanças individuais de aminoácidos. Em conjunto com os dados no Exemplo II aqui, espera-se que um Asp na posição 18 e/ou um Ser na posição 174 neste mutante de combinação tenham também uma afinidade de ligação a hGHbp significativamente maior que hGH de tipo selvagem.

Os efeitos da taxa de dissociação são muito maiores que os efeitos da taxa de associação (Tabela 2; Fig. 4). Assim, os mesmo sete resíduos que mais afectam a afinidade contribuem para a maior parte do aumento na taxa de dissociação (até 25 vezes). A conversão de três cadeias laterais de Arg (R64, R167 e R178) em Ala produziu as maiores reduções na taxa de associação, mas apenas de cerca de 2 vezes. A conversão de duas cadeias laterais de Glu (E65 e E174) em Ala causou os maiores aumentos na taxa de associação (uma melhoria de quase 2 vezes). Isto indica que as interações electrostáticas são os determinantes das cadeias laterais mais importantes no direccionamento da hormona para o receptor.

As cadeias laterais que mais afectam a taxa de associação não são todas as mesmas das que mais afectam a taxa de dissociação. Fig. 4. Por exemplo, R167A causa a maior diminuição na taxa de associação mas conduz a uma diminuição

compensadora na taxa de dissociação. Muitas das mutações de alanina nas cadeias laterais que dominam a afinidade (P61A, K172A, T175A e F176A) não têm virtualmente qualquer efeito na taxa de associação. O mutante de combinação preferido a partir destas experiências, que tem uma afinidade de ligação 200 vezes maior para o receptor de GH que a hGH de tipo selvagem, resultante da aditividade de cada mutação, tem a sequência H18A, Q22A, F25A, D26A, Q29A, E65A, K168A, E174A.

Conclusão

Os dados indicam que apenas um pequeno conjunto das cadeias laterais ocultas na interface são funcionalmente cruciais na ligação. Sem estar limitado a qualquer teoria, crê-se que isto não é um artefacto do método de análise. Primeiro, a estrutura do complexo hGH.hGHbp foi resolvida e os resíduos ocultos no Local 1 são virtualmente idênticos aos observados no Local 1 para hGH no complexo hGH(hGHbp)₂. De Vos *et al.*, *supra*. Assim, o facto de o epítipo estrutural ser muito menor que o epítipo funcional não é devido a diferenças de contacto na ligação no complexo 1:1 versus 1:2 (que é o conjunto de coordenadas utilizado para definir o epítipo de contacto).

Segundo, a análise da importância funcional de qualquer cadeia lateral através de estudo mutacional tem o embargo de que a proteína mutante pode exagerar o efeito através da imposição de uma perturbação estrutural ou uma invulgar interacção conformacional, electrostática ou hidrófoba. As substituições sistemáticas das cadeias laterais com alanina são menos disruptivas para a estrutura. Wells, *Methods in Enzymol.* 202: 390-411 (1991). A mutação de alanina é a mais simples de interpretar porque remove átomos sem introduzir novos que possam criar interacções desfavoráveis ou favoráveis adicionais. A soma de todos os efeitos disruptivos causados pelas substituições de alanina (-14,3 kcal/mol) não exagera dramaticamente a energia livre de ligação total (-12,3 kcal/mol). Isto indica que os efeitos se situam nos determinantes de ligação individuais e não alteram grosseiramente a estrutura total da proteína ou o modo de ligação. Dado o grande número de resíduos de contacto, é também improvável que uma única substituição de alanina

mudasse o modo de ligação no complexo, o que é evidenciado pelo número de substituições duplas de alanina que têm efeitos aditivos na ligação, indicando que os locais actuam independentemente.

São também identificadas algumas mutações de alanina que afectam a afinidade que estão ocultas na hormona e não se tornam mais ocultas quando o receptor se liga. Cunningham e Wells, 1989, *supra*. Por exemplo, P5A, L6A, F10A e V185A diminuem cada uma a afinidade em 2 a 4 vezes. Cada uma destas cadeias laterais faz contactos entre a hélice 1 e a hélice 4 que dominam o epítipo do Local 1 mas não estão directamente envolvidas na ligação. Semelhantemente, F54 e I58 desfazem a afinidade e estão ocultos na região da volta que posiciona a segunda mini-hélice. Esta mini-hélice contém R64 e outros determinantes de ligação importantes. Assim, alguns efeitos menores na ligação podem resultar de perturbações estruturais que se propagam a partir das mutações de alanina próximas mas não no epítipo estrutural. No entanto, a vasta maioria de resíduos testados fora do epítipo estrutural do Local 1 não tem um efeito detectável na ligação quando convertidos em alanina. Cunningham e Wells, 1989, *supra*.

Os dados da pesquisa com alanina mostram que apenas sete das 30 cadeias laterais ocultas na interface contribuem para cerca de 85% da energia de ligação. Virtualmente todo o resto pode ser responsabilidade das seis outras cadeias laterais. Tentou-se correlacionar vários parâmetros que podem explicar porque é que alguns resíduos são críticos para a ligação e outros não. Verifica-se que os resíduos são importantes para o grupo de ligação numa pequena região próxima do centro do epítipo estrutural (principalmente no final da hélice 4). Os resíduos de contacto funcionalmente "nulos" tendem a estar próximo da periferia, no centro da hélice 1 e no início da hélice 4. Esta é uma região que é crítica para a ligação de hGH ao receptor hPRL (Cunningham e Wells, 1991, *supra*) e para a formação de um complexo de armazenamento $(\text{Zn}^{+2}.\text{hGH})_2$. Cunningham et al., *Science* 253: 545-548 (1990). Assim, embora esta área tenha um papel pouco aparente na ligação ao receptor de hGH, tem outras funções importantes.

Outras correlações estruturais sistemáticas são mais difíceis de fazer. Chothia e Janin, *Nature* 256: 705-708 (1975) verificaram que uma mudança na área de superfície oculta se correlacionava geralmente com a energia livre da associação entre duas proteínas. A mudança na área de superfície oculta que ocorreria após formação do complexo para cada um dos mutantes de alanina foi calculada a partir da diferença na acessibilidade nos estados livre e ligado entre hGH e o mutante de alanina. Tabela 2. No entanto, um gráfico da mudança na área de superfície oculta após ligação *versus* a mudança na energia livre de ligação quando a cadeia lateral é convertida em alanina dá uma correlação muito fraca. Fig. 5A. Nalguns casos obtiveram-se valores negativos para a mudança na acessibilidade. Isto é porque a cadeia lateral em falta no mutante de alanina cria uma cavidade na interface e assim mais área de superfície seria coberta após formação do complexo. Foi também calculada a mudança na acessibilidade da cadeia lateral que ocorre após ligação para átomos para além do carbono beta que foi o critério para definir cadeias laterais ocultas (ver valor entre parêntesis na coluna 2 da Tabela 2). No entanto, um gráfico destes valores *versus* a mudança na energia livre não dá uma correlação melhor. Um gráfico do número de contactos de van der Waals feitos por átomos de hGH para além do carbono beta *versus* a mudança na afinidade quando a cadeia lateral é convertida em alanina (Fig. 5B) também não mostra uma boa correlação. Nenhuma das correlações melhora considerando separadamente as cadeias laterais que são capazes de interacções electrostáticas.

Horton e Lewis, *Protein Science* 1: 169-181 (1992) foram capazes de prever afinidades para 15 pares proteína-proteína diferentes utilizando um método semi-empírico baseado na área de superfície oculta e na graduação funcional dos parâmetros de dissolução atómica (Eisenberg e McLachlan, *Nature* 319: 199-203 [1986]) para as cadeias laterais de contacto. Por isso, estes parâmetros de dissolução atómica graduados foram avaliados para ver até que ponto podem prever as mudanças de energia livre resultantes de cada substituição de alanina. Houve pouca correlação. Assim, embora os cálculos da área de superfície oculta, do número de contactos de van der Waals e dos parâmetros de dissolução atómica graduados sejam correlativos úteis para a afinidade de ligação geral, são

fracos previsores do papel de cada cadeia lateral neste epítopo.

Em média, a energética para interacções electrostáticas é consideravelmente mais fraca que as estimativas feitas a partir da mutagénese de complexos enzima-substrato. A partir da análise mutacional da tirosil-ARNt-sintetase, foi estimado que a perda de energia livre para desfazer um par de ligação de H carregado é de 3,5-5 kcal/mol e para um par de ligação de H neutro é de 0,5-1,5 kcal/mol. Fersht *et al.*, *Nature* 314: 235-238 (1985). Sete cadeias laterais de hGH formam ligações de hidrogénio com o hGHbp (H18, Q46, S62, K168, E174, T175 e R178). Cinco destas são ligações de H carregadas (Q46, K168, E174, T175, R178), no entanto a mudança na energia livre de ligação quando são convertidas em alanina é de apenas +0,1, -0,2, -0,9, +2,0 e +2,0 kcal/mol, respectivamente, dando um valor médio de +0,6 kcal/mol. A mudança na afinidade para mutação das duas cadeias laterais com ligação de H neutra (H18 e S62) é de apenas -0,5 e +0,1, respectivamente. Três outras cadeias laterais formam pontes salinas com o hGHbp (R64, R167 e D171), no entanto estas causam reduções de apenas +1,6, +0,3 e +0,8 kcal/mol, respectivamente. Estes valores são inferiores aos calculados para duas pontes salinas concebidas em subtilisina que variam de +1,8 a +2,3 kcal/mol. Wells *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1219-1223 (1987). Assim, a força dos contactos varia amplamente na interface de hGH-hGHbp e as interacções são consideravelmente mais fracas em comparação com as de locais de ligação de moléculas pequenas.

A partir de estudos mutacionais do interior proteico estimou-se que cada grupo metileno oculto contribui com -1,0 a -1,5 kcal/mol para a energia livre global da dobragem (para uma revisão recente ver Shortle, *Quart. Rev. Biophys.* 25: 205-250 (1992) e referências aí). A conversão de várias cadeias laterais hidrófobas em hGH para alanina causou efeitos que foram muito mais fracos do que se esperaria a partir destes estudos. Por exemplo, os maiores efeitos observados para mutações em cadeias laterais hidrófobas são para L45A, K172A (apenas a porção alifática faz contacto com o receptor), F176A e I179A, que causam reduções na afinidade de +1,2, +2,0, +1,9 e +0,8 kcal/mol, respectivamente. Para além disso, vários outros grupos hidrófobos que estão mais altamente ou

comparativamente ocultos após formação do complexo (F25, Y42, Y164) não têm quase nenhum efeito quando mutados para alanina.

Em resumo, foi descoberta uma característica marcante do complexo hGH:receptor de 1:2, *i.e.*, que apenas um pequeno conjunto de cadeias laterais de hGH que estão ocultas no Local 1 afectam a afinidade de ligação quando convertidas em alanina. Assim, o epítipo funcional definido através de mutagénese de pesquisa com alanina é consideravelmente menor que o epítipo estrutural definido por resíduos ocultos ou contactos de van der Waals. Alguns resíduos que estão próximos mas não dentro do epítipo do Local 1 podem afectar modestamente a afinidade de ligação quando convertidos em alanina, presumivelmente através de efeitos indirectos. Finalmente, a maior parte das cadeias laterais funcionalmente importantes modulam a taxa de dissociação, não a taxa de associação, da hormona ao receptor.

EXEMPLO II

Objectivo

Era desejado determinar até que ponto a afinidade do Local 1 de hGH podia ser aumentada. Era também desejado determinar que cadeias laterais de hGH deviam ser mutadas para aumentar a afinidade de ligação - as que modulam a afinidade tal como identificado por mutagénese de pesquisa com alanina, as identificadas através de cristalografia para fazer contacto ou ambas. Finalmente, se as mutações poderem aumentar substancialmente a afinidade, era desejado aprender se o faziam afectando a taxa de associação ou a taxa de dissociação da hormona mutada.

Sumário

Foram produzidas variantes de hGH de afinidade muito elevada combinando mutantes de hGH de afinidade aumentada que foram seleccionados a partir de cinco bibliotecas seleccionadas nas quais era apresentado um total de cerca de 10^6 variantes proteicas de forma monovalente em partículas de fagemídeo. No total foram mutados 20 resíduos diferentes no local de ligação do Local 1. Embora cada cadeia lateral

mutante contribuisse apenas para pequenos aumentos na afinidade, estas produziam aumentos aditivos na energia livre de ligação. Através desta abordagem, foi produzida uma variante de hGH possuindo 15 substituições que se ligou ao receptor de forma cerca de 400 vezes mais forte que a hGH de tipo selvagem.

Material e Métodos

a) Procedimentos Gerais

Enzimas de restrição, polinucleótido-cinase, ADN-polimerase de T7 e ADN-ligase de T4 foram obtidas em Gibco-BRL ou New England Biolabs e utilizadas de acordo com as instruções do fabricante. Cassetes oligonucleotídicas aleatórias foram fosforiladas, unidas e ligadas em construções tal como descrito em Lowman *et al.*, *supra* e Lowman e Wells, *supra*. A enzima da marca Sequenase[®] foi adquirida em United States Biochemical e utilizada de acordo com as instruções do fabricante para sequenciação de cadeia simples. Sanger *et al.*, *supra*.

Alguns mutantes específicos do local de hGH foram construídos através de mutagénese dirigida por oligonucleótidos, utilizando um molde de cadeia simples. Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 204: 125-139 (1991). O plasmídeo pHGHam-g3, codificando hGH de tipo selvagem fundida com o domínio carboxi-terminal do gene III de M13 (Lowman *et al.*, *supra*), foi utilizado para construir vectores parentais para mutagénese de cassette. Partículas de fagemídeo monovalentes de apresentação de hGH foram preparadas (Lowman e Wells, *supra*) electrotransformando células de *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) e adicionando o fago ajudante M13K07. Vieira e Messing, *supra*.

Moléculas de ADN codificando as hormonas solúveis foram expressas em *E. coli* (Chang *et al.*, *supra*), precipitadas em sulfato de amónio a partir de sobrenadantes de células sujeitas a choque osmótico (Olson *et al.*, *Nature* 293: 408 [1981]), e quantificadas através de densitometria laser de géis de SDS-PAGE corados com Coomassie. Cunningham *et al.*, *supra*. Algumas variantes foram ainda purificadas através de

cromatografia de permuta iónica numa coluna Mono-Q (Pharmacia-LKB Biotechnology, Inc.).

(b) Preparação de bibliotecas de hGH-fagemídeo

Para mutagénesse da Mini-hélice-1 (resíduos 41-46) de hGH, o local AatII existente em phGHam-g3 foi destruído utilizando o oligonucleótido #718 (5'-GCC ACC TGA TGT CTA AGA AAC-3') (SEQ ID No: 1). Locais únicos SfiI e AatII foram introduzidos em phGHam-g3 para criar pH0779, utilizando os oligonucleótidos #782 (5'-TTT GAA GAG GCC TAT ATG GCC AAG GAA CAG AAG-3') (SEQ ID No: 2) e #821 (5'-CAG AAC CCC CAT TGA CGT CCC TCT GTT TC-3') (SEQ ID No: 3), respectivamente. O último oligonucleótido introduziu também uma mudança de enquadramento +2 e um codão de terminação TGA a seguir ao resíduo 49. Foi construída uma cassette aleatória a partir dos oligonucleótidos complementares #822 (5'-TC CCG AAG GAG CAG NNS NNS TCG TTC NNS NNS AAC CCG CAG ACG T-3') (SEQ ID No: 4) e #823 (5'-CTG CGG GTT SNN SNN GAA CGA SNN SNN CTG CTC CTT CGG GAT AT-3') (SEQ ID No: 5). O ADN parental (pH0779) foi digerido com as enzimas de restrição SfiI e AatII e o fragmento grande foi purificado e ligado com a cassette. Os produtos de ligação foram electrotransformados para células XL1-Blue para preparação de fagemídeos em duas alíquotas, produzindo 1×10^6 transformantes independentes cada uma, tal como descrito por Lowman e Wells, *supra*.

Para construir a biblioteca da Volta-A (resíduos 54-64) de hGH, o local AatII existente em phGHam-g3 foi destruído utilizando o oligonucleótido #718. Locais de restrição únicos AatII e BstEII foram introduzidos no gene de hGH para construir pH0709, utilizando os oligonucleótidos #719 (5'-AAC CCC CAG ACG TCC CTC TGT-3') (SEQ ID No: 6) e #720 (5'-GAA ACA CAA CAG TAA AGG TAA CCT AGA GCT GCT-3') (SEQ ID No: 7). O último oligonucleótido introduziu também uma mudança de enquadramento +1 e um codão de terminação TAA a seguir ao resíduo 69. Adicionalmente, o local EcoRI único foi destruído utilizando o oligonucleótido #536 (5'-CGT CTT CAA GAG TTC AAC TTC TCC-3') (SEQ ID No: 8), para permitir selecção de restrição contra possíveis clones contaminantes de bibliotecas anteriores (Lowman e Wells, *supra*). Uma cassette aleatória foi construída a partir dos oligonucleótidos #803 (5'-pCC CTC TGT NNS TCA NNS TCT NNS CCG ACA CCC AGT AAT NNS GAG GAA ACA CAA

CAG AAG A-3') (SEQ ID No: 9) e #804 (5'-pGTT ACT CTT CTG TTG TGT TTC CTC SNN ATT ACT GGG TGT CGG SNN AGA SNN TGA SNN ACA GAG GGA CGT-3') (SEQ ID No: 10). O ADN parental (pH0709) foi digerido com as enzimas de restrição *AatII* e *BstEII* e o fragmento grande foi purificado e ligado com a cassete. Os produtos de ligação foram electrotransformados para células XL1-Blue para preparação de fagemídeos em duas alíquotas, produzindo $1,6 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ transformantes independentes.

(c) Bibliotecas combinatórias de hGH a partir de bancos de bibliotecas de hGH-fagemídeo

ADN dos bancos de Hélice-1 e Hélice-4b (seleccionados para 0, 2 ou 4 ciclos; Lowman *et al.*, *supra*) foi purificado e digerido com as enzimas de restrição *AccI* e *BstXI*. O fragmento grande para cada banco de Hélice-1 (mutado de forma aleatória em F10, M14, H18 e H21) foi então purificado e ligado com o fragmento pequeno de cada banco de Hélice-4b (mutado de forma aleatória em R167, D171, T175, I179, no fundo E174S, F176Y) para produzir as três bibliotecas combinatórias 707A (bancos de Hélice-1 e Hélice-4b não seleccionados), 707B (banco de Hélice-1 seleccionado duas vezes com banco de Hélice-4b seleccionado duas vezes) e 707C (banco de Hélice-1 seleccionado quatro vezes com banco de Hélice-4b seleccionado duas vezes). Ligações em duplicado foram também montadas com um décimo a metade do ADN vector e designadas 707D, 707E e 707F, correspondendo às bibliotecas de partida de 0, 2 e 4 ciclos, respectivamente. Todos estes bancos de variantes continham também as mutações E174S, F176Y obtidas em selecções de ligação de hGH-fagemídeo anteriores. Lowman *et al.*, *supra*. Os produtos de ligação pH0707A-F foram processados e electrotransformados para células XL1-Blue. O número de transformantes independentes obtidos a partir de cada banco, com base em unidades formadoras de colónias (CFU), foi tal como se segue: $2,4 \times 10^6$ de pH0707A, $1,8 \times 10^6$ de pH0707B, $1,6 \times 10^6$ de pH0707C, 8×10^5 de pH0707D, 3×10^5 de pH0707E e 4×10^5 de pH0707F. Partículas de hGH-fagemídeo foram preparadas e seleccionadas para ligação a hGHbp ao fim de 2 a 7 ciclos tal como descrito por Lowman *et al.*, *supra*.

Várias variantes de hGH foram construídas através da combinação de variantes isoladas a partir das bibliotecas de

Hélice-1 e Hélice-4b. As variantes parentais foram as três com ligações mais fortes de cada biblioteca: A = H10,G14,N18,N21; B = A10,W14,D18,N21; C = F10,S14,F18,L21; D = N167,S171,S174,Y176,T179; E = E167,S171,S174,Y176,I179; F = N167,S171,S174,Y176,T179. O ADN fagemídico foi purificado e digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BstXI*. O fragmento maior de cada variante de Hélice-4b foi então purificado e ligado com o fragmento pequeno de cada variante de Hélice-1 para produzir as variantes combinadas com mutações em ambas as Hélice-1 e Hélice-4b. Estas variantes foram designadas como AD, AE, AF, BD, BE, BF, CD, CE, CF para indicar as respectivas combinações aos pares de mutações da Hélice-1 (A, B ou C) e da Hélice-4b (D, E ou F).

Foi utilizada uma série de cinco oligonucleótidos para reverter várias das mutações derivadas de fagos na variante BD para o resíduo de tipo selvagem correspondente: #797 (5'-CTG CGT GCT CAC CGT CTT CAC CAG TTG GCC TTT G-3') (SEQ ID No: 11) para D18H,N21H; #798 (5'-GTC AGC ACA TTC CTG CGC ACC-3') (SEQ ID No: 12) para Y176F; #799 (5'-CTC TCG CGG CTC TTC GAC AAC GCG ATG CTG CGT GCT-3') (SEQ ID No: 13) para A10F,W14M; #800 (5'-TAC TGC TTC AGG AAG GAC ATG GAC AAG GTC AGC-3') (SEQ ID No: 14) para N167R,S171D; #801 (5'-CTG CGC ATC GTG CAG TGC-3') (SEQ ID No: 15) para T179I; #875 (5'-CTC TCG AGG CTC TTC GAC AAC GCG TGG-3') (SEQ ID No: 16) para A10F.

A variante de hGH 852d foi construída utilizando BD como molde e os seguintes oligonucleótidos: #843 (5'-CAG ACC TCC CTC TGT CCC TCA GAG TCT ATT CCG-3') (SEQ ID No: 17) para adicionar F54P; #844 (5'-ACA CCC TCC AAC AAG GAG GAA ACA CAA CAG-3') (SEQ ID No: 18) para R64K; #846 (5'-CCA AAG GAA CAG ATT CAT TCA TTC TGG TGG AAC CCC CAG ACC TCC-3') (SEQ ID No: 19) para K41I,Y42H,L45W,Q46W. A variante 852b foi construída utilizando os mesmos oligonucleótidos com o molde pHGHam-g3.

(d) Ensaaios de radioimunoprecipitação

A afinidade de ligação em equilíbrio para hGHbp foi determinada através do ensaio das variantes de hGH em competição com hGH marcada com ¹²⁵I, variante BD marcada ou variante 852d marcada, em tampão de ligação: Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, albumina de soro bovino a 0,1%, azida de sódio a 0,02%. Lowman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266: 10982-10988 (1991). A imunoprecipitação do complexo hGH-hGHbp foi

realizada utilizando um anticorpo monoclonal designado MAb5. Barnard *et al.*, *Endocrinology* 115: 1805-1813 (1984). As constantes de dissociação foram obtidas através de análise de Scatchard. Cunningham e Wells, 1989, *supra*. As variantes BD e 852d contêm F176Y, que se iodada podia perturbar a interface hormona-receptor. No entanto, a BD iodada (fria) era indistinguível da BD não marcada em competição com BD marcada com ^{125}I pela ligação.

(e) Ensaaios de cinética

As constantes da taxa de associação e dissociação para as variantes de hGH que se ligam a hGHbp imobilizado foram obtidas através de medição de ressonância em plasma de superfície (SPR) utilizando um biossensor BIAcoreTM. Neste sistema, hGHbp é ligado covalentemente a uma matriz de dextrano ligada a um *chip* biossensor. A hormona é mantida a uma concentração constante numa fase líquida que passa sobre esta superfície a um caudal constante. O instrumento mede a massa de proteína que se liga à matriz em tempo real sentindo a alteração do sinal de SPR devida à alteração no índice de refração próximo da superfície do biossensor. Löfås e Johnsson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 21: 1526-1528 (1990).

Uma variante de hGHbp(S201C) foi utilizada como espécie imobilizada porque a ligação de um segundo receptor fica bloqueada (ver Exemplo I). O hGHbp(S201C) foi reduzido e ligado ao *chip* biossensor através de activação EDC/NHS da camada de dextrano e química de cloridrato de 2-(2-piridinilditio)etanoamina (PDEA) (tiol activado) até um nível de 1000-2000 rU, utilizando acetato de sódio 10 mM (pH 5,0); os reagentes e procedimentos foram obtidos de Pharmacia Biosensor. Os passos de ligação e eluição foram realizados a um caudal de 3-20 $\mu\text{l}/\text{min}$ em tampão PBS (pH 7,4) contendo Tween 20 a 0,05%.

A densidade do hGHbp ligado à matriz afecta os valores absolutos mas não os relativos de $k_{\text{associação}}$ e $k_{\text{dissociação}}$ até duas vezes para a hGH de tipo selvagem. Assim, quando foram utilizados diferentes *chips* biossensores os parâmetros cinéticos para a hGH de tipo selvagem foram determinados para que pudessem ser normalizados para comparação de diferentes

mutantes cujos parâmetros cinéticos pudessem ter sido medidos em diferentes *chips* biossensores. Os valores cinéticos relativos assim obtidos foram consistentes ao longo de diferentes células de fluxo, e as medições de afinidade calculadas correlacionaram-se bem com os resultados do ensaio de radioimunoprecipitação. As constantes da taxa de dissociação foram obtidas através de um gráfico de $\ln(R_0/R_t)$ vs. t ; as constantes da taxa de associação foram obtidas através de um gráfico [declive de (dR_t/dt) vs. R_t] contra a concentração de hormona (Karlsson *et al.*, *supra*) ou através de um gráfico de $\ln(dR_t/dt)$ contra a concentração de hormona utilizando o suporte lógico de avaliação da cinética do biossensor BIAcoreTM (Pharmacia Biosensor). As constantes de dissociação em equilíbrio, K_d s, foram calculadas como $k_{\text{dissociação}}/k_{\text{associação}}$. Os desvios padrão, $\sigma_{\text{associação}}$ para $k_{\text{associação}}$ e $\sigma_{\text{dissociação}}$ para $k_{\text{dissociação}}$, foram obtidos a partir de medições com 2 ou mais séries de diluições de 2 vezes ou 3 vezes ($k_{\text{associação}}$) ou com 2 ou mais amostras de hormona concentrada ($\geq 25 \mu\text{M}$) ($k_{\text{dissociação}}$). Os erros resultantes ($\varepsilon[K]$) nas K_d s calculadas foram estimados de acordo com as seguintes fórmulas utilizando a derivada total de $K = f(k_{\text{associação}}, k_{\text{dissociação}})$: (para uma discussão, ver Bevington, *supra*)

$$\varepsilon[K] = [(\delta K / \delta k_{\text{dissociação}})^2 (d[k_{\text{dissociação}}])^2 + (\delta K / \delta k_{\text{associação}})^2 (d[k_{\text{associação}}])^2]^{1/2} \quad (1)$$

$$\varepsilon[K] = [(k_{\text{associação}})^{-2} (\sigma_{\text{dissociação}})^2 + (k_{\text{dissociação}})^2 (k_{\text{associação}})^{-4} (\sigma_{\text{associação}})^2]^{1/2} \quad (2)$$

Resultados

(a) Resíduos no epítipo funcional da ligação hGH-receptor

A análise estrutural do complexo hGH(hGHbp)₂ (de Vos *et al.*, *supra*) identificou mais de 30 cadeias laterais no Local 1 de hGH que sofrem algum grau de ocultação quando o primeiro receptor se liga (Fig. 6B). Embora a maioria destas tivesse sido testada como mutantes de alanina antes da elucidação estrutural (Cunningham e Wells, 1989, *supra*; 1991, *supra*), quatro resíduos (K41, Y42, L45 e Q46) na primeira mini-hélice (Mini-hélice-1) não foram avaliados. Por isso, estes resíduos foram convertidos singularmente em alanina e os efeitos na afinidade de ligação foram medidos através de deslocamento competitivo com [¹²⁵I]-hGH e imunoprecipitação (Cunningham e

Wells, 1989, *supra*) ou utilizando o biossensor BIAcore™ de Pharmacia. Ambos os métodos deram medições de afinidade comparáveis, tal como mostrado no Exemplo I.

As cadeias laterais de Y42 e Q46 tornam-se altamente ocultas após ligação ao receptor, no entanto as substituições de alanina causaram uma redução de menos de duas vezes na afinidade (Tabela 3). Leu45 faz menos contactos com o receptor que Y42 ou Q46, no entanto o mutante L45A causa uma redução de 10 vezes na afinidade. Lys41 faz uma ponte salina com Glu127 do receptor. O ADN codificando o mutante K41A não se expressou suficientemente bem para se obter material para uma medição de afinidade; no entanto, ADN codificando uma variante mais conservativa, K41Q, expressou-se suficientemente bem. Esta variante tinha uma afinidade 2,6 vezes inferior hGH de tipo selvagem. Assim, a região da Mini-hélice-1 faz claramente parte do epítipo funcional no Local-1 de hGH (Fig. 6A). Com estes dados e os do Exemplo I, os efeitos foram medidos para pelo menos uma substituição (principalmente alaninas) em resíduos cujas cadeias laterais se tornam ocultas quando o primeiro receptor se liga no Local 1.

Tabela 3

Afinidades de ligação ao receptor dos mutantes de alanina de hGH em fundo de tipo selvagem, medidas através de BIAcore™ ([†]) ou através de RIA (não marcado) e normalizadas relativamente ao valor de RIA para hGH de tipo selvagem tal como medido por Cunningham *et al.*, 1989, *supra*. As mutações de alanina ou glutamina foram feitas para testar as contribuições das cadeias laterais na região da Mini-hélice-1 de hGH de tipo selvagem. Para comparação com o epítipo estrutural, é também mostrado o número de contactos de van der Waals com o receptor, derivado da estrutura cristalina do complexo hGH(hGHbp)₂.

Variante	Número de Contactos de van der Waals	K_d (mut) K_d (pM)	K_d (hGH)
hGH (tipo selvagem)	–	340	1
K41A	–	NE	NE
[†] K41Q	7	880±84	2,6
Y42A	30	540±80	1,6
L45A	7	3400±330	10
Q46A	16	320±20	0,9

(b) Concepção e análise de bibliotecas aleatórias de mutantes

Foram escolhidas cinco bibliotecas seleccionadas nas quais quatro resíduos dentro do epítipo estrutural e/ou funcional do Local 1 foram tornados aleatórios (Fig. 7). A restrição de cada biblioteca a 4 codões aleatórios permitiu a amostragem da maioria das variantes possíveis (cerca de 2×10^5 sequências proteicas geradas a partir de cerca de 1×10^6 sequências de ADN) dentro dos limites do tamanho da biblioteca (média de cerca de 1×10^7 transformantes independentes).

Previamente, foi produzida uma biblioteca (chamada Hélice-4a) na qual os resíduos K172, E174, F176 e R178 foram tornados aleatórios e apresentados em partículas de fagemídeo monovalentes. Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*. Após 3 ciclos de selecção de ligação, o mutante com a ligação mais forte (E174S,F176Y) tinha uma afinidade cerca de 5 vezes maior que hGH de tipo selvagem. Estes dois mutantes foram fixados numa segunda biblioteca (chamada Hélice-4b) na qual R167, D171, T175 e I179 foram aleatoriamente mutados no fundo E174S,F176Y. Após 6 ciclos de selecção foi isolado um pentamutante (R167D,D171S,E174S,F176Y,I179T) que se ligou de forma cerca de 8 vezes mais forte que hGH de tipo selvagem. Numa biblioteca seleccionada (chamada Hélice-1) os resíduos F10, M14, H18 e H21 foram aleatoriamente mutados. Após 4 ciclos de selecção foi isolado o tetramutante (F10A,M14W,H18D,H21N) que se ligou de forma 3 vezes mais forte que hGH de tipo selvagem.

Aqui, os estudos de selecção fágica foram alargados à volta que une as hélices 1 e 2. Os quatro resíduos de contacto na Mini-hélice-1 (K41, Y42, L45 e Q46) foram tornados aleatórios e clones representativos foram sequenciados após 2 a 7 ciclos de selecção de ligação (Tabela 4). Alguns resíduos estavam altamente sobre-representados em dadas posições em comparação com o que era esperado a partir da frequência desses resíduos na biblioteca de partida. Por exemplo, cerca de 35% dos clones continha uma mutação Q46W. Isto era 7,6 unidades de desvio padrão acima de uma ocorrência de probabilidade aleatória para Trp na biblioteca. Isto é um bom modo de registar o banco de seleccionados para estabelecer uma

sequência de consenso porque contribui para a tendência de codão esperado e para uma estatística da amostragem. Através destes critérios houve uma suave preferência por K41R, uma ligeira preferência por Y42R ou Y42Q, uma forte preferência por L45W ou L45 e uma preferência mais forte por Q46W.

Tabela 4

Resíduos de consenso identificados após escolha das bibliotecas de hGH-fagemídeo. São mostrados os resíduos de ocorrência mais frequente das bibliotecas de apresentação fágica, com base numa representação fraccional (P_f) entre todos os clones sequenciados após 2 a 7 ciclos de selecção de ligação. As frequências esperadas (P_e) foram calculadas a partir do número de codões NNS para cada aminoácido teoricamente na biblioteca de partida. Os desvios padrão (σ_n) foram calculados como $\sigma_n = [P_e(1-P_e)/n]^{1/2}$. Apenas são mostrados os resíduos para os quais a fracção verificada excedeu a fracção esperada em pelo menos $2\sigma_n$ (i.e., $[(P_f-P_e)/\sigma_n] \geq 2$). Para a biblioteca da Mini-hélice-1, n=17 sequências; Biblioteca da Volta-A, n=26; Biblioteca combinatória (Hélice-1), n=68; Biblioteca combinatória (Hélice-4b), n=56.

Resíduo		P_e	σ_n	P_f	$\frac{P_f - P_e}{\sigma_n}$
Mini-hélice-1:					
K41	R	0,094	0,071	0,35	3,7
	F	0,031	0,042	0,12	2,0
Y42	R	0,094	0,071	0,24	2,0
	Q	0,031	0,042	0,18	2,0
L45	W	0,031	0,042	0,24	4,8
	L	0,094	0,071	0,41	4,5
Q46	W	0,031	0,042	0,35	7,6
	F	0,031	0,042	0,12	2,0
	Y	0,031	0,042	0,12	2,0
Volta-A:					
F54	P	0,062	0,047	0,73	14,1
E56	D	0,031	0,034	0,19	4,7
	W	0,031	0,034	0,19	4,7
	Y	0,031	0,034	0,12	2,5
I58	I	0,031	0,034	0,31	8,1
	V	0,062	0,047	0,23	3,5
R64	K	0,031	0,034	0,81	22,8

Combinatória (Hélice-1):

F10	A	0,062	0,03	0,41	12,0
	F	0,031	0,02	0,25	10,4
	H	0,031	0,02	0,16	6,2
M14	W	0,031	0,02	0,26	11,1
	S	0,094	0,04	0,26	4,8
	Y	0,031	0,02	0,09	2,7
	N	0,031	0,02	0,09	2,7
	H	0,031	0,02	0,07	2,0
H18	D	0,031	0,02	0,43	18,8
	F	0,031	0,02	0,12	4,1
	N	0,031	0,02	0,10	3,4
H21	N	0,031	0,02	0,46	20,2
	H	0,031	0,02	0,13	4,8

Combinatória (Hélice-4B):

R167	N	0,031	0,02	0,63	25,6
	K	0,031	0,02	0,13	4,1
D171	S	0,094	0,04	0,64	14,1
	D	0,031	0,02	0,14	4,8
	N	0,031	0,02	0,13	4,1
T175	T	0,062	0,03	1,0	29,1
I179	T	0,062	0,03	0,66	18,6
	N	0,031	0,02	0,13	4,1

Foi construída uma segunda biblioteca (chamada Volta-A) na qual F54, E56, I58 e R64 foram aleatoriamente mutados. As substituições de alanina causaram uma redução de 4 a 20 vezes na afinidade dependendo da cadeia lateral (Fig. 6A). Apesar do facto de R64 ser o único destes resíduos que faz contacto directo com o receptor (Fig. 6B), todas as posições mostraram uma preferência moderada a muito forte por um determinado resíduo que era normalmente diferente do tipo selvagem. R64K foi o mais preferido (verificado em 81% dos clones); sabe-se que R64K sozinho causa uma melhoria de 3 vezes na afinidade de ligação. Cunningham *et al.*, *Science* 247: 1461-1465 (1990). Depois deste a ordem de preferência foi F54P>I58T>E56D ou E56W.

As afinidades de ligação para muitos destes mutantes foram analisadas através da expressão da hormona livre num hospedeiro não supressor que termina a tradução no codão âmbar no final de hGH e no início do domínio do gene III. Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*. Virtualmente todos os clones testados, entre 3 e 7 ciclos de selecção de ligação a partir da biblioteca da Mini-hélice-1, tiveram afinidades superiores a hGH de tipo selvagem (Tabela 5). O melhor foi K41I,Y42H,L45W,Q46W, que foi melhorado na afinidade 4,5 vezes em relação a hGH de tipo selvagem. Espera-se que esta sequência de ADN ocorra aleatoriamente a uma frequência de um num milhão de clones, o que demonstra a potência da selecção de afinidade. Resultados semelhantes foram obtidos a partir da biblioteca da Volta-A sendo os melhores isolados F54P,R64K e F54P,E56D,I58T,R64K, que são cerca de 5 vezes melhores que hGH de tipo selvagem.

Tabela 5

Dados da ligação para clones de hGH individuais mutados em (A) Mini-hélice-1 ou (B) Volta-A. As constantes de afinidade foram medidas através de ligação de competição a hGHbp *versus* hGH marcada com ^{125}I . A afinidade da hGH de tipo selvagem é de Cunningham e Wells, 1989, *supra*. As vezes de aumento na afinidade sobre hGH para ligação a hGHbp são mostradas como a razão $K_d(\text{hGH})/K_d(\text{Mutante})$. Alguns clones não foram analisados (ND). Foram assumidas afinidades idênticas para variantes equivalentes (†). Os clones com mutações espúrias (E65V † ; S57Y § ; N47Y † ; P48S $^{\otimes}$) estão indicados.

A. Biblioteca da Mini-hélice-1						
Clone	Posição do Resíduo				K_d (pM)	$\frac{K_d(\text{hGH})}{K_d(\text{mut})}$
	41	42	45	46		
hGH	K	Y	L	Q	340	1
3 ciclos						
833A.2	V	S	L	W	190 ± 26	1,8
833B.2	L	R	L	W	190 ± 23	1,8
833A.1	F	R	L	Y	160 ± 23	2,2
833B.1	V	F	L	R	150 ± 19	2,3
833A.4	A	I	Q	W	ND	ND
833B.4	L	Y	V	R	ND	ND
833B.3	Y	W	G	Y	ND	ND
833A.3	F	L	V	L	ND	ND
5 ciclos						
835A.5	G	T	W	T	270 ± 80	1,3
835A.6	I	H	W	W	76 ± 29	4,5
835A.3	R	R	L	F	ND	ND
835A.7	M	R	W	R	ND	ND †
835A.4	R	T	A	V	ND	ND $^{\otimes}$

<i>7 ciclos</i>						
873B.5	R	Q	L	W	140 \pm 20	2,4
873B.6	R	Q	L	W	140 \pm 20	2,4 ⁺
873A.5	R	T	A	V	ND	ND [®]
873B.2	R	S	W	F	ND	ND
<i>consenso:</i>						
	R	R	W	W		
	Q	L				

B. Biblioteca da Volta-A

Posição do Resíduo

Clone	54	56	58	64	K _d (pM)	$\frac{K_d(hGH)}{K_d(mut)}$
hGH	F	E	I	R	340	1
<i>3 ciclos</i>						
783B.4	P	D	T	R	210 \pm 110	1,6
783B.7	P	Y	I	K	170 \pm 30	2,0
783B.2	H	W	L	K	83 \pm 25	4,2
783A.4	M	R	L	K	ND	ND [†]
<i>4 ciclos</i>						
786A.2	G	W	V	R	660 \pm 140	0,50
786A.3	F	W	V	R	630 \pm 120	0,53
786B.3	S	H	L	K	620 \pm 120	0,56 ^s
786B.6	P	W	L	R	520 \pm 100	0,67
786A.6	P	L	D	K	460 \pm 100	0,74
786B.5	P	T	V	K	250 \pm 40	1,4
786B.2	P	Y	I	K	170 \pm 30	2,0 ⁺
786A.5	P	L	Q	K	120 \pm 30	2,8
786A.4	P	D	T	K	61 \pm 8	5,6
786A.1	P	T	P	K	ND	ND
786A.7	P	A	L	K	ND	ND
786B.7	P	C	I	K	ND	ND
<i>6 ciclos</i>						
816B.6	R	D	I	R	350 \pm 250	1,0
816B.4	P	T	V	K	250 \pm 40	1,4 ⁺
816B.1	P	D	I	K	180 \pm 40	1,9
816B.2	P	Y	I	K	170 \pm 30	2,0 ⁺
816A.4	P	E	I	K	73 \pm 16	4,8
816A.6	P	E	I	K	73 \pm 16	4,8 ⁺
816A.5	P	D	T	K	61 \pm 8	5,6 ⁺
816A.1	E	W	V	K	ND	ND
816A.2	P	M	V	K	ND	ND
816A.3	P	L	Q	K	ND	ND
<i>consenso:</i>						
	P	D	I	K		
		W				

(c) Melhoramento da afinidade utilizando princípios de aditividade

De acordo com princípios de aditividade, mutações em partes de uma proteína que não interagem devem combinar-se para produzir alterações aditivas simples na energia livre de ligação (Wells, 1990, *supra*). Por isso, procurou-se melhorar a ligação de hGH através do Local-1 combinando as substituições isoladas a partir de bibliotecas de apresentação fágica (Fig. 7). As três variantes de hGH de ligação mais forte da biblioteca de Hélice-1 (A= F10H,M14G,H18N,H21N, B= F10A,M14W,H18D,H21N e C= M14S,H18F,H21L) foram unidas a cada uma das três variantes de ligação mais forte encontradas na biblioteca de Hélice-4b (D= R167N,D171S,E174S,F176Y,I179T, E= R167E,D171S,E174S,F176Y e F= R167N,D171N,E174S,F176Y,I179T). Todas as construções foram obtidas com rendimentos que se aproximavam do de hGH de tipo selvagem excepto para os que continham a variante A. A variante A e os recombinantes AD, AE, AF migraram como dímeros (PM de cerca de 44 kDa) em SDS-PAGE não redutor e como monómeros (PM de cerca de 22 kDa). Embora estas proteínas não contivessem um resíduo Cys adicional, podia ocorrer troca de dissulfureto se formassem primeiro dímeros não covalentes. De facto, sabe-se que hGH forma um complexo dimérico fraco envolvendo resíduos nas hélices 1 e 4. Cunningham *et al.*, *Science* 253, 1991, *supra*. Contudo, como estas proteínas formavam dímeros de dissulfureto não foram mais investigadas. A variante C é também produzida predominantemente na forma de dímero de dissulfureto; no entanto, os recombinantes CD, CE, CF não formaram uma quantidade suficiente de dímero.

Todos os recombinantes analisados mostraram aumentos cumulativos na afinidade sobre os componentes parentais (Tabela 6). A variante BD teve a maior afinidade, que foi 30 vezes mais forte que hGH de tipo selvagem. A variante de ligação mais forte da biblioteca da Mini-hélice-1 (K41I,Y42H,L45W,Q46W) e uma das mais fortes da biblioteca da Volta-A (F54P,R64K) foram combinadas para produzir o hexamutante, hGH 852b, cuja afinidade foi cerca de 40 vezes superior à de hGH de tipo selvagem. Esta foi junta com o recombinante BD para produzir a variante de hGH, 852d, que se ligou de forma cerca de 400 vezes mais forte que a hGH de tipo

selvagem. Assumindo uma aditividade simples, era esperado que esta variante se ligasse de forma cerca de 600 vezes mais forte que a hGH do produto dos melhoramentos na afinidade pelos componentes individuais; este valor calculado está razoavelmente próximo do resultado. A variante 852d manteve como resíduos de tipo selvagem apenas 5 dos tornados aleatórios (E56, I58, K172, T175, R178).

Tabela 6

Constantes de ligação em equilíbrio das variantes de hGH recombinadas. As constantes de ligação foram medidas através de deslocamento competitivo de hGH de tipo selvagem marcada com ^{125}I , BD ou 852d, utilizando hGHbp e Mab5 (Cunningham e Wells, 1989, *supra*). As vezes de melhoramento na afinidade de ligação são expressas como $K_d(\text{hGH})/K_d(\text{variante})$. Algumas afinidades (†) são de Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*. As variantes de Hélice-1 são B= (F10A,M14W,H18D,H21N) e C= (M14S,H18F,H21L). As variantes de Hélice-4 são D= (R167N,D171S,E174S,F176Y,I179T), E= (R167E,D171S,E174S,F176Y), e F= (R167N,D171N,E174S,F176Y,I179T). BD, BF, CD, CE, CF representam combinações destas mutações. 852b= (K41I,Y42H,L45W,Q46W,F54P,R64K) e 852d= BD + 852b.

Nome da variante	K_d (pM)	$K_d(\text{hGH})$
		$K_d(\text{variante})$
hGH	340 ± 50	1
B †	100 ± 30	3,4
C †	680 ± 190	0,5
D †	40 ± 20	8,5
E †	40 ± 20	8,5
F †	60 ± 30	5,7
BD	10 ± 3	34
CD	11 ± 3	31
CE	14 ± 8	24
BF	16 ± 5	21
CF	21 ± 11	16
852b	$7,9 \pm 2,4$	43
852d	$0,9 \pm 0,3$	380

(d) Bibliotecas combinatórias de hGH

Apesar da aditividade simples verificada em mutantes de combinação de bibliotecas seleccionadas independentemente, foi observada aditividade complexa para algumas substituições vizinhas (p. ex., F176Y que interage com E174S). Lowman *et*

al., *Biochemistry*, *supra*. Algumas cadeias laterais mutadas da hélice 1 (F10, M14, H18, H21) podem potencialmente contactar as mutadas na hélice 4 (R167, D171, T175 e I179). Por isso, foi investigada uma abordagem combinatória para seleccionar mutantes derivados das bibliotecas da Hélice 1 e da Hélice-4b (Huse *et al.*, *Science* 246: 1275-1281 [1989]; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 [1991]). Foram realizadas selecções de ligação independentes nas bibliotecas da Hélice-1 e da Hélice-4b em 0, 2 ou 4 ciclos. O ADN do banco de Hélice-1 foi ligado com o ADN da biblioteca da Hélice-4b que foi seleccionado para ligação ao hGHbp para o mesmo número de ciclos. As três bibliotecas combinatórias foram então seleccionadas em 2 a 7 ciclos adicionais e foram sequenciados 68 clones representativos (Tabela 7).

Tabela 7

Variantes de hGH da selecção de ligação hormona-fagemídeo de bibliotecas combinatórias. Todas as variantes contêm (E174S, F176Y), excepto as que têm a sequência da Hélice 4 de tipo selvagem (-), que não eram recombinantes. As bibliotecas 707A, 707B e 707E, ou 707C foram seleccionadas durante 2 a 7 ciclos para ligação a hGHbp (ver texto). Os números listados sob P indicam a ocorrência fraccional entre os clones sequenciados. Os números listados sob # designam cada isolado independente (p. ex., pH0714A.1 é a primeira sequência). Algumas afinidades são de Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*; assume-se que variantes equivalentes têm afinidades idênticas ([†]). Várias variantes surgiram como >10% de dímeros de dissulfureto ([†]). Um clone continha um codão âmbar (TAG= Gln em estirpes *SupE*) ([§]), um continha uma mutação espúria, E174N ([†]) e um ([®]) continha duas mutações espúrias (L15R, K168R). Algumas variantes não foram expressas (NE) ou não foram analisadas (ND).

			Hélice 1				Hélice 4b				K _d (pM)	K _d (hGH) K _d (mut)
Clone	P	#	F10	M14	H18	H21	R167	D171	T175	I179		
(A) Combinatório de bibliotecas não seleccionadas: Após 4 ciclos (pH0714A, 5 sequências):												
A	0,60	1	H	G	N	N	N	S	T	N	ND	
B	0,40	4	A	N	D	A	N	N	T	N	50±40	6,8 ^{†®}
(B) Combinatório de bibliotecas seleccionadas 2×: Após 2 ciclos (pH0712B, 7 sequências):												
A	0,14	1	F	S	F	G	H	S	T	T	ND	
B	0,14	2	H	Q	T	S	A	D	T	T	ND	
C	0,14	4	H	G	N	N	N	A	T	T	ND	
D	0,14	5	F	S	F	L	S	D	T	T	ND	
E	0,14	6	A	S	T	N	-	-	-	-	ND	
F	0,14	7	Q	Y	N	N	H	S	T	T	74±30	4,6
G	0,14	8	W	G	S	S	-	-	-	-	ND	

Após 2 ciclos (pH0712E, 8 sequências):												
H	0,13	1	F	L	S	S	K	N	T	V	ND	
I	0,13	2	W	N	N	S	H	S	T	T	160±70	2,1
J	0,13	3	A	N	A	S	N	S	T	T	ND	
K	0,13	4	P	S	D	N	—	—	—	—	ND	
L	0,13	5	H	G	N	N	N	N	T	T	ND	
M	0,13	6	F	S	T	G	—	—	—	—	ND	
N	0,13	7	M	T	S	N	Q	S	T	T	ND	
O	0,13	8	F	S	F	L	T	S	T	T		
Após 4 ciclos (pH0714B, 6 sequências):												
A	0,17	1	A	W	D	N	—	—	—	—	100±30	3,3 [†]
B	0,17	2	A	W	D	N	H	S	T	N	ND	
C	0,17	3	M	Q	M	N	N	S	T	T	NE [†]	
D	0,17	4	H	Y	D	H	R	D	T	T	ND	
E	0,17	5	L	N	S	H	—	—	—	—	820±200	0,4 [†]
F	0,17	6	L	N	S	H	T	S	T	T	34±19	
Após 6 ciclos (pH0716B, 8 sequências):												
A	0,38	2	A	W	D	N	—	—	—	—	100±30	3,3 [†]
B	0,13	4	A	W	D	N	N	S	T	S	ND	
C	0,13	7	A	W	D	N	K	D	T	T	ND	
D	0,13	1	A	T	S	N	N	S	T	T	ND	
E	0,13	3	M	A	D	N	N	S	T	T	68±46	5,0 ^{††}
F	0,13	5	H	Y	D	H	N	S	T	T	ND	
(pH0716E, 8 sequências):												
G	0,38	1	A	H	A	S	N	S	T	T	ND	
H	0,25	7	F	S	L	A	N	S	T	I	ND	
I	0,13	3	H	Y	D	H	Y	S	T	S	ND	
J	0,13	4	V	L	D	H	N	S	T	T	ND	
K	0,13	6	A	W	D	N	N	N	T	I	ND [§]	
Após 7 ciclos (pH0717B, 12 sequências):												
A	0,33	1	A	W	D	N	N	A	T	T	12±6	28
B	0,17	6	A	W	D	N	—	—	—	—	100±30	3,3 [†]
C	0,08	11	A	W	D	N	N	S	T	N	ND	
D	0,08	13	A	W	D	N	R	N	T	T	ND	
E	0,08	14	A	W	D	N	K	S	T	S	ND	
F	0,08	2	F	S	T	G	—	—	—	—	ND	
G	0,08	7	I	Q	E	H	N	S	T	T	16±10	21
H	0,08	15	H	Y	D	H	N	S	T	T	ND	
(pH0717E, 8 sequências):												
I	0,50	1	F	S	L	A	N	S	T	V	32±5	11
J	0,25	13	A	H	A	S	N	S	T	T	ND	
K	0,13	14	A	W	D	N	A	N	T	T	ND	
L	0,13	11	H	Y	D	H	Y	S	T	S	ND	
(B) Combinatório de bibliotecas selecionadas 4×:												
Após 4 ciclos (pH0714C, 6 sequências):												
A	0,67	2	F	S	F	L	K	D	T	T	150±70	2,3 [†]
B	0,17	1	F	S	F	L	N	S	T	T	11±3	31 [†]
C	0,17	5	M	A	D	N	N	S	T	T	68±46	5,0 ^{††}

Globalmente, as variantes de maior afinidade isoladas a partir de qualquer uma destas três selecções combinatórias pareciam-se com as anteriormente isoladas através de selecção independente das bibliotecas de Hélice-1 e Hélice-4b. Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*. Por exemplo, os mutantes de maior afinidade anteriormente isolados a partir da biblioteca de Hélice-1 foram F10A,M14W,H18D,H21N (Hélice-1.B) e F10H,M14G,H18N,H21N (Hélice-1.A); estes ligaram-se de forma cerca de 3,3 vezes e 2,4 vezes mais forte que hGH de tipo selvagem, respectivamente. A sequência da Hélice 1.A foi recuperada em 60% dos clones da Biblioteca Combinatória A, e em 13% dos clones isolados em ciclos iniciais de selecção a partir da Biblioteca Combinatória B. A sequência da Hélice-1.B predominou nos últimos ciclos de selecção da Biblioteca Combinatória B. A maioria destes eram clones (não eram irmãos nem contaminantes), porque tinham sequências de ADN diferentes e normalmente diferiam nos mutantes seleccionados na hélice 4.

Resultados semelhantes foram obtidos com os seleccionados na hélice 4. Quando a biblioteca da Hélice-4b foi independentemente seleccionada, foram obtidas várias sequências contendo R167N, D171S ou N, T175 (conservada) e I179T. Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*. Estes eram os mesmos resíduos que tendiam a ser seleccionados nas Bibliotecas Combinatórias A, B e C. De facto, um dos melhores mutantes anteriormente isolados (R167N,D171S,T175,I179T) era vulgarmente isolado através de selecção combinatória e predominava especialmente nos últimos ciclos.

Algumas sequências seleccionadas através de meios combinatórios eram muito diferentes das seleccionadas a partir das duas bibliotecas independentes; mas isto podia surgir por razões estatísticas. Por exemplo, as bibliotecas da Hélice-1 e da Hélice-4b contêm cerca de 10^6 sequências de ADN diferentes e se combinadas (sem pré-selecção) teriam 10^{12} combinações possíveis.

As eficiências de transformação limitam o tamanho da amostragem a menos de, ou ao mesmo que 10^7 clones independentes. Assim, a selecção das mesmas sequências é notável dada a elevada diversidade de sequências possíveis

nestas bibliotecas e os melhoramentos suaves na afinidade a seleccionar.

Foram medidas as afinidades para vários destes isolados (Tabela 7). Todos tiveram uma melhor afinidade de ligação (2 a 29 vezes) em comparação com hGH de tipo selvagem. A maioria melhorou em relação a E174S,F176Y, que estava presente em todos os clones de partida, e causaram independentemente um aumento de 5,6 vezes na afinidade em relação a hGH de tipo selvagem. Lowman *et al.*, *Biochemistry, supra*. As variantes de maior afinidade foram geralmente isoladas a partir dos últimos ciclos de selecção e eram altamente abundantes nestes bancos. Por exemplo, o mutante de afinidade mais alta testado foi o clone 717B.1, que foi isolado após sete ciclos de selecção da Biblioteca Combinatória B. Este isolado representava um terço dos clones nesse banco. Notavelmente, este clone é idêntico à variante BD (Tabela 6), excepto que em vez de D171S continha a substituição conservativa, D171A. Não surpreendentemente, as variantes 717B.1 e BD ligaram-se com afinidades comparáveis (12 pM e 10 pM, respectivamente). Estes dados indicam que as estratégias combinatória e aditiva produzem soluções comparáveis para uma optimização com sucesso da afinidade.

(e) Teste da importância de cada cadeia lateral na maturação da afinidade

A contribuição de alguns dos resíduos melhorados por fagos para a afinidade de ligação foi avaliada através da sua introdução em hGH de tipo selvagem, ou através da sua conversão de novo para o resíduo de tipo selvagem na variante BD de afinidade madura (Tabela 8). A variante K41I,Y42H,L45W,Q46W ligou-se de forma 4,5 vezes mais forte que hGH de tipo selvagem. Cada um dos mutantes individuais em hGH causou reduções na afinidade de 1,7 a 2,5 vezes. Isto indica que a combinação de mutações neste local é crítica para os melhoramentos na afinidade. Estes resíduos ficam em posições adjacentes numa face da mini-hélice-1.

Tabela 8

Testes das contribuições de cada uma das cadeias laterais identificadas por apresentação fágica. As afinidades de ligação ao receptor das variantes foram medidas através de BIAcore™ ([†]) ou através de RIA (não marcado) e normalizadas para o valor de RIA para hGH tal como determinado por Cunningham e Wells, 1989, *supra*. Foram feitas mutações pontuais para testar as contribuições de cada uma das cadeias laterais verificadas após selecção fágica. As vezes de diminuição na afinidade foram expressas como $K_d(\text{revertente})/K_d(\text{parental})$, onde parental é o fundo utilizado para a mutagenese.

Mutantes pontuais em fundo de K_d (pM) tipo selvagem:		$\frac{K_d(\text{mut})}{K_d(\text{hGH})}$
hGH (tipo selvagem)	340 ± 50	1
[†] K41I	580 ± 140	1,7
[†] Y42H	860 ± 50	2,5
[†] L45W	722 ± 60	2,1
[†] Q46W	780 ± 100	2,3
Revertentes em fundo BD: K_d (pM)		$\frac{K_d(\text{mut})}{K_d(\text{BD})}$
BD	10 ± 3	1
D18H,N21H	12 ± 9	1,1
A10F,W14M	13 ± 5	1,2
A10F	13 ± 4	1,3
N167R,S171D	17 ± 8	1,6
T179I	18 ± 9	1,7
Y176F	49 ± 21	4,6

Os melhoramentos na afinidade causados pelas substituições na variante BD foram testados através da sua mutação de novo para os resíduos de tipo selvagem individualmente ou aos pares (quando os resíduos estavam adjacentes) (Tabela 8). Isto mostrou que sete das nove substituições contribuem apenas com melhoramentos muito subtis na ligação (1,1 a 1,7 vezes). Mesmo o efeito mais dominante, F176Y, confere apenas um melhoramento na ligação de 4,6 vezes. Contudo, o produto destes efeitos no octamutante, F10A,M14W,H18D,H21N,R167N,D171S,F176Y,I179T, previa um melhoramento de 16 vezes na afinidade *versus* hGH de tipo selvagem. Este compara-se com o aumento de 34 vezes medido para a variante BD que contém adicionalmente E174S.

(f) Efeitos da maturação da afinidade na cinética de ligação

No Exemplo I, o dispositivo biossensor BIAcore™ foi utilizado para medir a cinética de ligação para mutantes de

alanina produzidos em resíduos de hGH que se tornam ocultos no Local 1 após ligação ao receptor. Para uma melhor compreensão da base molecular para os melhoramentos de afinidade aqui seleccionados, o biossensor BIAcoreTM foi utilizado para medir a sua cinética de ligação ao hGHbp (Tabela 9). Em geral, como a afinidade de hGH de tipo selvagem foi aumentada, a taxa de dissociação diminuiu com pouca alteração na taxa de associação. De facto, do tipo selvagem para o mutante de mais alta afinidade, 852d, houve uma diminuição de >60 vezes na taxa de dissociação e apenas um aumento de 4 vezes na taxa de associação. (A taxa de dissociação foi demasiado lenta para medir com exactidão, mas se fosse calculada a partir da K_d medida por RIA e da taxa de associação, a taxa de dissociação seria 100 vezes mais lenta que a da hGH de tipo selvagem). O local de ligação de hGH tinha sido anteriormente recrutado para um homólogo da hGH, o lactogénio placentário humano (hPL). Este difere em 15% da sequência de hGH e liga-se de forma ~2000 vezes mais fraca. Lowman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, *supra*. A variante de hPL recrutada tem parâmetros cinéticos para ligação que são semelhantes aos da hGH (Tabela 9). Tal como a variante de hGH de afinidade madura, este mutante mostra melhoramentos muito maiores na taxa de dissociação (~100 vezes) em comparação com a taxa de associação (cerca de 10 vezes) relativamente à hPL de tipo selvagem. O facto de a taxa de dissociação ser mais afectada entre os seleccionados fágicos indica que a selecção foi efectuada sob condições que se aproximam do equilíbrio.

Tabela 9

Cinética de ligação das variantes de hGH. Foram realizadas medições com o biossensor BIAcore™ com hGHbp imobilizado (S201C) em tampão PBS + Tween-20 a 0,05%. A K_d do biossensor BIAcore™ é calculada a partir de $k_{\text{dissociação}}/k_{\text{associação}}$, excepto para hPL, para a qual a $k_{\text{associação}}$ e K_d foram medidas e a $k_{\text{dissociação}}$ foi calculada ([†]). A razão das K_d s indica as vezes de aumento na afinidade de ligação vs. wt-hGH de acordo com os dados do biossensor BIAcore™. As combinações de mutantes em hGH são designadas por números romanos. A hPL (0274) contém V4I, D56E, M64R, E174A, M179I.

Mutante	$k_{\text{associação}}/10^4$ $M^{-1}s^{-1}$	$k_{\text{dissociação}}/10^{-5}$ s^{-1}	K_d (nM)	$\frac{K_d(\text{hGH})}{K_d(\text{mut})}$
hPL	3,2	6000 [†]	1800	0,0006
hPL(0274)	43	49	1,1	0,79
hGH(822a1)	40	53	1,3	0,93
{10Y,14E,18R,21G}				
hGH	24	34	1,4	1
I. hGH (835a6)	13	6,9	0,52	2,7
{41I,42H,45W,46W}				
II. hGH (816a4)	21	6,6	0,31	4,5
{54P,64K}				
III. hGH (852b)	36	5,1	0,14	10
{I + II}				
IV. hGH (BD)	20	3,0	0,15	9,3
hGH (852d)	98	≤0,6	≤0,006	≥230
{III + IV}				

Conclusão

Foram mutadas aleatoriamente regiões de hGH que se pensava serem importantes quer porque estavam em contacto com o receptor quer porque quando convertidas em alanina afectavam a afinidade de ligação. Assim, um mutante aleatório médio destas bibliotecas devia ter uma afinidade de ligação dramaticamente reduzida em relação a hGH de tipo selvagem. No entanto, após apenas alguns ciclos de selecção, os isolados ligaram-se com uma afinidade semelhante e frequentemente superior à da hGH de tipo selvagem. Os clones isolados exibiam normalmente sequências de consenso que eram diferentes das do tipo selvagem (Tabela 4).

Melhoramentos muito pequenos na afinidade conduziram a uma convergência rápida e quase exclusiva nestas bibliotecas. Por exemplo, o mutante R64K liga-se separadamente de uma forma apenas cerca de 3 vezes mais forte que a hGH de tipo selvagem (Cunningham *et al.*, 1990, *supra*). No entanto, após apenas três

ciclos de selecção de ligação R64K dominava a biblioteca (Tabela 5). Semelhantemente, I179T contribuiu com um melhoramento na afinidade de apenas 1,7 vezes (Tabela 8). No entanto, quando seleccionado separadamente na biblioteca de Hélice-4b de Lowman e Wells, *supra*, ou combinatorialmente com mutantes na Hélice-1 (Tabelas 4 e 7) verificou-se que I179T era seleccionado quase exclusivamente. A forte selecção destes melhoramentos subtis na afinidade enfatiza o poder desta técnica para recuperação das variantes com maior afinidade no banco.

Nem todas as variantes são apresentadas no fago (ver Wells e Lowman, *Current Opinion in Struct. Biol.* 2: 597-604 [1992]). Isto é porque os mutantes que são mal dobrados ou instáveis podem ser digeridos por proteases, agregados ou bloqueados na secreção ou montagem no fago. Embora não pareça ser uma tendência forte contra determinadas sequências de ADN, existe uma clara selecção de mutantes contra mutantes contendo Cys, selecção essa que foi anteriormente observada para mutantes de hGH (Lowman e Wells, *supra*). O número de códons mutados simultaneamente foi deliberadamente limitado a quatro (cerca de 10^6 sequências de ADN) para que houvesse uma boa probabilidade de ter cada um representado no banco de fagemídeos de partida (cerca de 10^7 transformantes independentes).

Menos de metade das cadeias laterais que se tornam ocultas no Local 1 pelo primeiro receptor afectam significativamente a afinidade de ligação quando convertidas em alanina [Exemplo I, Fig. 1A]. Os resíduos de contacto da mini-hélice-1 proporcionam um bom exemplo disto (Tabela 3). As cadeias laterais Y42 e Q46 fazem mais contactos de van der Waals e sofrem mais ocultação sozinhas que K41 e L45 combinadas. No entanto, Y42 e Q46 quase não têm efeito sobre a ligação em comparação com as mutações em K41 e L45.

Estes estudos indicam que a funcionalidade não é facilmente avaliada através do grau em que uma cadeia lateral faz contacto com o receptor. Outro modo de avaliar isto é correlacionar a conservação de resíduos de tipo selvagem após selecção de ligação com o grau em que são ocultados pelo receptor. Tal como mostrado na Fig. 8A, globalmente não existe

essencialmente correlação ($R^2=0,022$) com a conservação de resíduos de tipo selvagem de bibliotecas de fagemídeos. Isto é também evidente através da comparação da Fig. 6B e Fig. 6C. No entanto, as três cadeias laterais mais conservadas (T175, R178, L45) têm todas um contacto substancial com o receptor.

Existe uma correlação razoável ($R^2=0,71$) entre a redução na afinidade avaliada através de mutagénese por pesquisa com alanina e a conservação das cadeias laterais após selecção fágica (Fig. 8B; comparar Fig. 6A e Fig. 6C). É observada uma correspondência quase linear ($y=3,9+1,0x$). Se os dados das bibliotecas Combinatórias forem incluídos, é adicionado R167 e a correlação cai para 0,65. A tendência para a importância funcional *versus* conservação é um argumento para a consideração da informação funcional para escolha dos resíduos a tornar aleatórios sobre considerações da estrutura (Fig. 8A).

Estes dados indicam que a funcionalidade determinada através de mutagénese por pesquisa com alanina é semelhante à determinada através de conservação da sequência após selecção de ligação. No entanto, não existe correlação ($R^2=0,005$) entre a frequência de conservação de certos resíduos entre hormonas do crescimento variantes naturais e a conservação após selecção de ligação a partir de bibliotecas de apresentação fágica (Fig. 8C). Na natureza os constrangimentos funcionais na hormona do crescimento não são fixos tal como o são na selecção de ligação *in vitro*.

Muitos dos resíduos seleccionados em locais funcionalmente importantes e altamente ocultos, na interface ou na própria hormona, tendem a ser mantidos como o resíduo de tipo selvagem ou um homólogo próximo. Por exemplo, todos os cinco dos resíduos que são mais conservados como o de tipo selvagem após extensa selecção fágica (E56, I58, K172, T175 e R178) estão completamente ocultos no complexo; a sua conversão em alanina causou reduções na afinidade de 4 a 60 vezes (Cunningham e Wells, 1989, *supra*). Quando eram toleradas substituições nestas posições eram tipicamente semelhantes ao resíduo de tipo selvagem. Por exemplo, os seleccionados de maior afinidade continham Asp ou Glu na posição 56, resíduos beta-ramificados na posição 58, Lys ou

Arg em 172, Thr ou Ser em 175, e Lys ou Arg em 170 (Tabela 5; Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*).

Existe outro grupo de resíduos funcionalmente importantes que se tornam altamente ocultos após ligação ao receptor (K41, L45, R64, D171 e I179). Quando estes foram tornados aleatórios, verificaram-se substitutos melhorados que tendiam a ser semelhantes no carácter ao resíduo de tipo selvagem. Por exemplo, K41 foi frequentemente substituído por Arg; L45 foi substituído por grandes cadeias laterais hidrófobas; R64 foi muito frequentemente substituído por Lys; D171 foi optimamente substituído por Asn e por vezes Ser; I179 foi normalmente substituído por resíduos β -ramificados (Tabelas 4, 5 e 7; Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*). Assim, podem ser feitos melhoramentos em resíduos funcionalmente importantes ocultos na interface - estes tendem a ficar na direcção de uma cadeia lateral isostérica ou uma de carácter químico semelhante.

Dois dos resíduos que foram tornados aleatórios (H18 e E174) tinham uma afinidade de ligação maior quando convertidos em alanina e ficaram completamente ocultos no complexo. Estes foram quase sempre seleccionados como algo menor que o resíduo de tipo selvagem. Por exemplo, a substituição preferida para H18 foi Asp ou Asn e para E174 foi Ala, Ser ou Thr. Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*. O empacotamento nestas posições, chamadas determinantes de impedimento, é energeticamente desfavorável.

Outra classe de resíduos (H21, Y42, Q46 e R167) ficam altamente ocultos na interface mas têm pouco e nenhum efeito na afinidade de ligação quando convertidos em alanina. Estes resíduos raramente mudavam de novo para o resíduo de tipo selvagem. Por exemplo, H21 tendia a mudar para Asn; Y42 voltava frequentemente como Arg ou Gln; Q46 preferia Trp e R167 era frequentemente escolhido como Asn (Tabelas 4, 5 e 7; Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*). Apesar do consenso verificado nestes resíduos ocultos os aumentos de afinidade feitos a partir deles eram muito pequenos (Tabela 8). Assim, parecia mais difícil obter melhoramentos na afinidade a partir de resíduos de contacto que fossem funcionalmente inertes.

O último grupo de resíduos (F10, M14 e F54) ficam virtualmente ocultos na hormona dobrada e afectam a afinidade de ligação em 2 a 4 vezes quando convertidos em alanina, presumivelmente através de efeitos estruturais indirectos. Surpreendentemente, foram aqui toleradas substituições radicais que mostram uma selecção de consenso (Tabelas 4, 5 e 7; Lowman *et al.*, *Biochemistry*, *supra*). Por exemplo, F54P foi quase a única solução na biblioteca da Volta-A. Phe 54 fica 84% oculto na hormona e a 10 Å de fazer contacto com o receptor. Estima-se que o mutante F54P aumente a afinidade num factor de cerca de 1,6 vezes com base no facto de que o duplo mutante (F54P,R64K) fica com uma ligação 4,8 vezes melhor (Tabela 5) e o mutante R64K sozinho aumenta a ligação num factor de ≈ 3 (Cunningham *et al.*, 1991, *supra*). Os resíduos 10 e 14 tendem a co-variarem, o que não é surpreendente, dadas as suas posições adjacentes ao longo da hélice 1. Em geral, a soma dos volumes destas duas cadeias laterais nos seleccionados tende a ser a mesma ou menor que a de F10 mais M14. Isto é consistente com o seu arranjo fortemente empacotado.

Embora seja possível racionalizar as características gerais destes mutantes através da combinação dos dados funcionais e estruturais, existem sempre mutantes invulgares que passam através da selecção. Por exemplo, I179 foi quase sempre conservativamente substituído por uma cadeia lateral β -ramificada (especialmente Ile ou Thr), mas I179S também apareceu (Tabela 7). Semelhantemente, L45 foi quase sempre substituído por uma grande cadeia lateral (Leu ou Trp), mas também se verificou L45A (Tabela 5). Desde que sejam capazes de se dobrar, pode esperar-se que tais variantes persistam através de muitos ciclos de selecção a um nível de fundo, apesar de não melhorarem ou poderem mesmo enfraquecer a afinidade de ligação.

Estes estudos indicam linhas directrizes para a maturação da afinidade de interfaces de ligação utilizando apresentação fágica monovalente. Um ponto de partida para uma optimização eficiente da afinidade é uma pesquisa completa com alanina da interface relevante. Pode pesquisar-se facilmente mais de 5 ou 6 codões exaustivamente (Lowman e Wells, *supra*); por isso, a biblioteca necessita centrar-se em resíduos onde se possa

esperar melhorar a afinidade. É também possível limitar as escolhas dos codões (ver, p. ex., Arkin e Youvan, *Bio/Technology* 10: 297-300 [1992]), mas isto faz suposições acerca do que podem ou não ser substituições úteis. Isto é mais razoável de fazer se se tiver conhecimento detalhado *a priori* da interface estrutural.

Os resíduos onde ocorreram os melhoramentos na afinidade mais óbvios foram aqueles que se mostrou através de mutagénese por pesquisa com alanina que mais afectavam a ligação. Por exemplo, os maiores melhoramentos da afinidade vieram de R64K, E174S e F176Y. Sabia-se que E174A aumentava a afinidade, mas R64A e F176A causaram grandes reduções na afinidade. Assim, apesar do facto de os resíduos mais altamente conservados na selecção fágica terem sido os que eram mais importantes através de mutagénese por pesquisa com alanina, havia ainda variantes melhoradas a encontrar.

Os dados funcionais podem ser mais importantes para atingir resíduos para optimização que os dados estruturais. Por exemplo, vários resíduos que não estão em contacto com o receptor (F10, M14 e F54), mas que afectaram a ligação quando convertidos em alanina, produziram aumentos da afinidade quando mutados aleatoriamente. Para além disso, alguns resíduos em contacto com o receptor, mas de pouca significância funcional através de mutagénese por pesquisa com alanina (Y42, Q46), não conseguiram melhorar a afinidade quando as mutações fágicas foram examinadas como mutações pontuais (Tabela 8).

Idealmente, deve tornar-se aleatórios resíduos que podem contactar uns com os outros no mesmo passo de mutagénese de forma a permitir que co-variem. Co-variância foi observada nas bibliotecas da Hélice-1, Mini-hélice-1 e Hélice-4a quando os resíduos estavam suficientemente próximos para interagirem. A selecção de bibliotecas por meios combinatórios é especialmente útil em situações onde as mutações podem conduzir a efeitos aditivos complexos. Por exemplo, se substituições de cadeias laterais causarem grandes alterações conformacionais, tal como o podem fazer em voltas flexíveis em anticorpos, a selecção combinatória permitiria melhoramentos através da pesquisa aleatória das melhores combinações de

cadeias pesada e leve mutantes. Huse *et al.*, *supra*; Clackson *et al.*, *supra*; Collet *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10026-10030 (1992).

Contudo, tenderam a ocorrer melhoramentos em hGH através de simples efeitos aditivos tanto entre bibliotecas como dentro das bibliotecas e mesmo quando as cadeias laterais podiam interagir. Praticamente, isto significa que se podem tornar aleatórios muitos resíduos independentemente e combiná-los no final para obter variantes de alta afinidade. Fundamentalmente, isto indica que as interacções entre as cadeias laterais, mesma as vizinhas, têm frequentemente pouco efeito, ou podem ser compensadas sem um efeito significativo na energia livre de ligação ao receptor. Ver também, Lowman e Wells, *J. Mol. Biol.* 234: 564-578 (1993).

EXEMPLO III

A Variante B2036

Foi construído outro polipéptido variante de GH com a intenção de reduzir uma potencial imunogenicidade através da limitação do número de resíduos substituídos no polipéptido, mantendo no entanto uma maior afinidade de ligação no Local 1. Um segundo objectivo desta experiência foi o de limitar o número de resíduos de lisina que ocorrem na molécula, especialmente que ocorrem em locais importantes na ligação de GH ao seu receptor, tornando deste modo a variante num melhor candidato para modificação com polietilenoglicol ("PEGuilação"), ao mesmo tempo que se conserva a maior afinidade da variante para o seu receptor.

Assim, utilizando os dados descritos acima para a criação do "supermutante" 852d, foi construída outra variante de hGH, B2036, utilizando as técnicas descritas acima. 852d tem as seguintes substituições:

F10A, M14W, H18D, H21N, K41I, Y42H, Q46W, F54P, R64K, R167N, D171S, E174S, F176Y, I179T.

Em contraste, a variante aqui construída (B2036) tem as seguintes substituições:

H18D, H21N, G120K, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T.

A substituição de G120K foi adicionada para criar um melhor candidato antagonista, embora outras substituições nessa posição sejam aceitáveis. Qualquer aminoácido pode ser substituído em G120 para criar um antagonista; de preferência, a substituição é lisina, arginina, triptofano, tirosina, fenilalanina ou glutamato. A substituição R64K foi omitida de forma a proteger da "PEGuilação" os resíduos de ligação do local 1. Semelhantemente, as substituições K168A e K172R foram adicionadas a B2036 para reduzir o número de locais disponíveis para "PEGuilação" na interface de ligação do local I da hormona-receptor. Em contraste, a substituição G120K disponibiliza uma lisina adicional para "PEGuilação" ao mesmo tempo que proporciona um bloqueio eficaz do local 2.

As restantes substituições em 852d foram omitidas da construção de B2036 para se reduzir uma possível antigenicidade da variante em humanos. Embora seja esperada alguma redução na afinidade em comparação com 852d, a afinidade esperada de B2036 para o seu receptor é ainda substancialmente superior à do tipo selvagem e é desejável para utilizar como antagonista.

Espera-se que B2036 possa ser ainda modificada através do restauro da glicina no resíduo 120, criando deste modo um candidato para utilizar como agonista que se espera tenha uma antigenicidade reduzida em humanos em comparação com 852d. Semelhantemente, um tal candidato seria mais optimamente "PEGuilado", uma vez que o número de resíduos de lisina dentro da interface do local I é menor em comparação com o "supermutante".

EXEMPLO IV COMPARATIVO

A Variante B2024

Foi construído outro polipéptido de GH variante com a intenção de reduzir uma potencial imunogenicidade através da limitação do número de resíduos substituídos no polipéptido, mantendo no entanto uma maior afinidade de ligação no local 1. Um segundo objectivo desta experiência foi o de limitar o número de resíduos de lisina que ocorrem na molécula, especialmente que ocorrem em locais importantes na ligação de GH ao seu receptor, tornando deste modo a variante num melhor

candidato para modificação com polietilenoglicol ("PEGuilação"), ao mesmo tempo que se conserva a maior afinidade da variante para o seu receptor.

Assim, foram combinadas mutações de alanina através de mutagénesse dirigida ao local para produzir uma variante da hormona do crescimento possuindo uma "taxa de dissociação" do receptor da hormona do crescimento mais lenta que a hormona do crescimento de tipo selvagem. A variante B2024 tem assim a seguinte sequência:

H18A, Q22A, F25A, D26A, Q29A, E65A, K168A, E174A, G120K.

A substituição G120K foi adicionada para criar um melhor candidato antagonista, embora outras substituições nessa posição sejam aceitáveis. Qualquer aminoácido pode ser substituído em G120 para criar um antagonista; de preferência, a substituição é lisina, arginina, triptofano, tirosina, fenilalanina ou glutamato.

Espera-se que B2024 possa ser ainda modificada através do restauro da glicina no resíduo 120, criando deste modo um candidato para utilizar como agonista que se espera ter uma antigenicidade reduzida em humanos. Semelhantemente, um tal candidato seria mais optimamente "PEGuilado" em comparação com 852d, uma vez que o número de resíduos de lisina dentro da interface I é menor em comparação com o "supermutante".

EXEMPLO V

Produção da Variante B2036

A variante B2036 foi produzida de acordo com o seguinte protocolo exemplar.

Métodos

(a) Vector de Expressão e Células Hospedeiras

O vector utilizado para expressão da variante B2036 em *E. coli* foi pMY223 (Fig. 10). O plasmídeo pMY223 baseia-se no plasmídeo bem caracterizado pBR322 e é semelhante ao plasmídeo de produção de hGH pHGH4R (Chang et al., *Gene* 55: 189-196 [1987]), excepto que a sequência de codificação de B2036 substitui a sequência de codificação de hGH. pMY223 codifica resistência aos antibióticos tetraciclinas, mas ao contrário

de pBR322 é sensível a antibióticos β -lactâmicos (penicilina, ampicilina, etc.).

As diferenças de aminoácidos entre a variante B2036 codificada por pMY223 e a sequência da hormona do crescimento humana de tipo selvagem são mostradas na Tabela 10, juntamente com os codões nesses locais.

Tabela 10

Diferenças de sequência entre a variante B2036 codificada por pMY223 e hGH de tipo selvagem

Aminoácido de tipo selvagem	Nº do aminoácido	Aminoácido de B2036	Codão de B2036
His	18	Asp	GAC
His	21	Asn	AAC
Gly	120	Lys	AAG
Arg	167	Asn	AAC
Lys	168	Ala	GCG
Asp	171	Ser	AGC
Lys	172	Arg	AGG
Glu	174	Ser	AGC
Ile	179	Thr	ACC

A variante B2036 é expressa a partir de uma cassette de expressão de 1106 pb clonada num local de restrição *Pst*I-*Eco*RI. A cassette de expressão contém uma única cópia da sequência de codificação da variante B2036 fundida enquadrada com o péptido sinal da enterotoxina termoestável (STII) de 23 resíduos (Picken *et al.*, *Infection and Immunity* 42: 269-275 [1996]). A transcrição da variante B2036 é dirigida pelo promotor *phoA* de *E. coli* (Chang *et al.*, *Gene* 44: 121-125 [1986]). É proporcionado um local de iniciação da tradução através da sequência de Shine-Dalgarno de STII. A tradução começa com o péptido sinal de STII, que dirige a translocação da variante B2036 através da membrana citoplasmática para o espaço periplasmático. O péptido sinal de STII é então removido através da líder-peptidase de *E. coli*. A proteína madura dobra-se na sua conformação correcta no periplasma e formam-se ambas as ligações dissulfureto.

O plasmídeo pMY223 foi construído através de uma ligação de três vias de fragmentos dos plasmídeos pB2036 e pHGH4R. Mais especificamente, um fragmento *NsiI*-*PvuII* de 565 pares de bases (pb) de pB2036 contendo a sequência de codificação da variante B2036 foi ligado ao esqueleto *NsiI*-*BamHI* e ao fragmento *PvuII*-*BamHI* de 405 pb de pHGH4R.

O plasmídeo pB2036 foi derivado do plasmídeo pS0643, também conhecido como pHGHam-g3 (a construção do qual está descrita em Lowman *et al.*, *Biochemistry* 30: 10832-10838 [1991]), que foi o plasmídeo de partida empregue nos estudos de apresentação fágica descritos no Exemplo II. pB2036 difere de pS0643 por a sequência de codificação de B2036 substituir a sequência de codificação de hGH.

A célula hospedeira para expressão da variante B2036 foi *E. coli* 33B6, que é um derivado de *E. coli* W3110 (ver *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Celullar and Molecular Biology 2: 1190-1219 [Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987]). O genótipo completo de 33B6 é $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $deoC2$ $degP41(\Delta PstI-Kan^r)$ $IN(rrnD-rrnE)1$ $ilvG2096(Val^r)$. A derivação de 33B6 está descrita abaixo.

A estirpe de partida, *E. coli* W3110, é um derivado de *E. coli* K-12 que é F^- e resistente a lambda. Mostrou-se que possuía uma inversão do cromossoma entre *rrnD* e *rrnE*.

O gene *fhuA* (anteriormente designado *tonA*) foi suprimido de W3110 através de excisão imprecisa de Tn10 após a sua inserção no gene *fhuA*. A estirpe resultante, 1A2, é resistente aos bacteriófagos T1, T5 e ø80.

Duas mutações de deleção, $phoA\Delta E15$ e $\Delta(argF-lac)169$, foram simultaneamente introduzidas em 1A2 através de co-transdução com P1 com uma inserção de Tn5 ligada no gene *proC*. A excisão com precisão do transposão restaurou o gene *proC*. A mutação $phoA\Delta E15$ elimina a expressão de fosfatase alcalina e a mutação $\Delta(arg-lac)169$ é responsável pelo fenótipo Lac- desta estirpe, 7C1.

A mutação *deoC2*, que eliminou a expressão da desoxirribose-fosfato-aldolase, foi introduzida por co-transdução com P1. O locus *deoC* está geneticamente ligado ao locus biossintético da treonina. Foi criado um auxotrofo de treonina através de inserção de Tn10 e excisão imprecisa. O auxotrofo de treonina foi então transduzido para prototrofia de treonina com o fago P1 criado num mutante *deoC2*. A presença da mutação *deoC2* foi confirmada pela incapacidade da estirpe resultante, 16C9, para crescer em timidina a 0,2% como fonte de carbono.

A *degP41*(Δ PstI-Kan^R), uma mutação no gene para uma protease periplasmática, foi introduzida através de transdução. Esta mutação foi construída *in vitro* através da substituição de uma secção do gene *degP* por um gene de resistência à canamicina. Isto não é um transposão, mas permite selecção da deleção utilizando resistência à canamicina. A estirpe resultante é 23E3.

A mutação *ilvG2096*(Val^r) foi introduzida através de homogenotização. Esta mutação repara uma mudança de enquadramento que faz com que a K-12 de tipo selvagem seja sensível a valina. A estirpe 23E3 foi transformada com o plasmídeo pAH29, contendo o marcador *ilvG2096*(Val^r) e um gene de resistência à ampicilina. A estirpe 33B6, que tinha perdido espontaneamente o plasmídeo e que tinha adquirido o locus *ilvG2096*(Val^r), foi identificada através de pesquisa de clones sensíveis à ampicilina quanto a resistência à valina. As características importantes da estirpe final, 33B6, são que seja resistente ao fago 11, não sobreproduza fosfatase alcalina quando se esgota o fosfato (que é a condição utilizada para induzir síntese de produto), não tenha uma protease e não seja susceptível a toxicidade de valina.

(b) Fermentação

Uma suspensão espessa de células 33B6 contendo o vector pMY223 (daqui em diante "células 33B6/pMY223") para expressão da variante B2036 foi produzida tal como se segue.

Foi preparada uma alimentação de aminoácidos para uma fermentação de 1000 l misturando assepticamente os seguintes componentes:

3,2 kg de Extracto de levedura;
24 kg de HY-CASE AMINO (Quest, Int., Hoffman Estates, IL);
50 g de Metionina;
Água desionizada até 135 l.

Os seguintes componentes foram transferidos para um fermentador de 1000 l capaz de distribuir 3-5 mM de O₂/l/min:

1,0 l de agente anti-espuma FERMAX ADJUVANT 27 (OSI Specialties Group, Witco Corp., South Charleston, WV);
1820,0 g de Fosfato de sódio dibásico;
910,0 g de Fosfato de sódio monobásico di-hidratado;
3500,0 g de Sulfato de amónio;
700,0 g de Citrato de sódio di-hidratado;
1050,0 g de Cloreto de potássio;
700,0 l de Água desionizada.

O fermentador foi esterilizado a 121°C durante 30 minutos. Após arrefecimento, foi transferido assepticamente para o fermentador esterilizado o seguinte:

50 kg da alimentação de aminoácidos tal como descrita acima;
7,7 l de Sulfato de magnésio 1 M;
350 ml de Cloreto férrico a 2,7%;
350 ml de Solução de elementos vestigiais;
2 l de Álcool de tetraciclina a 5 mg/ml;
1 l de Glucose a 50%.

O fermentador funcionou a 37°C e o pH foi mantido a aproximadamente pH 7,3 (*i.e.*, entre 7,0 e 7,5) com arejamento e agitação suficientes para proporcionar entre 3 e 5 mM de O₂/l/min.

Células 33B6/pMY223 foram transferidas assepticamente para o fermentador como um inóculo de 8 l com uma densidade óptica (DO) a 600 nm de 15. O fermentador foi posto a funcionar, alimentando com suficiente glucose para verificar as exigências da cultura (mas evitando acumulação de glucose

no fermentador) e mantendo o oxigénio dissolvido a 30% ou mais de saturação do ar. O pH foi controlado utilizando hidróxido de amónio 15 N ou ácido sulfúrico a 24%, e foi utilizado FERMAX ADJUVANT 27 para controlar a formação de espuma. Quando a cultura atingiu uma DO a 600 nm de 20, foi iniciada a alimentação de aminoácidos a cerca de 0,06 kg/minuto.

A aproximadamente 32 horas após a inoculação, a cultura foi inactivada através de morte térmica a 60°C durante 30 segundos. Uma suspensão espessa celular foi então colhida através de centrifugação e congelada em grânulos.

(c) Extracção Celular e Clarificação

Os grânulos congelados da fermentação colhidos (daqui em diante o "sedimento celular") foram armazenados a -60°C ou abaixo antes da utilização. Foram adicionados 5 l de tampão de extracto (ureia 6 M, Tris 0,02 M, pH 7,65, à temperatura ambiente) por kg de sedimento celular a um tanque de extracção de parede dupla. O sedimento celular foi lentamente adicionado ao tampão de extracto, com agitação. A formação de espuma foi minimizada. A suspensão foi misturada a 4°C até todo o sedimento estar em solução. O pH foi ajustado a 8,0 e a solução foi misturada a 4°C durante duas horas para formar um extracto. Foram adicionados 3 l de água por litro de extracto e 10 ml de polietilenoimina (PEI) a 5%, pH 8,0, por litro de extracto, com agitação.

O extracto foi clarificado por passagem através de uma centrífuga de fluxo contínuo Alfa Laval AX213. O extracto foi continuamente agitado para manter a suspensão e alimentado a um caudal de aproximadamente 20 litros por minuto (LPM) para a centrífuga. O sobrenadante foi recolhido num tanque de recepção de parede dupla, regulado para manter a temperatura a 4°C. Depois de todo o extracto ter sido alimentado através da centrífuga, foram alimentados aproximadamente 75 l de água purificada (4°C) através da centrífuga para recuperar da centrífuga o extracto de *E. coli* clarificado.

(d) Cromatografia de Permuta Aniónica I

O extracto de *E. coli* clarificado foi purificado numa coluna DEAE TRISACRYL LS PLUS (volume = 0,36 l/kg de pasta celular), corrida a 4°C. Antes de ser carregada, a coluna foi lavada e equilibrada com tampão de equilíbrio (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, 4°C). A coluna foi então carregada com o extracto de *E. coli* clarificado e lavada com pelo menos três volumes de coluna de tampão de equilíbrio até a absorvância de UV do eluente estar no limiar ou próximo. A coluna foi eluída com tampão de eluição (ureia 3 M, mais MES, MOPS, Tris-HCl, TEA-HCl, glicina e glicilglicina, cada um a 18 mM, pH 5,0). O carregamento, a lavagem e a eluição da coluna foram efectuados a um caudal nominal para todos os passos de cromatografia neste exemplo. As fracções do eluente que absorviam UV foram recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE. As fracções contendo a variante B2036 foram reunidas.

(e) Cromatografia de Permuta Aniónica II

O banco de DEAE TRISACRYL LS PLUS foi ajustado no pH e purificado numa coluna de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW (Volume = 1,47 l/kg de pasta celular). O pH do banco de DEAE TRISACRYL LS PLUS foi ajustado a cerca de 7,2 com hidróxido de sódio a 2% a 4°C. A coluna foi lavada e equilibrada com tampão de equilíbrio (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, 4°C). A coluna foi então carregada com o banco de pH ajustado e lavada com pelo menos três volumes de coluna de tampão de equilíbrio até a absorvância de UV do eluente estar no limiar ou próximo. A coluna foi eluída com tampão de eluição (ureia 3 M, mais MES, MOPS, Tris-HCl, TEA-HCl, glicina e glicilglicina, cada um a 18 mM, pH 5,0) e as fracções do eluente que absorviam UV foram recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE. As fracções contendo a variante B2036 foram reunidas.

(f) Cromatografia em Q SEPHAROSE FAST FLOW

O banco de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW foi ajustado no pH e ainda purificado numa coluna Q SEPHAROSE FAST FLOW (volume = 0,43 l/kg de pasta celular), corrida a 4°C. O pH do banco de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW foi ajustado a 7,2 com hidróxido de sódio a 2% a 4°C. A coluna foi equilibrada com tampão de

equilíbrio (Tris 0,05 M, pH 8,0) e carregada com o banco de pH ajustado. A coluna foi lavada com um volume de coluna de tampão de equilíbrio e eluída com um gradiente linear a começar em NaCl 0,05 M, Tris 0,05 M, pH 8,0 e a terminar com NaCl 0,20 M, Tris 0,05 M, pH 8,0, utilizando três volumes de coluna de cada tampão. As fracções foram recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE e as fracções contendo a variante B2036 foram reunidas.

(g) Cromatografia em PHENYL TOYOPEARL 650M

Após condicionamento, o banco de Q SEPHAROSE FAST FLOW foi ainda purificado numa coluna PHENYL TOYOPEARL 650M (volume = 0,50 l/kg de pasta celular), corrida à temperatura ambiente. O banco de Q SEPHAROSE FAST FLOW foi condicionado com tampão de condicionamento (sulfato de sódio 1,2 M, Tris 0,05 M, pH 7,2) através da adição de um volume de tampão de condicionamento equivalente a 1,5 vezes o volume do banco de Q-SEPHAROSE e agitando a solução resultante durante cerca de 15 minutos. A solução foi então trazida para temperatura ambiente. A coluna foi equilibrada com três volumes de coluna de tampão de equilíbrio (sulfato de sódio 0,75 M, Tris 0,05 M, pH 7,2) através de um filtro de entrada de 0,22 μ . Todo o banco condicionado foi então carregado na coluna através de um filtro de entrada Pall Profile de 0,3 μ . A coluna foi eluída com um gradiente linear a começar com sulfato de sódio 0,75 M, Tris 50 mM, pH 7,2 e a terminar com Tris 50 mM, pH 7,5. Foram utilizados três volumes de coluna de cada tampão. As fracções foram recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE e as fracções contendo a variante B2036 foram reunidas.

(h) Cromatografia em SEPHADEX G-25

Foi utilizada uma coluna SEPHADEX G-25 para reduzir o sal no banco de PHENYL TOYOPEARL através de troca da variante B2036 para tampão Tris 0,05 M. A coluna foi corrida a 4°C. O volume da carga foi restringido a um máximo de 30% do volume total do leito da coluna. A coluna foi equilibrada com três volumes de coluna de tampão de equilíbrio (Tris 0,05 M, pH 7,2) e depois carregada com o banco de PHENYL TOYOPEARL. A coluna foi eluída com Tris 0,05 M, pH 7,2. Quando a DO a

280 nm começou a aumentar, o banco foi recolhido até a DO_{280} cair quase para o limiar.

(i) Cromatografia em DEAE SEPHAROSE FAST FLOW

O banco de SEPHADEX G-25 foi ainda purificado numa coluna DEAE SEPHAROSE FAST FLOW (Volume = 0,04 l/g de proteína), corrida a 4°C. A coluna foi equilibrada com um mínimo de três volumes de coluna de tampão de equilíbrio (Tris 0,05 M, pH 8,0). A coluna foi então carregada com o banco de SEPHADEX G-25. O limite de carga para a coluna foi de 25 g de proteína por litro de resina. A coluna foi eluída com aproximadamente dez volumes de coluna de tampão de eluição (ureia 2 M mais MES, MOPS, Tris-HCl, TEA-HCl, glicina e glicilglicina, cada um a 17 mM, pH 5,0). Quando a DO a 280 nm do eluente atingiu um valor de 0,1, as fracções foram recolhidas até a DO_{280} cair abaixo de um valor de 0,5. As fracções foram analisadas através de SDS-PAGE e as fracções contendo a variante B2036 foram reunidas.

(j) Concentração através de Cromatografia em Q SEPHAROSE FAST FLOW

O banco de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW foi concentrado numa coluna Q SEPHAROSE FAST FLOW (volume = 0,07 l/g de proteína), corrida a 4°C. A coluna foi equilibrada com pelo menos quatro volumes de coluna de HEPES 0,1 M, pH 7,7. Todo o banco de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW foi carregado na coluna e a coluna foi lavada com pelo menos quatro volumes de tampão. A coluna foi eluída com aproximadamente dois volumes de coluna de tampão de eluição (HEPES 0,1 M, NaCl 0,22 M, pH 7,7). Quando a DO a 280 nm do eluente excedeu 2,0, o banco foi recolhido até a DO_{280} cair abaixo de 2,0.

Resultados

A variante B2036 estava essencialmente isenta de impurezas da célula hospedeira e de quaisquer formas degradadas conhecidas significativas da variante tal como determinado através de SDS-PAGE utilizando coloração com azul de Coomassie.

EXEMPLO VI COMPARATIVO
Produção da Variante B2024

A variante B2024 foi produzida de acordo com o seguinte protocolo exemplar.

Métodos

(a) Vector de Expressão e Células Hospedeiras

A variante B2024 foi expressa em *E. coli* 33B6 utilizando o plasmídeo pMY216, que é o mesmo que pMY223 (descrito no Exemplo V), excepto que pMY216 contém a sequência de codificação de B2024 em vez da sequência de codificação de B2036.

(b) Fermentação

Uma suspensão espessa de células 33B6 contendo o vector pMY223 (daqui em diante "células 33B6/pMY216") para expressão da variante B2024 foi produzida tal como se segue.

Os seguintes componentes foram transferidos para um fermentador de 60 l capaz de distribuir 3-6 mM de O₂/l/min:

60,0 ml de agente anti-espuma FERMAX ADJUVANT 27 (OSI Specialties Group, Witco Corp., South Charleston, WV);
156,0 g de Fosfato de sódio dibásico;
78,0 g de Fosfato de sódio monobásico di-hidratado;
300,0 g de Sulfato de amónio;
60,0 g de Citrato de sódio di-hidratado;
90,0 g de Cloreto de potássio;
36,0 l de Água desionizada.

O fermentador foi esterilizado a 121°C durante 30 minutos. Após arrefecimento, foi transferido assepticamente para o fermentador esterilizado o seguinte:

600,0 ml de Sulfato de magnésio 1 M;
60,0 ml de Cloreto férrico a 2,7%;
60,0 ml de Solução de elementos vestigiais;
120,0 ml de Álcool de tetraciclina a 5 mg/ml;

90 ml de Glucose a 50%;
6,0 l de NZ Amina A a 10% (Quest, Int., Hoffman Estates, IL);
Água desionizada até 48 l.

O fermentador funcionou a 37°C e o pH foi mantido a aproximadamente pH 7,0 (*i.e.*, entre 6,8 e 7,2) com arejamento e agitação suficientes para proporcionar entre 3 e 6 mM de O₂/l/min.

As células 33B6/pMY216 foram assepticamente transferidas para o fermentador como um inóculo de 1 l com uma densidade óptica (DO) a 600 nm de 4. O fermentador foi posto a funcionar, mantendo o oxigénio dissolvido a 0% de saturação do ar durante tanto tempo quanto possível e alimentando glucose suficiente para verificar as necessidades da cultura, mas evitando acumulação de glucose no fermentador. A glucose foi alimentada para que qualquer acetato formado fosse reconsumido num curto período de tempo (normalmente menos de meia hora, mas não mais de duas horas). O pH foi controlado utilizando hidróxido de amónio 12 N contendo 47 g/l de L-leucina ou ácido sulfúrico a 24%, e foi utilizado FERMAX ADJUVANT 27 para controlar a formação de espuma.

Aproximadamente 40 horas após a inoculação, a cultura foi inactivada através de morte térmica a 60°C durante 30 segundos. Uma pasta celular foi então colhida por centrifugação e congelada.

(c) Extracção Celular e Clarificação

A pasta celular congelada da colheita de fermentação foi armazenada a -60°C ou abaixo antes da utilização. A pasta celular foi descongelada de um dia para o outro a 4°C. Foram adicionados à pasta celular 5 l de tampão de extracto (ureia 6 M, Tris 0,02 M, pH 8,5, a 4°C) por kg de pasta celular. As células foram homogeneizadas no tampão utilizando um homogeneizador ULTRATURREX (Tekmar, Cincinnati, OH) com agitação, minimizando a formação de espuma. A temperatura foi mantida a 4°C e a suspensão foi misturada até todas as células estarem em suspensão. O pH foi ajustado a aproximadamente 8,1. A solução foi misturada a 4°C durante duas horas para formar um extracto. Foram adicionados 1 l de água por litro de

extracto e 20 ml de PEI a 5%, pH 8,0, por litro de extracto, com agitação.

O extracto foi clarificado por passagem através de uma centrífuga de fluxo contínuo Alfa Laval BTPX205. O extracto foi continuamente agitado para manter a suspensão e foi alimentado a um caudal de aproximadamente 2 LPM para a centrífuga. O sobrenadante foi recolhido num tanque de recepção a 4°C. Depois de todo o extracto ter sido alimentado através da centrífuga, foram alimentados aproximadamente 5-10 l de água purificada (4°C) através da centrífuga para deslocar o extracto de *E. coli* clarificado da centrífuga. O extracto clarificado foi diluído com água purificada (4°C) até a condutividade medir menos de 2,0 mS.

(d) Cromatografia de Permuta Aniónica

O extracto de *E. coli* clarificado foi purificado numa coluna DEAE TRISACRYL LS PLUS (volume = 0,50 l/kg de pasta celular) em série com uma coluna DEAE SEPHAROSE FAST FLOW (coluna = 2,6 l/kg de pasta celular), ambas corridas a 4°C. Antes de serem carregadas, as colunas foram lavadas e equilibradas com tampão de equilíbrio (Tris-HCl 0,02 M, pH 8,5, 4°C). A coluna DEAE TRISACRYL LS PLUS foi então carregada com o extracto de *E. coli* clarificado. As colunas foram lavadas com pelo menos três volumes de coluna de tampão de equilíbrio até a absorvância de UV do eluente estar no limiar ou próximo. A coluna DEAE TRISACRYL LS PLUS foi então desligada da coluna DEAE SEPHAROSE FAST FLOW. A variante B2024 foi eluída da coluna DEAE SEPHAROSE FAST FLOW com um tampão de eluição de gradiente de pH (ureia 3 M, mais MES, MOPS, Tris-HCl, TEA-HCl, glicina e glicilglicina, cada um a 10 mM, pH 5,0). O carregamento, a lavagem e a eluição da coluna foram efectuados a um caudal nominal para todos os passos de cromatografia neste exemplo. As fracções contendo a variante B2024 foram reunidas, com base na absorvância óptica da eluição e análise de SDS-PAGE das fracções.

(e) Cromatografia em Q SEPHAROSE FAST FLOW

O banco de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW foi ajustado no pH e ainda purificado numa coluna Q SEPHAROSE FAST FLOW (volume =

0,67 l/kg de pasta celular), corrida a 4°C. O pH do banco de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW foi ajustado a 8,5 com hidróxido de sódio a 2% a 4°C. A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio (Tris 0,02 M, pH 8,5), carregada com o banco de pH ajustado e eluída com um gradiente linear a começar em Tris 0,02 M, pH 8,5 e a terminar com NaCl 0,10 M, MES 0,08 M, pH 6,5, utilizando 2,5 volumes de coluna de cada tampão. As fracções foram recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE e as fracções contendo a variante B2024 foram reunidas.

(f) Cromatografia em PHENYL TOYOPEARL 650M

Após condicionamento, o banco de Q SEPHAROSE FAST FLOW foi ainda purificado numa coluna PHENYL TOYOPEARL 650M (volume = 0,20 l/kg de pasta celular), corrida à temperatura ambiente. O banco de Q SEPHAROSE FAST FLOW foi condicionado com tampão de condicionamento (sulfato de amónio 2 M, Tris 0,04 M, pH 7,2) através da adição de um volume de tampão de condicionamento equivalente ao volume do banco de Q SEPHAROSE e agitando a solução resultante até estar uniforme. A solução foi então trazida até temperatura ambiente. A coluna foi equilibrada com dois a três volumes de coluna de tampão de equilíbrio (sulfato de amónio 1,0 M, Tris 0,02 M, pH 7,2). Todo o banco condicionado foi então carregado na coluna e a coluna foi eluída com um gradiente linear a começar com sulfato de amónio 1 M, Tris 20 mM, pH 7,2 e a terminar com água purificada. Foram utilizados quatro volumes de coluna de cada tampão. As fracções foram recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE e as fracções contendo a variante B2024 foram reunidas.

(g) Cromatografia em SEPHADEX G-25

Foi utilizada uma coluna SEPHADEX G-25 para reduzir o sal no banco de PHENYL TOYOPEARL através de troca da variante B2024 para tampão Tris 0,02 M. A coluna foi corrida a 4°C. O volume da carga foi restringido a um máximo de 30% do volume total do leito da coluna. A coluna foi equilibrada com três volumes de coluna de tampão de equilíbrio (Tris 0,02 M, pH 8,0) e depois carregada com o banco de PHENYL TOYOPEARL. A coluna foi eluída com Tris 0,02 M, pH 8,0. Quando a DO a

280 nm aumentou para aproximadamente 0,2, o banco foi recolhido até a DO_{280} cair abaixo de 0,2.

(h) Cromatografia em DEAE SEPHAROSE FAST FLOW

O banco de SEPHADEX G-25 foi ainda purificado numa coluna DEAE SEPHAROSE FAST FLOW (volume = 0,04 l/g de proteína), corrida a 4°C. A coluna foi equilibrada com um mínimo de três volumes de coluna de tampão de equilíbrio (Tris 0,02 M, pH 8,0). O banco de G-25 foi diluído com um volume igual de água para irrigação e a solução resultante foi misturada até estar uniforme e depois carregada na coluna. A coluna foi eluída com aproximadamente dez volumes de coluna de tampão de eluição (ureia 2 M mais MES, MOPS, Tris-HCl, TEA-HCl, glicina e glicilglicina, cada um a 10 mM, pH 5,0). Quando a DO_{280} do eluente atingiu um valor de 0,1, as fracções foram recolhidas até a DO_{280} cair abaixo de um valor de 0,5. As fracções foram analisadas através de SDS-PAGE e as fracções contendo a variante B2024 foram reunidas.

(i) Concentração através de Cromatografia em DEAE SEPHAROSE FAST FLOW

O banco de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW foi concentrado numa coluna DEAE SEPHAROSE FAST FLOW (volume = 0,06 l/g de proteína), corrida a 4°C. A coluna foi equilibrada com pelo menos quatro volumes de coluna de Tris 0,02 M, pH 8,0. Todo o banco de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW foi carregado na coluna e a coluna foi lavada com pelo menos dois volumes de coluna de tampão MES 0,02 M, pH 6,5. A coluna foi eluída com aproximadamente dois volumes de coluna de NaCl 0,1 M, MES 0,02 M, pH 6,5, seguido de dois volumes de coluna de NaCl 0,15 M, MES 0,02 M, pH 6,5. Quando a DO_{280} do eluente excedeu 2,0, o banco foi recolhido até a DO_{280} cair abaixo dos 2,0.

Resultados

A variante B2024 estava essencialmente isenta de impurezas da célula hospedeira e de quaisquer formas degradadas conhecidas significativas da variante tal como

determinado através de SDS-PAGE utilizando coloração de azul de Coomassie.

EXEMPLO VII

“PEGuilação” da Variante B2036 com PEG(5000)

Foi utilizado M-SPA-PEG(5000) para “PEGuilar” a variante de hGH B2036. A “PEGuilação” da variante B2036 foi realizada de acordo com o seguinte protocolo, que é também adequado para “PEGuilação” de hGH de tipo selvagem e de outras variantes de hGH, tais como a variante B2024.

Métodos

(a) Reacção de “PEGuilação”

A variante B2036 purificada, produzida tal como exposto no Exemplo IV, foi feita reagir com M-SPA-PEG(5000) (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL), que foi adicionado como um sólido à preparação da variante B2036. Deixou-se prosseguir a reacção à temperatura ambiente com agitação constante. Resumidamente, a preparação da variante B2036 foi diluída com HEPES 0,1 M, pH 7,7, até uma concentração proteica final de 10 mg de variante B2036/ml e deixou-se voltar à temperatura ambiente. O pH da solução à temperatura ambiente era de cerca de 7,5. M-SPA-PEG(5000) sólido foi adicionado à preparação, com agitação, até uma concentração de 20 g/l. O pH foi mantido a $7,5 \pm 0,1$. A reacção estava completa ao fim de duas horas após a adição de M-SPA-PEG(5000).

(b) Cromatografia de Interação Hidrófoba (PHENYL TOYOPEARL 650M)

A preparação da variante B2036 “PEGuilada” foi condicionada e depois purificada numa coluna PHENYL TOYOPEARL 650M (volume = 0,13 l/g de variante B2036), corrida à temperatura ambiente. A preparação da variante B2036 “PEGuilada” foi condicionada através da adição de um volume de solução condicionante de citrato (citrato de sódio 0,8 M, Tris 0,05 M, pH 7,7) equivalente ao volume da preparação da variante B2036 “PEGuilada” e agitando a solução resultante

durante cerca de 15 minutos à temperatura ambiente. A coluna foi equilibrada à temperatura ambiente com pelo menos um volume de coluna de tampão de equilíbrio (citrato de sódio 0,40 M, Tris 0,05 M, pH 7,5). A preparação da variante B2036 "PEGuilada" condicionada foi então carregada na coluna. A coluna foi eluída com um gradiente linear de quatro volumes de coluna a começar com citrato de sódio 0,40 M, Tris 50 mM, pH 7,5 e a terminar com Tris 50 mM, pH 7,5. O carregamento, a lavagem e a eluição da coluna foram realizados a um caudal nominal para todos os passos de cromatografia neste exemplo. As fracções foram recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE e a fracções contendo o conjugado variante PEG-B2036 foram reunidas.

(c) Ultrafiltração/Diafiltração

O banco de PHENYL TOYOPEARL foi concentrado aproximadamente três vezes e depois diafiltrado contra seis volumes de acetato de sódio 0,025 M, pH 4,0, utilizando um sistema de ultrafiltração equipado com uma membrana de celulose regenerada de 10 kDa (Millipore, Bedford, MA).

O primeiro passo da concentração foi uma reciclagem total com o modo aberto do filtrado utilizando o banco de PHENYL TOYOPEARL. A reciclagem foi feita durante cerca de 15 minutos, com o objectivo de reduzir a concentração de variante PEG-B2036 no filtrado para menos de 3% da concentração de alimentação. A concentração real do banco de PHENYL TOYOPEARL foi iniciada com o modo UF (*i.e.*, com o concentrado dirigido para um tanque de reciclagem e o filtrado dirigido para drenagem). Uma transição da reciclagem inicial para o modo UF foi feita automaticamente sem desligar a bomba de alimentação e sem qualquer alteração na taxa de alimentação ou na pressão do concentrado. A concentração foi continuada até ser alcançada uma redução de três vezes no volume do concentrado. O banco de PHENYL TOYOPEARL concentrado foi diafiltrado contra seis volumes de acetato de sódio 0,025 M, pH 4,0, no modo DF (*i.e.*, com o concentrado dirigido para o tanque de reciclagem, o filtrado dirigido para a drenagem e o tampão transferido para o tanque de reciclagem). Uma transição do modo UF para o modo DF é feita automaticamente sem desligar a bomba de alimentação.

Após o banco de PHENYL TOYOPEARL ser diafiltrado e concentrado, foi feita uma reciclagem de queda de baixa pressão (ΔP) numa reciclagem total com o filtrado em modo fechado. A válvula do concentrado foi completamente aberta durante este passo. A taxa de alimentação foi mantida para dar uma queda de pressão de 5 PSI. A recirculação foi feita durante pelo menos 10 minutos. O modo de transferência do produto foi então utilizado para transferir os conteúdos do sistema de ultrafiltração para um tanque de reunião. A transferência foi feita em dois passos. O primeiro passo envolveu a drenagem do concentrado no tanque de reciclagem através de uma válvula, com a unidade de membrana isolada. No segundo passo, o sistema de ultrafiltração foi completamente esvaziado, utilizando uma corrente de baixa pressão de gás inerte para empurrar o produto para fora do sistema e para o tanque de reunião.

(d) Cromatografia de Permuta Catiónica (S SEPHAROSE FAST FLOW)

A variante B2036 "PEGuilada" foi ainda purificada através de cromatografia de permuta catiónica numa coluna S SEPHAROSE FAST FLOW, carregando não mais de 7 g de proteína/l de resina. A coluna foi equilibrada à temperatura ambiente com pelo menos três volumes de coluna de acetato de sódio 0,025 M, pH 4,0. Todo o banco de variante PEG-B2036 UF/DF foi então carregado na coluna e a coluna foi eluída com um gradiente linear de sete volumes de coluna a começar com acetato de sódio 0,25 M, pH 4,0 e a terminar com NaCl 0,25 M, acetato de sódio 0,025 M, pH 4,0. Após a DO a 280 nm começar a diminuir, as fracções foram recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE e espectrometria de massa. As fracções contendo conjugados PEG-hGH contendo quatro a cinco grupos de PEG foram reunidas.

(e) Ultrafiltração/Diafiltração

O banco de S SEPHAROSE FAST FLOW foi concentrado até aproximadamente 10 g/l utilizando um sistema de ultrafiltração equipado com uma membrana de celulose regenerada de 10 kDa (Millipore, Bedford, MA). Os passos de concentração, reciclagem de queda de baixa pressão e transferência do produto foram efectuados tal como descrito na secção

“Ultrafiltração/Diafiltração” acima para alcançar uma redução de sete vezes no volume de concentrado.

(f) Cromatografia em SEPHADEX G-25

Foi utilizada uma coluna SEPHADEX G-25, corrida a 4°C, para trocar a preparação de variante PEG-B2036 para tampão de formulação (18,0 g/l de manitol, 0,68 g/l de glicina, fosfato de sódio 5 mM, pH 7,4). O volume da carga foi restringido a 25% do volume total do leito da coluna. A coluna foi lavada com um volume de coluna de água purificada para irrigação, seguido de equilíbrio com pelo menos 1,5 volumes de coluna de tampão de formulação. Todo o banco de variante PEG-B2036 UF foi então carregado na coluna e a coluna foi eluída com tampão de formulação. Quando a DO a 280 nm excedeu 0,5, as fracções foram recolhidas até a DO₂₈₀ cair abaixo de aproximadamente 0,5. O banco de SEPHADEX G-25 foi então diluído com tampão de formulação até uma concentração de 5,0 mg/ml.

Resultados

As estequiometrias de PEG por variante de hGH foram avaliadas através de espectrometria de massa num espectrómetro de massa de ionização/dessorção por laser VESTEC (PerSeptive Biosystems, Inc., Framingham, MA). Os resultados indicaram que a preparação continha primariamente conjugados contendo quatro e cinco grupos de PEG (PEG-4/5-B2036).

EXEMPLO VIII

“PEGuilação” da Variante B2036 com PEG(20000)

A variante B2036 foi “PEGuilada” com PEG(20000) de acordo com o seguinte protocolo exemplar.

A variante B2036, purificada tal como descrito no Exemplo V, foi trocada de tampão para fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, utilizando uma coluna G-25 SEPHADEX PD-10 (Pharmacia, Piscataway, NJ). A solução da variante B2036 foi então diluída até uma concentração proteica de 10 mg/ml. Foram pesados 60 mg de M-SPA-PEG(20000) (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL) num tubo e foram adicionados 6 ml da solução da variante B2036. A reacção foi incubada à temperatura ambiente durante

75 minutos. A mistura reaccional foi traçada de tampão para acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, utilizando uma coluna G-25 SEPHADEX PD-10.

A solução de variante PEG(20000)-B2036 resultante foi aplicada numa coluna SP SEPHAROSE HP (Pharmacia) que foi tinda sido lavada com acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, até a coluna estar equilibrada. A coluna foi carregada com a solução de variante PEG(20000)-B2036 a uma concentração de resina de 4,1 mg/ml à temperatura ambiente. A coluna foi então eluída com um gradiente linear consistindo em acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, até cloreto de sódio 0,5 M em acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, utilizando cinco volumes de coluna de cada tampão. As fracções foram recolhidas e analisadas através de electroforese em gel-SDS, utilizando géis de Daiichi pré-decantados de poliacrilamida a 2-15% (Owl Scientific, Cambridge, MA). As fracções contendo uma forma PEG(20000)-B2036 possuindo uma única molécula de PEG(20000) conjugada com cada molécula de B2036 foram reunidas e concentradas por ultrafiltração utilizando um concentrador CENTRIPREP 10 (Amicon, Inc., Beverley, MA). O concentrador CENTRIPREP 10 foi centrifugado a 8000 rpm numa centrífuga SORVALL RT6000B (Dupont Instruments, Newtown, CT) a 16°C. O concentrado foi removido e ainda mais concentrado utilizando um concentrador CENTRIPREP 10 (Amicon, Inc.). O concentrador foi centrifugado a 6500 rpm numa centrífuga SORVALL RC-5B a 16°C.

A variante PEG(20000)-B2036 concentrada foi então trocada de tampão para tampão de formulação (18,0 g/l de manitol, 0,68 g/l de glicina, fosfato de sódio 5 mM, pH 7,4) utilizando uma coluna G-25 SEPHADEX PD-10 à temperatura ambiente.

EXEMPLO IX

"PEGuilação" da Variante B2036 com Y-PEG

A variante B2036 foi "PEGuilada" com um PEG de cadeia ramificada possuindo duas cadeias de 10000 D (PEG2(20000)) de acordo com o seguinte protocolo exemplar.

A variante B2036, purificada tal como descrito no Exemplo V, foi trocada de tampão para fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, utilizando uma coluna G-25 SEPHADEX PD-10 (Pharmacia,

Piscataway, NJ). A solução de B2036 foi então diluída até uma concentração proteica de 10 mg/ml. Foram pesados 100 mg de NHS-PEG2(20000) (Shearwater Polymers, Inc.) num tubo e foram adicionados 4 ml da solução de B2036. A reacção foi incubada à temperatura ambiente durante 90 minutos. A mistura reaccional foi trocada de tampão para acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, utilizando uma coluna G-25 SEPHADEX PD-10.

A solução de variante PEG2(20000)-B2036 resultante foi aplicada numa coluna SP SEPHAROSE HP (Pharmacia) que tinha sido lavada com acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, até a coluna estar equilibrada. A coluna foi carregada com a solução de variante PEG2(20000)-B2036 a uma concentração de resina de 2,75 mg/ml à temperatura ambiente. A coluna foi então eluída com um gradiente linear consistindo em acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, até cloreto de sódio 0,5 M em acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, utilizando cinco volumes de coluna de cada tampão. As fracções foram recolhidas e analisadas através de electroforese em gel-SDS, utilizando géis de Daiichi pré-decantados de poliacrilamida a 2-15% (Owl Scientific, Cambridge, MA). As fracções contendo uma forma PEG2(20000)-B2036 possuindo uma única molécula de PEG2(20000) conjugada com cada molécula de B2036 foram reunidas e concentradas por ultrafiltração utilizando um concentrador CENTRICON 10 (Amicon, Inc., Beverley, MA). O concentrador foi centrifugado a 6500 rpm numa centrífuga SORVALL RC-5B a 16°C (Dupont Instruments, Newtown, CT).

A variante PEG2(20000)-B2036 concentrada foi trocada de tampão para tampão de formulação (18,0 g/l de manitol, 0,68 g/l de glicina, fosfato de sódio 5 mM, pH 7,4) utilizando uma coluna G-25 SEPHADEX PD-10 à temperatura ambiente.

EXEMPLO X

Locais de "PEGuilação" em PEG-4/5-B2036

Os locais de modificação com PEG de uma preparação de variante PEG-4/5-B2036 produzida tal como descrito nos Exemplos V e VII foram analisados através de mapeamento triptico. Amostras purificadas de variante PEG-4/5-B2036 (1 mg/ml em CaCl_2 1 M, acetato de sódio 0,1 M, Tris 10 mM, pH 8,8) foram incubadas com tripsina bovina (Worthington

Biochemical Corp., Freehold, NJ) a uma razão de peso proteico de 1:40 (tripsina:variante PEG-4/5-B2036) tal como descrito em Kohr, W.J. *et al.*, *Anal. Biochem.* 122: 348-359 (1982). A tripsina foi adicionada no momento 0 e novamente quatro horas após início da digestão. Após incubação durante oito horas a 37°C, a digestão foi parada através da adição de ácido fosfórico a pH 2 e as amostras foram armazenadas a 4°C.

As amostras digeridas (100 µg) foram carregadas numa coluna C-18 de 15 × 0,46 cm (contas de 5 µm, poro de 100 Å de tamanho; NUCLEOSIL, Alltech Associates, Deerfield, IL) em ácido trifluoroacético a 0,1% e eluídas com um gradiente de acetonitrilo de 0 a 60% ao longo de 120 minutos a um caudal de 0,4 ml/min a 40°C. A eluição de péptidos trípticos foi monitorizada através da absorvância a 214 nm.

A conjugação de um grupo de PEG a um péptido tríptico foi detectada através da redução do tamanho do pico correspondente num cromatograma em comparação com o cromatograma produzido a partir de uma digestão tríptica da proteína não "PEGuilada". Os resultados indicaram que a ordem de reactividade das aminas primárias (medida como percentagem de modificação dos péptidos primários), da mais reactiva para a menos reactiva é:

F1 > K145, K140, K38, K168 > K120, K70.

Determinou-se que K41 e K115 eram não reactivas, com base na incapacidade para detectar versões modificadas dos péptidos trípticos correspondentes. Os resíduos 168 e 172 na variante B2036 não foram capazes de reagir com PEG porque as lisinas nestas posições foram substituídas por aminoácidos diferentes. Nenhum dos resíduos mais reactivos está no Local 1. De facto, as três lisinas do Local 1 presentes na hGH de tipo selvagem (K41, K168 e K172) não são reactivas (K41) ou estão ausentes de B2036 (K168 e K172). Assim, a "PEGuilação" da variante B2036 não bloqueia directamente a ligação do Local 1.

EXEMPLO XI

Ensaio Baseado em Células da Actividade Agonista de B2036 "PEGuilada"

Uma preparação da variante PEG-4/5-B2036 produzida tal como descrito nos Exemplos V e VII foi testada quanto à

actividade no ensaio de dimerização baseado em células descrito em Fuh, G. et al., *Science* 256: 1677-1680 (1992) e Colosi, P. et al., *J. Biol. Chem.* 268: 12617-12629 (1993). Para produzir as células empregues neste ensaio, o receptor de hGH inteiro foi estavelmente transfectado para uma linha celular pré-mielóide, FDC-P1 (Colosi, P. et al., *J. Biol. Chem.* 268: 12617-12629 [1993]), que pode então ser induzida a proliferar na presença de hGH. As células foram mantidas em meio RPMI com soro fetal bovino a 10% e hGH 2-5 nM. As células foram privadas de alimento durante quatro horas em meio sem hGH e depois incubadas com concentrações crescentes de variante de hGH durante 10 horas a 37°C. Foi dado às células um pulso de [³H]-timidina durante quatro horas, estas foram lisadas e a síntese de ADN foi analisada através da quantidade de radioactividade ligada aos filtros de nitrocelulose. Fuh, G. et al., *Science* 256: 1677-1680 (1992). Nem B2036 nem PEG-4/5-B2036 estimularam a proliferação celular a nenhuma concentração entre 0,001 e 1,0 µg/ml de variante de hGH.

EXEMPLO XII

Ensaio Baseado em Células da Actividade Antagonista de B2036 "PEGuilada"

Num estudo desenhado para testar a actividade antagonista, as preparações de variante B2036 não "PEGuilada" e de PEG-4/5-B2036, produzidas tal como descrito nos Exemplos V e VII, foram incubadas com 11 ng/ml de hGH recombinante e concentrações crescentes de variante (10^4 células/0,2 ml de volume total do ensaio). A concentração de variante necessária para bloquear 50% da proliferação celular estimulada por hGH recombinante, i.e., a concentração inibitória semi-máxima (CI₅₀), foi calculada para ambas as variantes. A CI₅₀ para B2036 não "PEGuilada" foi de 0,19 µg/ml, enquanto que a CI₅₀ para PEG-4/5-B2036 foi de 13,01 µg/ml.

Numa experiência separada, o ensaio foi repetido (5×10^3 células/0,15 ml de volume total do ensaio) para comparar a actividade antagonista de uma preparação da variante PEG-4/5-B2036 com a da variante PEG(20000)-B2036 e a da variante PEG2(20000)-B2036. Estas variantes "PEGuiladas" foram produzidas tal como descrito nos Exemplos VII, VIII e

IX, respectivamente. A CI_{50} para cada variante "PEGuilada" está exposta na Tabela 11.

Tabela 11

<u>Variante</u>	<u>CI_{50} (μg/ml)</u>
PEG-4/5-B2036	15,25
PEG(20000)-B2036	0,25
PEG2(20000)-B2036	1,74

EXEMPLO XIII

Actividade Antagonista *in vivo* das Variantes de hGH

O efeito de injeções diárias de variantes de hGH antagonistas nos níveis de IGF-I foi estudado em macacos *Rhesus*. As variantes de hGH testadas foram uma variante contendo uma substituição G120K e as variantes B2036 e B2024. Adicionalmente, foram testadas formas "PEGuiladas" destas variantes, possuindo quatro a cinco moléculas de PEG(5000). Doses diárias de preparação de variante de hGH a 0,25 mg/kg, formuladas em 18,0 g/l de manitol, 0,68 g/l de glicina, fosfato de sódio 5 mM, pH 7,4, foram injectadas subcutaneamente em dois macacos *Rhesus* machos adolescentes por grupo de tratamento. Os níveis de IGF-I foram determinados através de imunoensaio, tal como descrito em *Amer. J. Primatology* 11: 53-62 (1986).

Os resultados são mostrados na Fig. 11. Foram observadas diminuições nos níveis de IGF-I sete dias após a administração para todos os macacos tratados com uma variante de hGH, com a diminuição mais significativa observada em macacos tratados com PEG-4/5-B2036. Aos 14 dias, os níveis de IGF-I voltaram aos níveis pré-tratamento em macacos tratados com a variante G120K e a variante B2024. Foram observados níveis reduzidos de IGF-I em macacos tratados com as formas "PEGuiladas" das variantes G120K e B2024 e com a variante B2036 não "PEGuilada". Os níveis de IGF-1 de 14 dias para macacos tratados com a preparação da variante PEG-4/5-B2036 foram os mesmos que no dia sete. Os níveis de IGF-I de 21 dias foram aproximadamente os mesmos que os níveis de IGF-I de sete dias para todos os grupos de tratamento.

EXEMPLO XIV

Actividade Antagonista *in vivo* da Preparação da Variante PEG-4/5-B2036: Farmacodinâmica de Dose Única

O efeito de uma única injeção de uma preparação da variante PEG-4/5-B2036 nos níveis de IGF-I foi estudado em macacos *Rhesus*. Um dose única da preparação da variante PEG-4/5-B2036 a 1 mg/kg, produzida tal como descrito nos Exemplos V e VII e formulada em 18,0 g/l de manitol, 0,68 g/l de glicina, fosfato de sódio 5 mM, pH 7,4, foi injectada intravenosamente ou subcutaneamente em macacos *Rhesus* machos adolescentes. O placebo foi 0,5 ml de tampão de formulação administrado subcutaneamente. Os níveis de IGF-I foram determinados tal como no Exemplo XIII.

Os resultados são mostrados na Fig. 12. Independentemente da via de administração, os níveis de IGF-I de todos os macacos tratados com a preparação da variante PEG-4/5-B2036 foram reduzidos um dia após a administração, continuaram a diminuir até quatro dias após a administração e permaneceram baixos ao longo do estudo de sete dias.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Brian C. Cunningham
Henry B. Lowman
James A. Wells
Ross G. Clark
Kenneth Olson
Germaine G. Fuh

(ii) TÍTULO DO INVENTO: Variantes da Hormona do Crescimento Humana

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 19

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) DESTINATÁRIO: Skjerven, Morrill, MacPherson,
Franklin & Friel
(B) RUA: 25 Metro Drive, Suite 700
(C) CIDADE: San Jose
(D) ESTADO: California
(E) PAÍS: USA
(F) CÓDIGO POSTAL: 95110

- (v) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:
- (A) TIPO DE MEIO: Disquete de 3,5 polegadas, 1,44 Mb
 - (B) COMPUTADOR: Compatível com IBM PC
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SUPORTE LÓGICO: WinPatin (Genentech)
- (vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
- (A) NÚMERO DO PEDIDO: M-2693-15P US
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 20-Set-1996
 - (C) CLASSIFICAÇÃO:
- (vii) DADOS DE PEDIDOS ANTERIORES:
- (A) NÚMERO DO PEDIDO: 08/537067
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-Set-1995
- (vii) DADOS DE PEDIDOS ANTERIORES:
- (A) NÚMERO DO PEDIDO: 08/537068
 - (B) DATA DE REGISTO: 21-Set-1995
- (viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:
- (A) NOME: Emily M. Haliday
 - (B) NÚMERO DE REGISTO: 38903
 - (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/PROCESSO: M-2693-15P US
- (ix) INFORMAÇÃO SOBRE TELECOMUNICAÇÕES:
- (A) TELEFONE: 408/453-9200
 - (B) TELECÓPIA: 408/453-7979
 - (C) TELEX:
- (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:
- GCCACCTGAT GTCTAAGAAA C 21**
- (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2:
- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 33 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:
- TTTGAAGAGG CCTATATGGC CAAGGAACAG AAG 33**

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 29 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

CAGAACCCCC ATTGACGTCC CTCGTGTTTC 29

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 45 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

TCCCGAAGGA GCAGNNSNNS TCGTTCNNSN NSAACCCGCA GACGT 45

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 44 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

CTGCGGGTTS NNSNNGAACG ASNNSNNCTG CTCCTTCGGG ATAT 44

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

AACCCCCAGA CGTCCCTCTG T 21

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 33 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

GAAACACAAC AGTAAAGGTA ACCTAGAGCT GCT 33

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

CGTCTTCAAG AGTTCAACTT CTCC 24

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 60 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 9:

CCCTCTGTNN STCANNSTCT NNSCCGACAC CCAGTAATNN SGAGGAAACA 50
CAACAGAAGA 60

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 69 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 10:

GTTACTCTTC TGTTGTGTTT CCTCSNNATT ACTGGGTGTC GGSNNAGASN 50
NTGASNNACA GAGGGACGT 69

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 34 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 11:

CTGCGTGCTC ACCGTCTTCA CCAGTTGGCC TTTG 34

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 12:

GTCAGCACAT TCCTGCGCAC C 21

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 36 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 13:

CTCTCGCGGC TCTTCGACAA CGCGATGCTG CGTGCT 36

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 33 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 14:

TACTGCTTCA GGAAGGACAT GGACAAGGTC AGC 33

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 15:

CTGCGCATCG TGCAGTGC 18

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 27 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 16:

CTCTCGAGGC TCTTCGACAA CGCGTGG 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 33 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 17:

CAGACCTCCC TCTGTCCCTC AGAGTCTATT CCG 33

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 18:

ACACCCTCCA ACAAGGAGGA AACACAACAG 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 19:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 45 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 19:

CCAAAGGAAC AGATTCATTC ATTCTGGTGG AACCCCCAGA CCTCC 45

Lisboa, 2010-04-07

REIVINDICAÇÕES

1. Variante da hormona do crescimento humana compreendendo o seguinte conjunto de substituições de aminoácidos: H18D, H21N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S e I179T.

2. Variante da hormona do crescimento humana de acordo com a reivindicação 1, em que a variante da hormona do crescimento humana é conjugada com um ou mais grupos químicos que aumentam o real peso molecular da variante da hormona do crescimento humana para entre 30 e cerca de 100 quilodaltons.

3. Variante da hormona do crescimento humana de acordo com a reivindicação 2, em que o referido grupo químico é polietilenoglicol.

4. Variante da hormona do crescimento humana de acordo com a reivindicação 3, em que o polietilenoglicol tem um peso molecular médio de entre 500 e cerca de 30000 daltons.

5. Variante da hormona do crescimento humana de acordo com a reivindicação 4, em que o polietilenoglicol tem um peso molecular médio de cerca de 5000 daltons.

6. Variante da hormona do crescimento humana de acordo com a reivindicação 4, em que o polietilenoglicol tem um peso molecular médio de cerca de 20000 daltons.

7. Variante da hormona do crescimento humana de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 5, em que a referida variante da hormona do crescimento humana está conjugada com entre cerca de quatro e cerca de seis moléculas de polietilenoglicol.

8. Utilização da variante da hormona do crescimento humana de acordo com a qualquer das reivindicações 1 a 7, que é uma variante agonista da hormona do crescimento humana, no fabrico de um medicamento para aumentar o anabolismo ou crescimento num paciente.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o referido paciente sofre de síndrome de Turner, deficiência em hormona do crescimento (GH), crescimento lento ou retardado, resposta de IGF-1 à GH quimicamente ou naturalmente reduzida, ou distúrbios imunitários incluindo envelhecimento, quimioterapia ou terapia de radiação, recuperação de uma doença grave, preparação para cirurgia, SIDA, deficiências de células B congénitas ou adquiridas.

10. Variante da hormona do crescimento humana de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 possuindo uma substituição adicional de aminoácidos em G120 que desfaz a ligação do local 2 a um receptor da hormona do crescimento.

11. Utilização da variante da hormona do crescimento humana de acordo com a reivindicação 10 no fabrico de um medicamento para inibição da acção da hormona do crescimento num paciente.

12. Utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o paciente tem acromegalia, gigantismo, diabetes e suas complicações incluindo retinopatia diabética e nefropatia diabética, doenças vasculares do olho envolvendo neovascularização proliferativa e malignidades que respondem a GH.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o paciente tem tumor de Wilm, sarcomas incluindo o sarcoma osteogénico, cancro da mama, cancro do cólon, cancro da próstata, cancro da tiróide, linfoma de Burkitt, carcinoma pulmonar, carcinoma colorrectal, leucemia linfoblástica e melanoma.

14. Sequência de ácido nucleico que codifica a variante da hormona do crescimento humana de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 10.

15. Vector compreendendo a sequência de ácido nucleico da reivindicação 14.

16. Célula hospedeira isolada compreendendo o vector da reivindicação 15.

18. Processo para preparação de uma variante da hormona do crescimento humana compreendendo a cultura da célula hospedeira da reivindicação 16 e a recuperação da variante da hormona do crescimento humana a partir da cultura.

19. Método para a produção de uma variante da hormona do crescimento humana "PEGuilada", compreendendo:

- (a) a "PEGuilação" da variante da hormona do crescimento humana de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 10;
- (b) a aplicação da variante da hormona do crescimento humana "PEGuilada" a uma coluna de cromatografia de permuta catiónica; e
- (c) a eluição da variante da hormona do crescimento humana "PEGuilada".

19. Composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de uma variante da hormona do crescimento humana de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7 e 10.

20. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 19, compreendendo também um transportador, excipiente ou estabilizante farmacêuticos.

21. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 20, em que o referido transportador farmacêutico pode ser seleccionado entre glicina, manitol e fosfato.

Lisboa, 2010-04-07

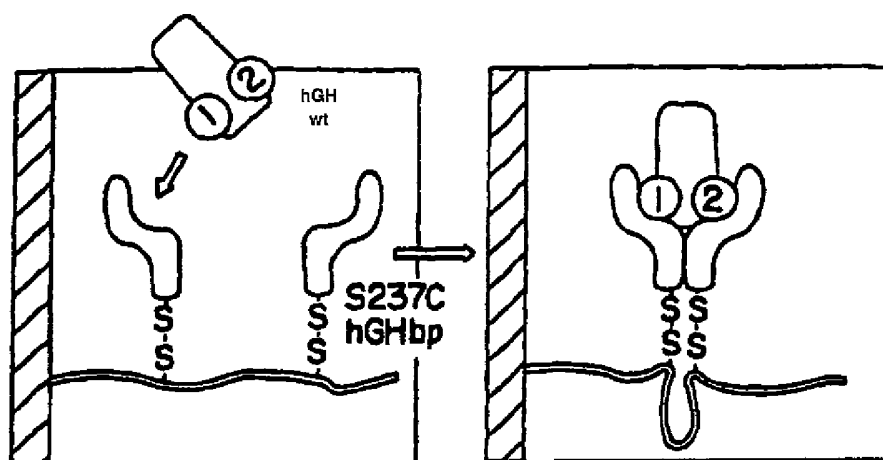


FIG. 1A

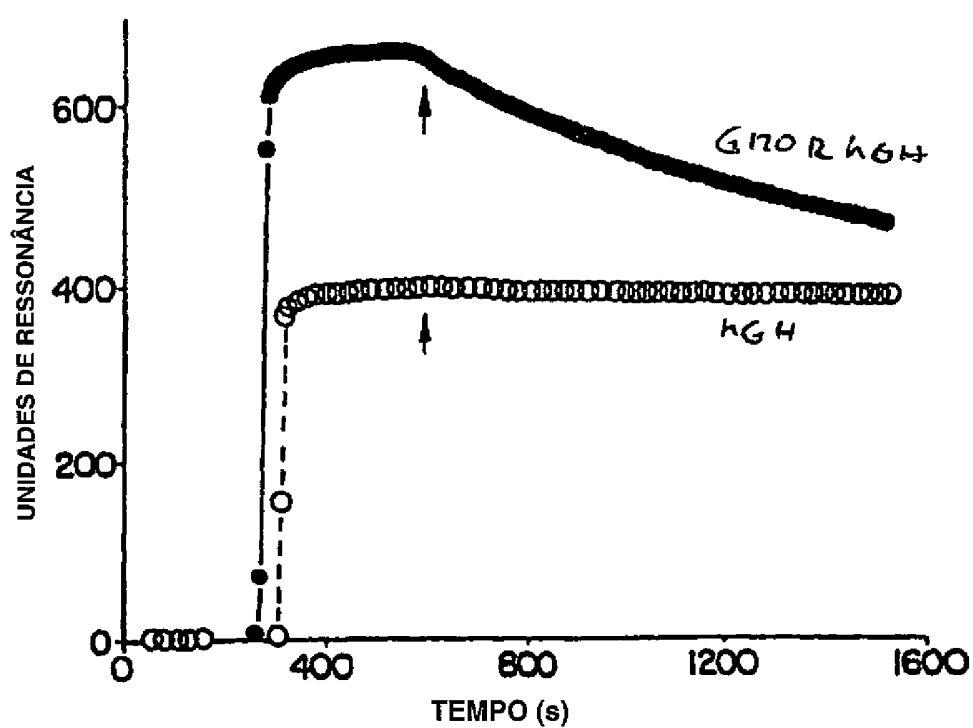


FIG. 1B

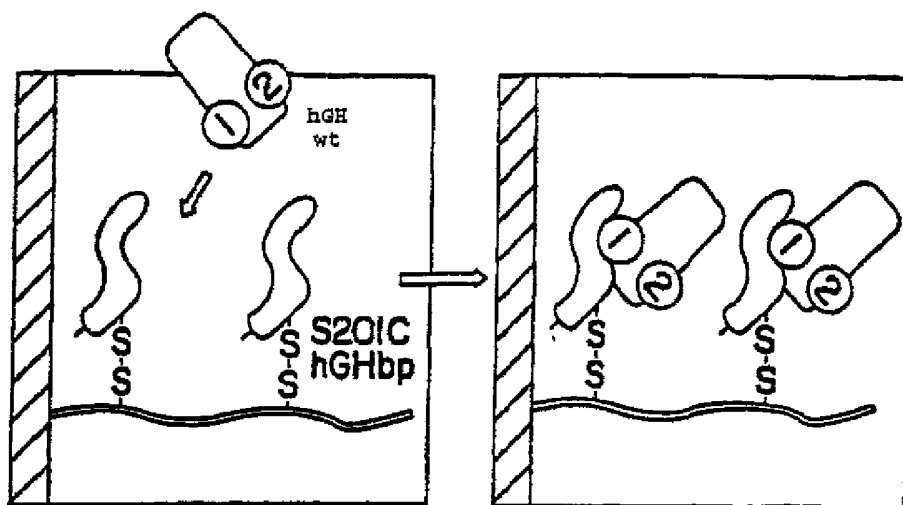


FIG. 2A

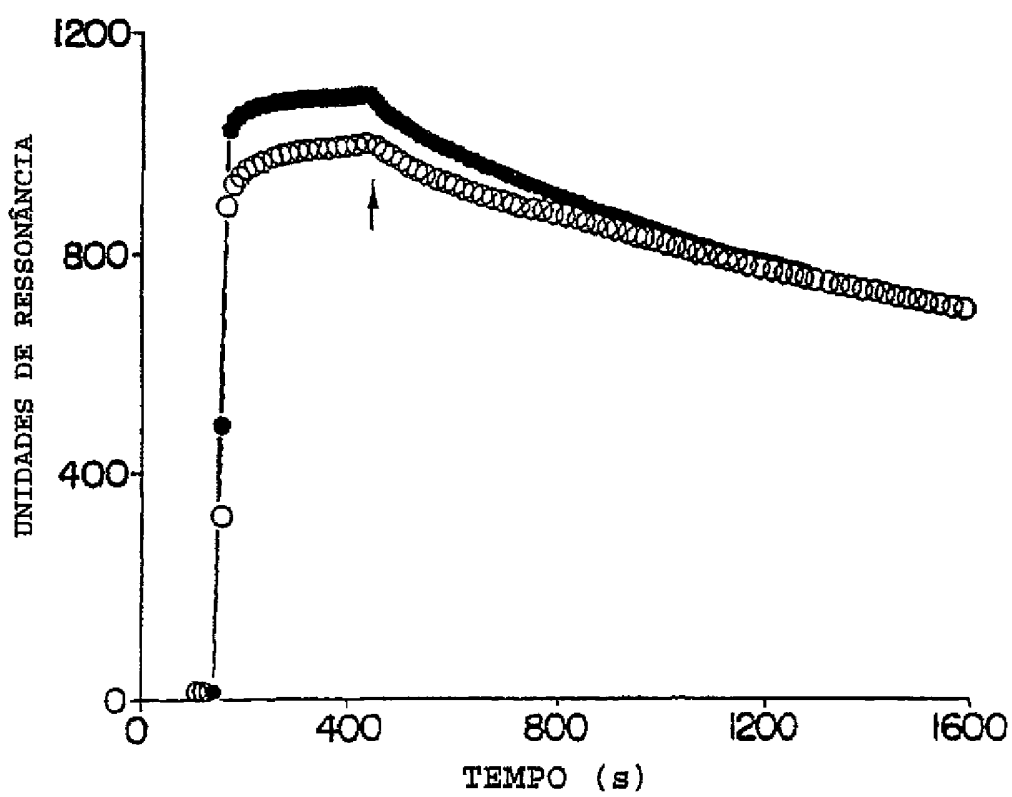


FIG. 2B

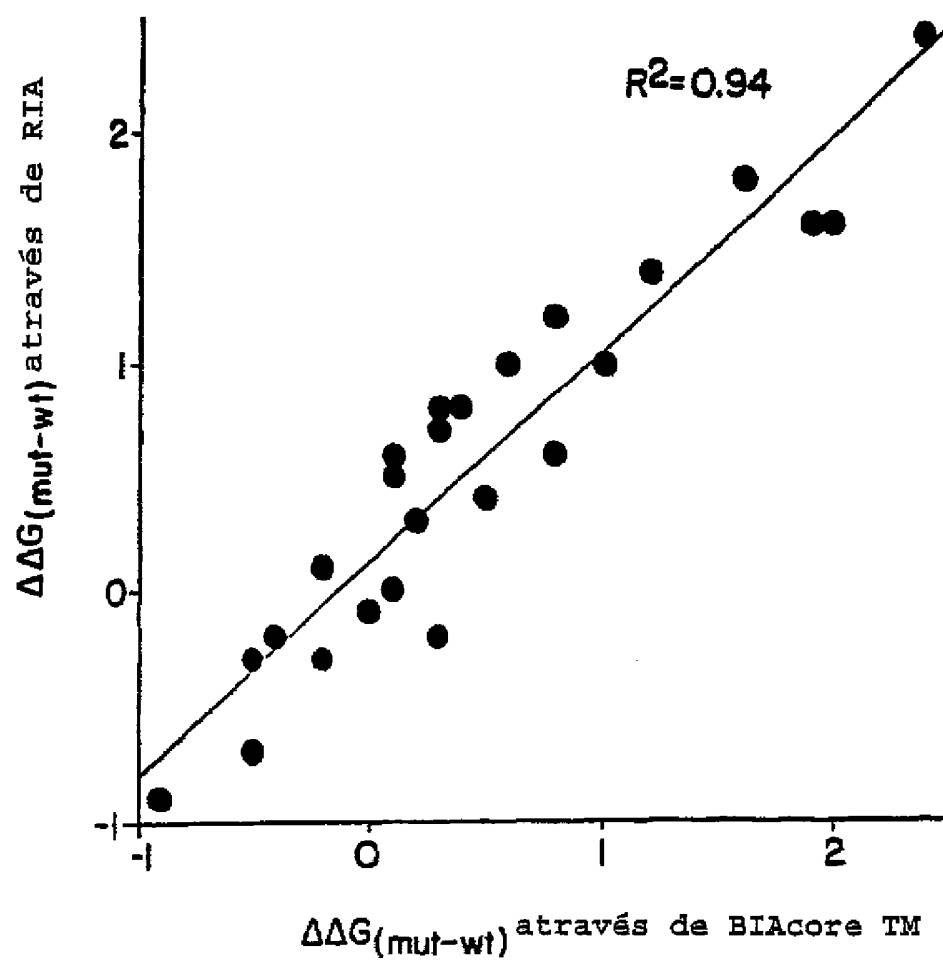
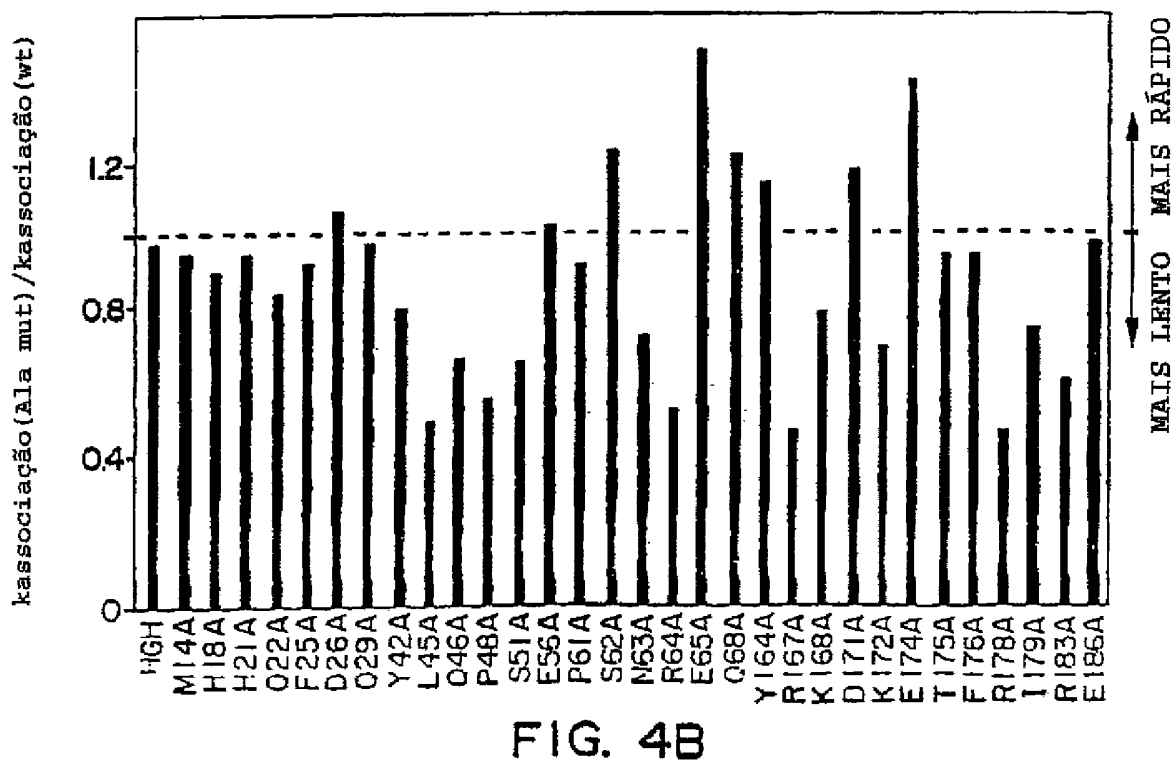
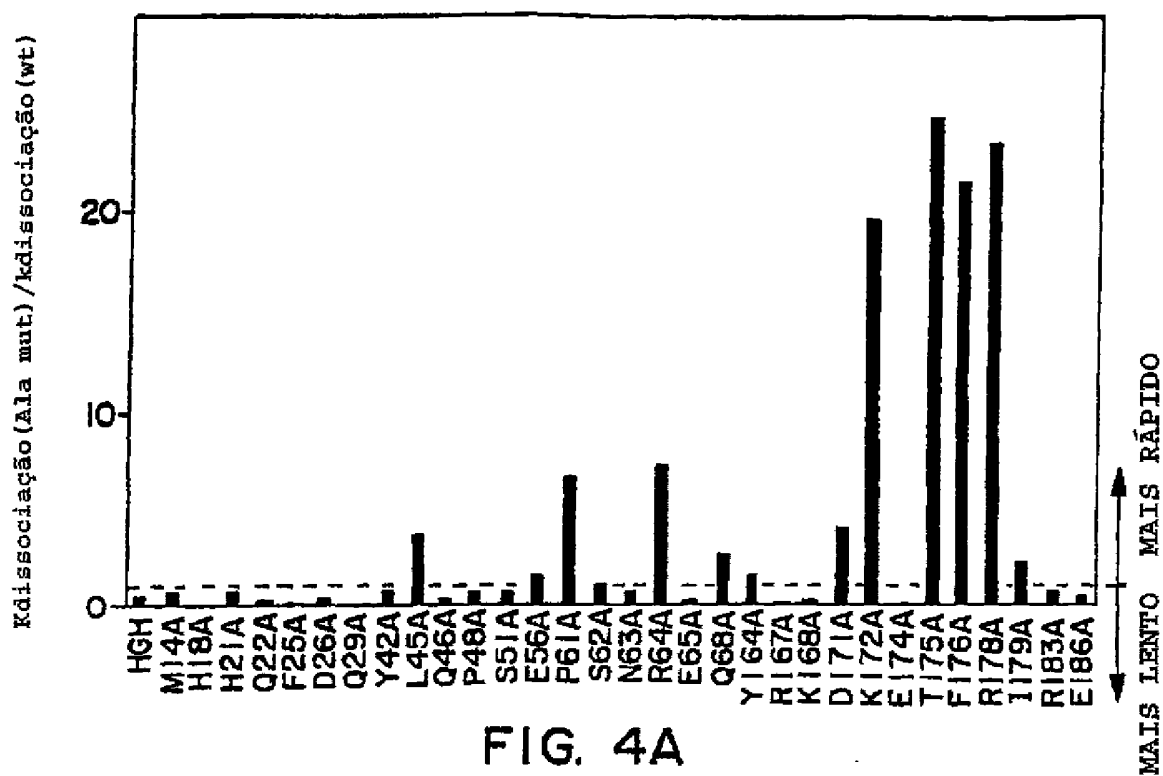


FIG. 3



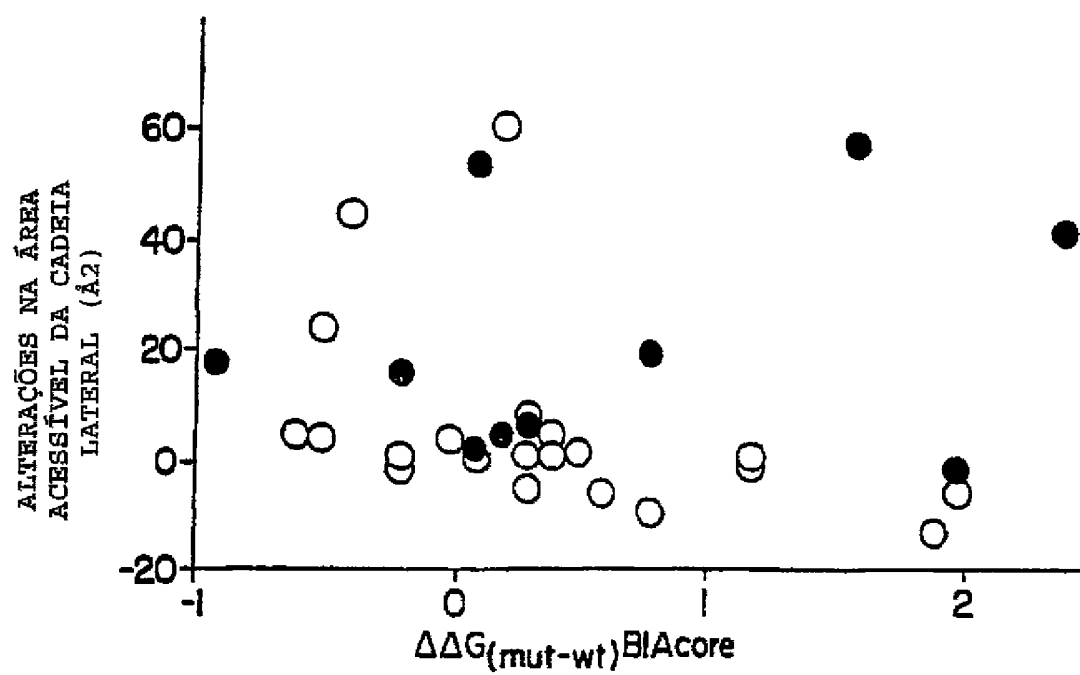


FIG. 5A

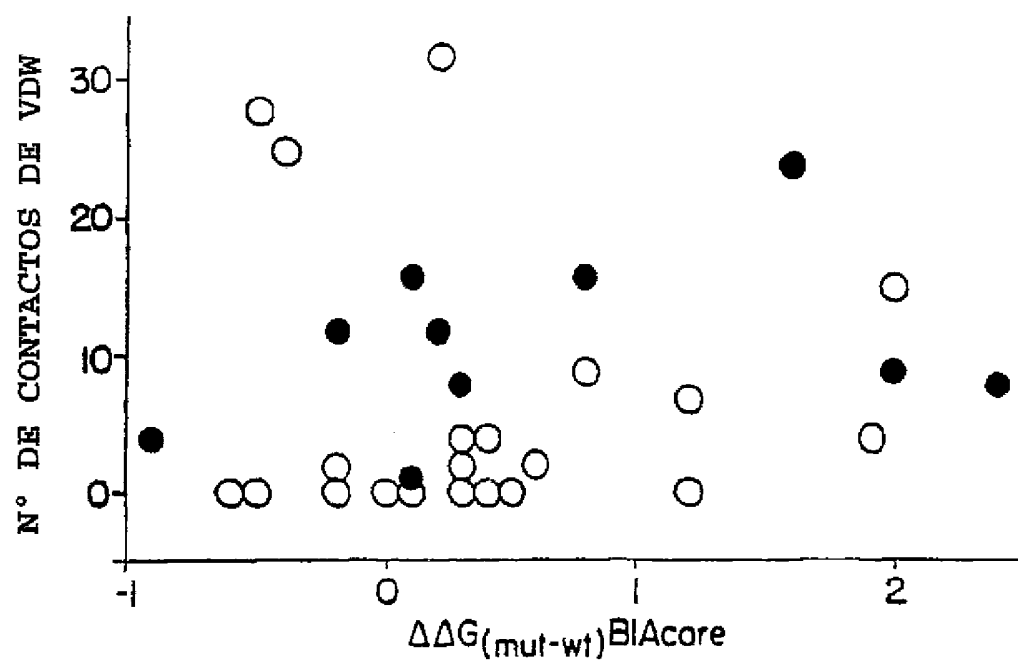


FIG. 5B

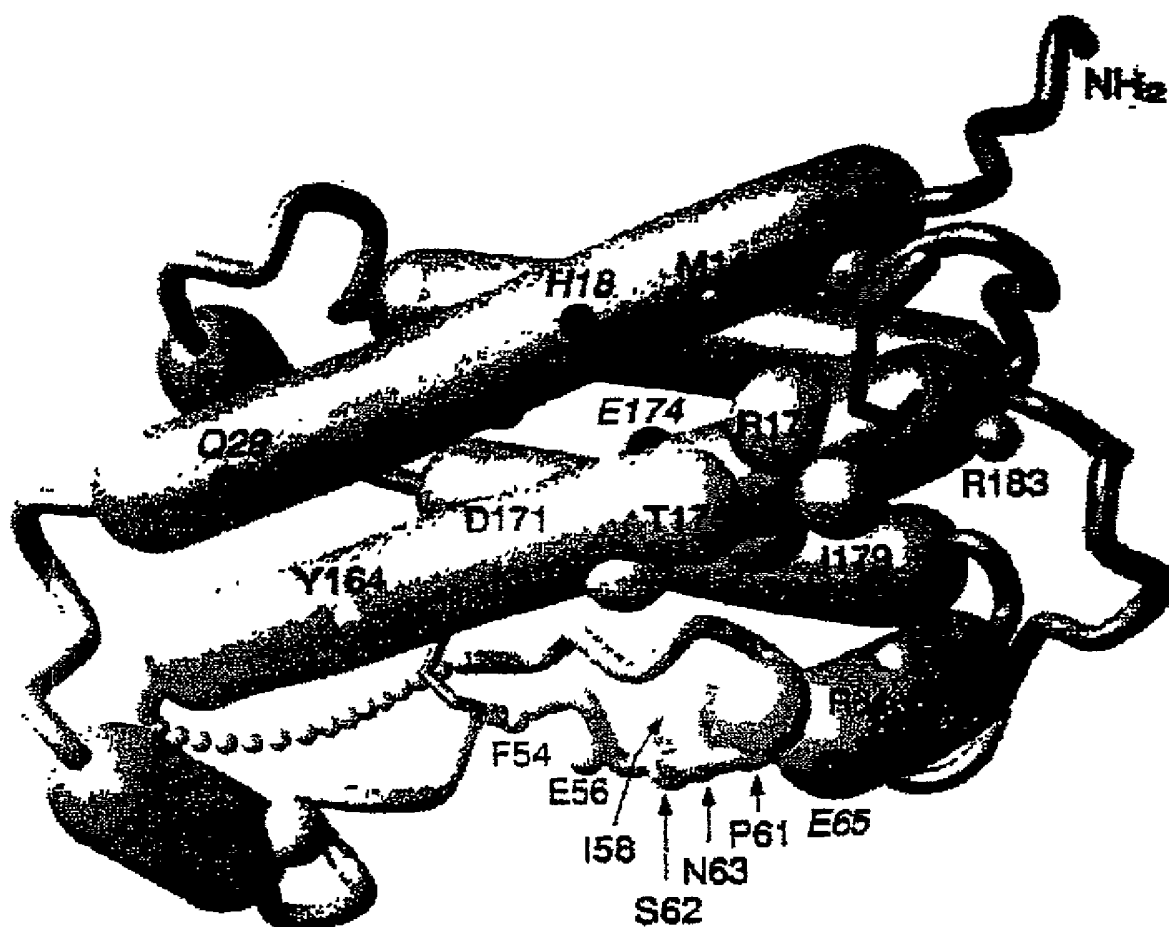


FIG. 6A

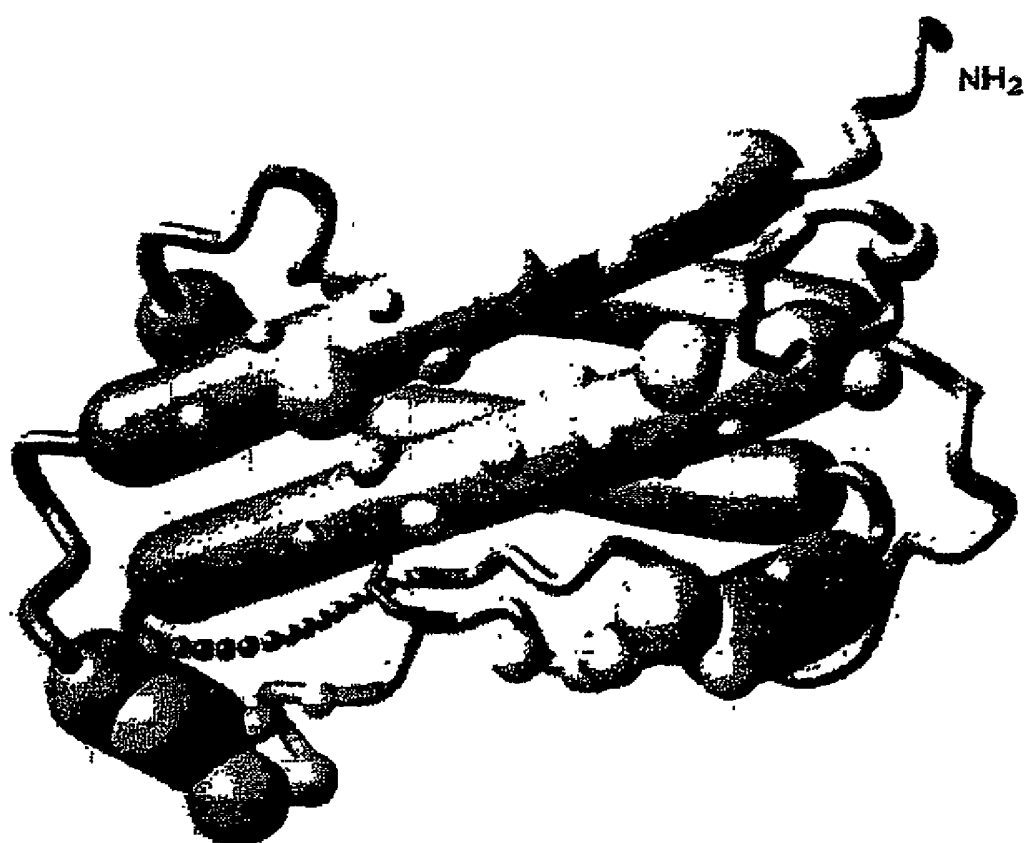


FIG. 6B

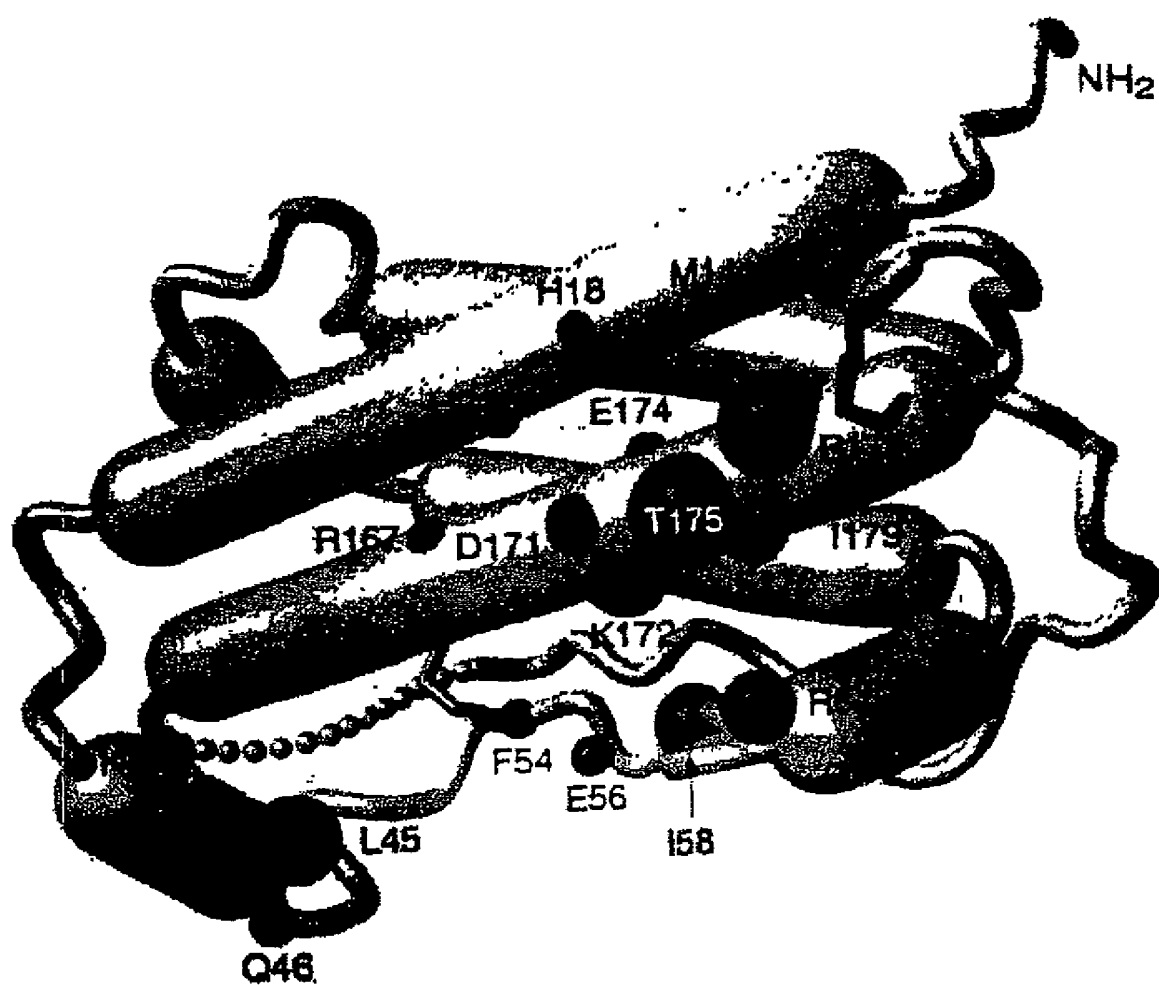


FIG. 6C

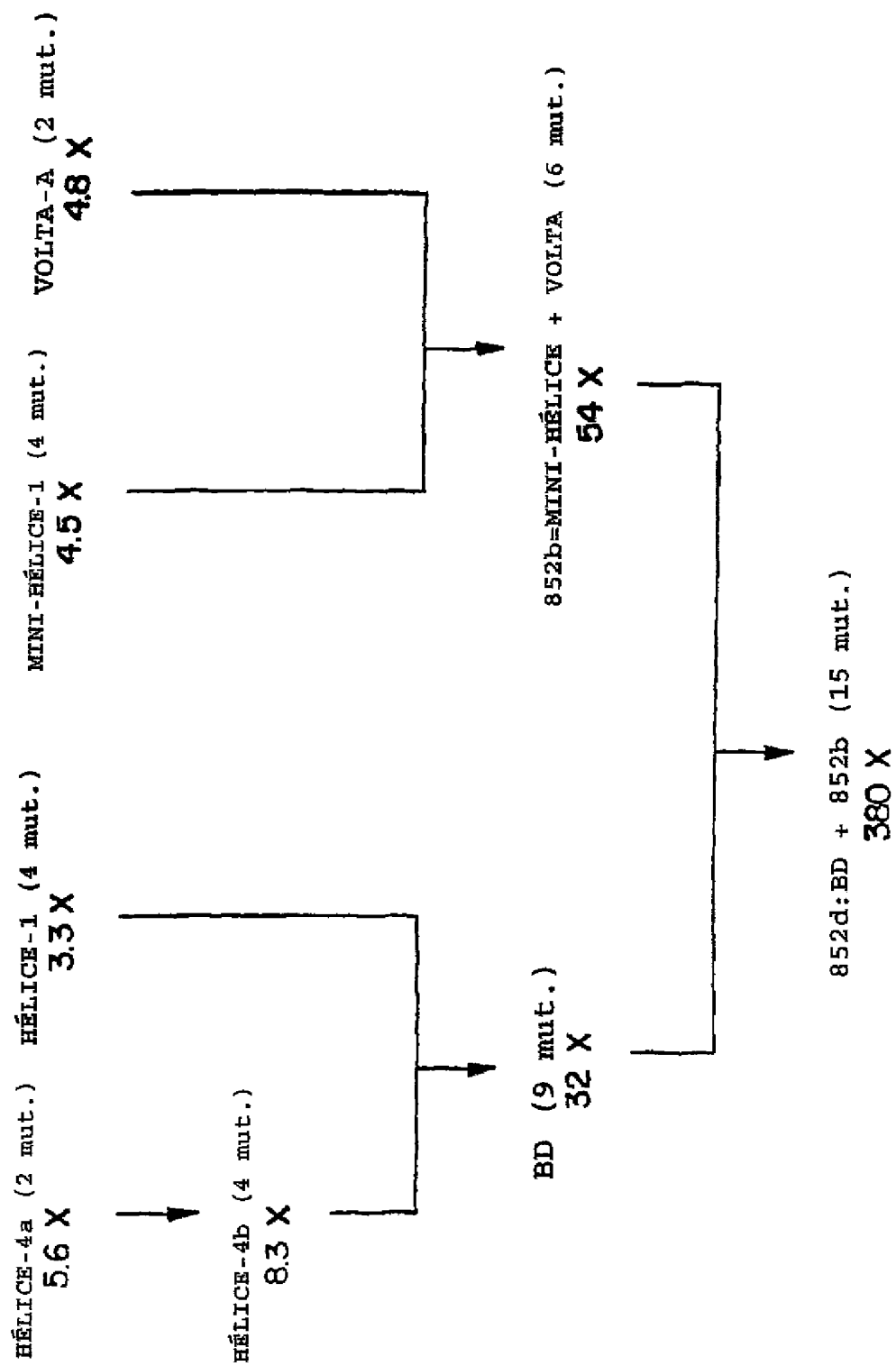


FIG. 7

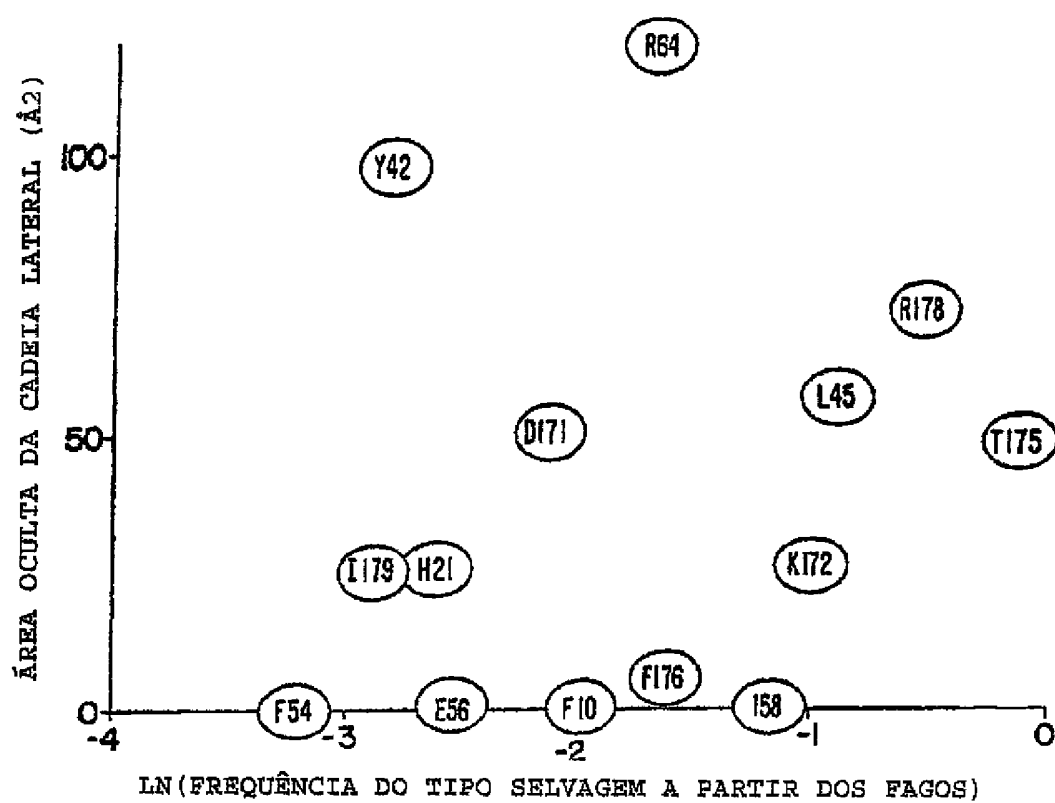


FIG. 8A

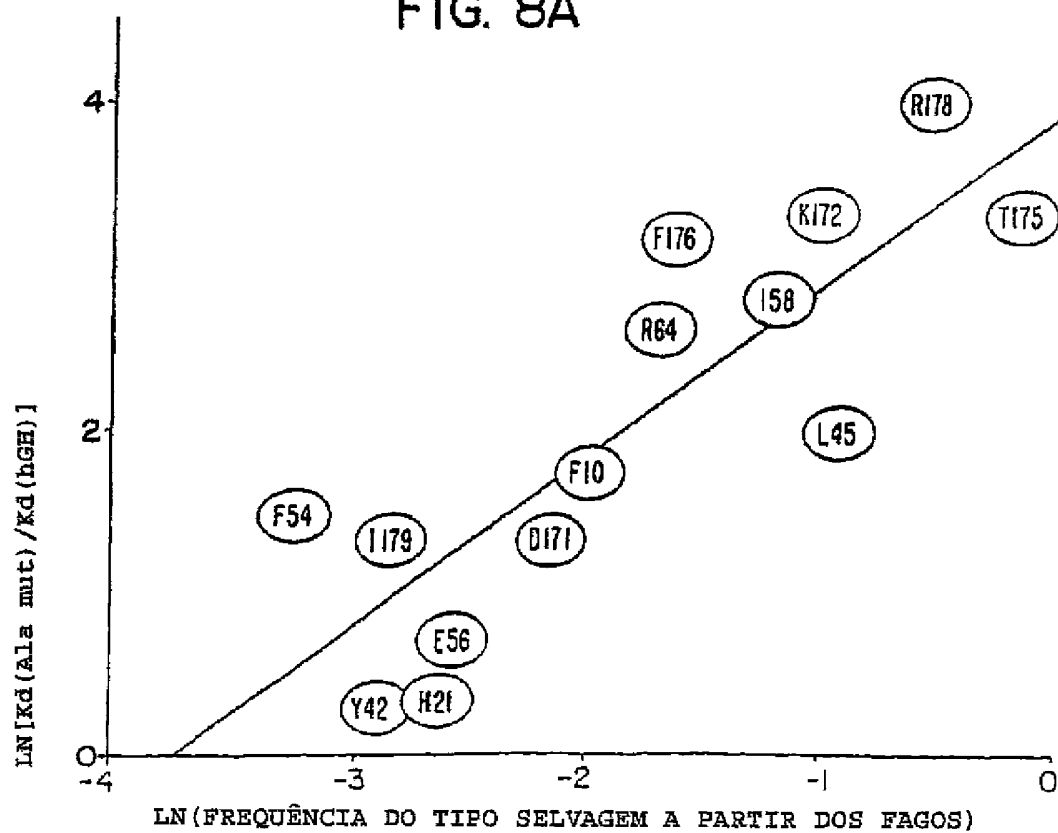


FIG. 8B

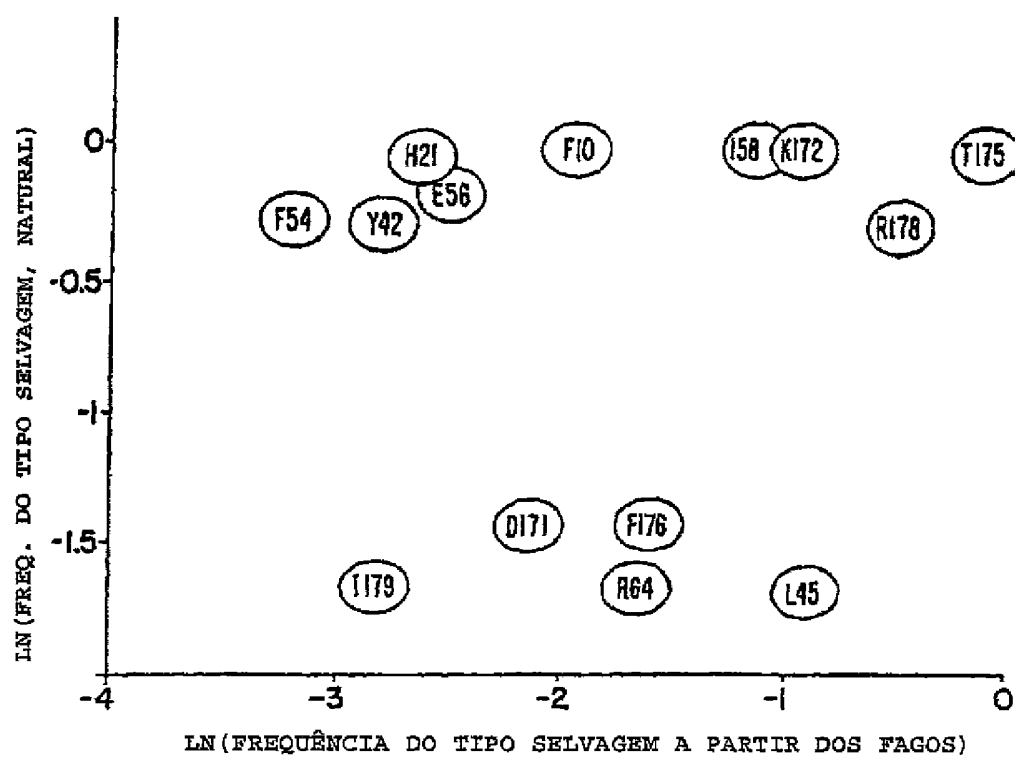


FIG. 8C

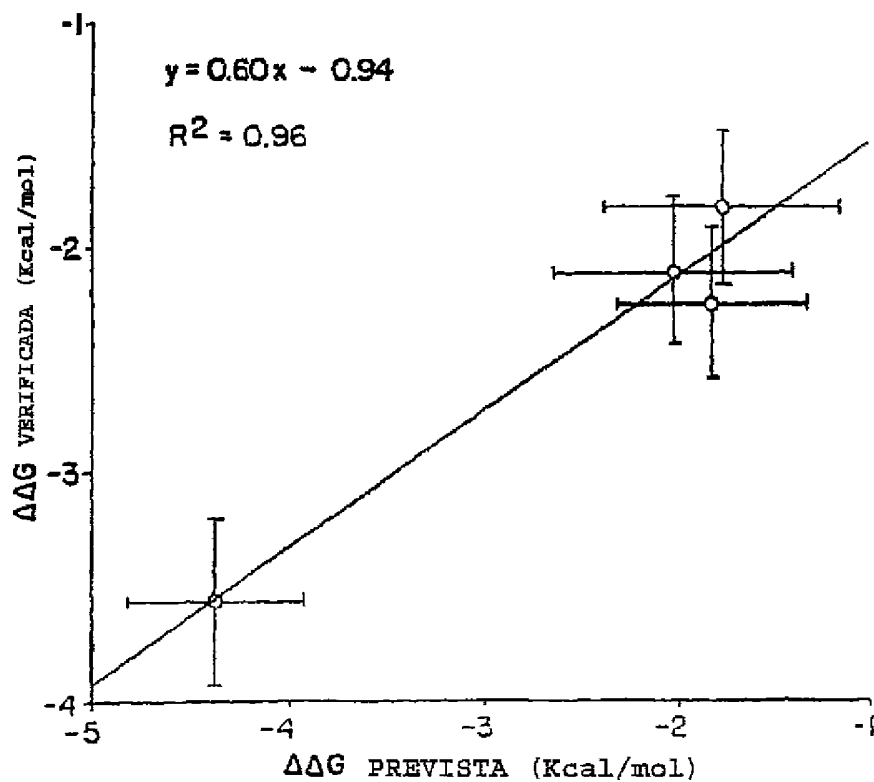


FIG. 9

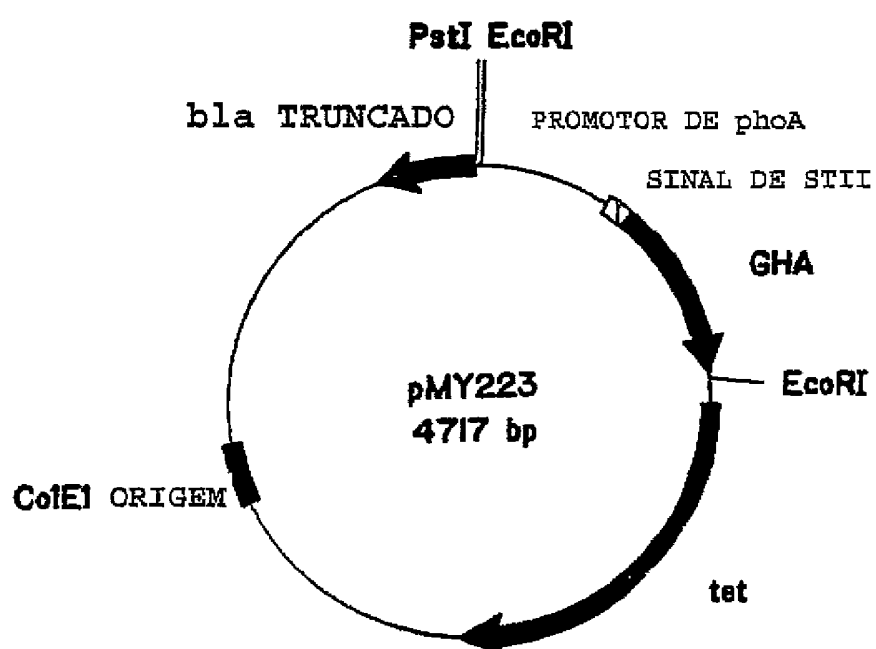


FIG. 10

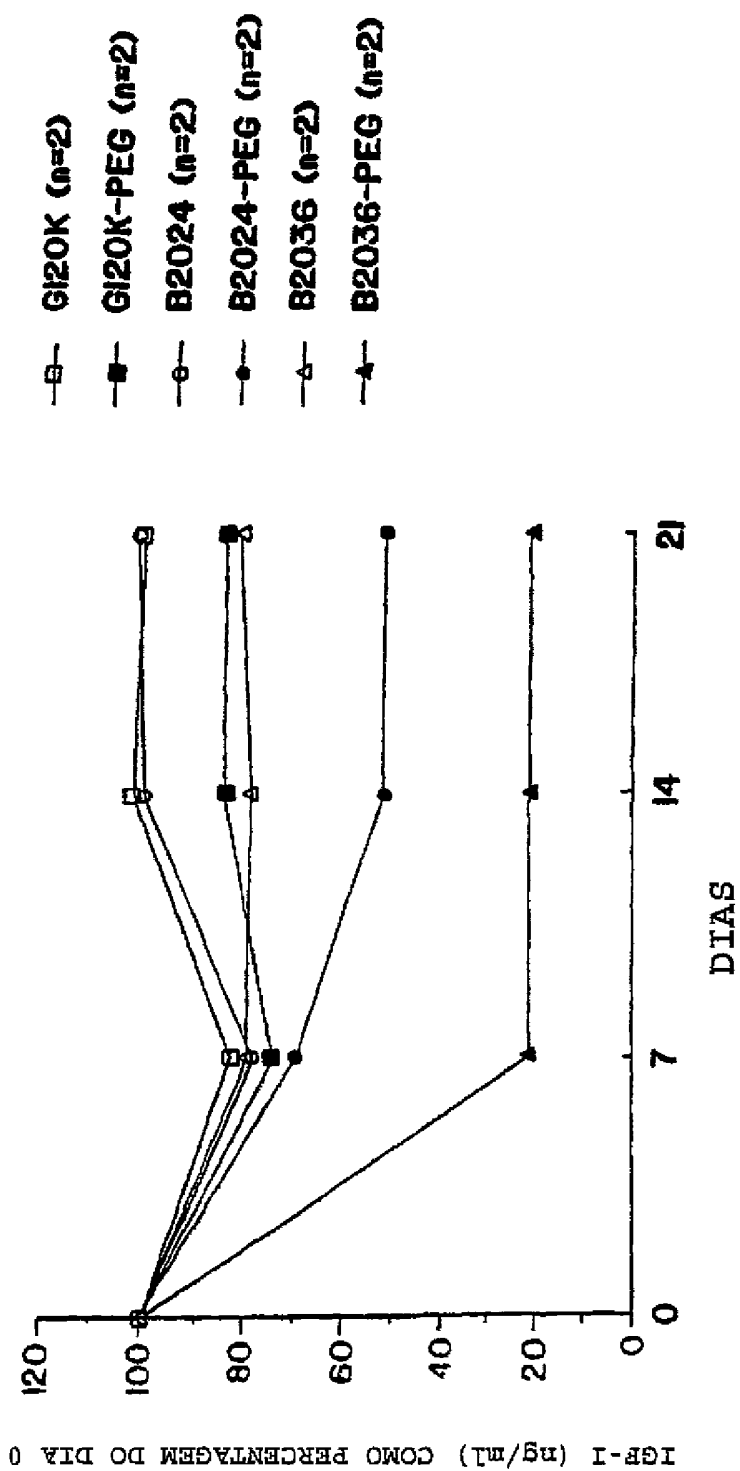


FIG. II

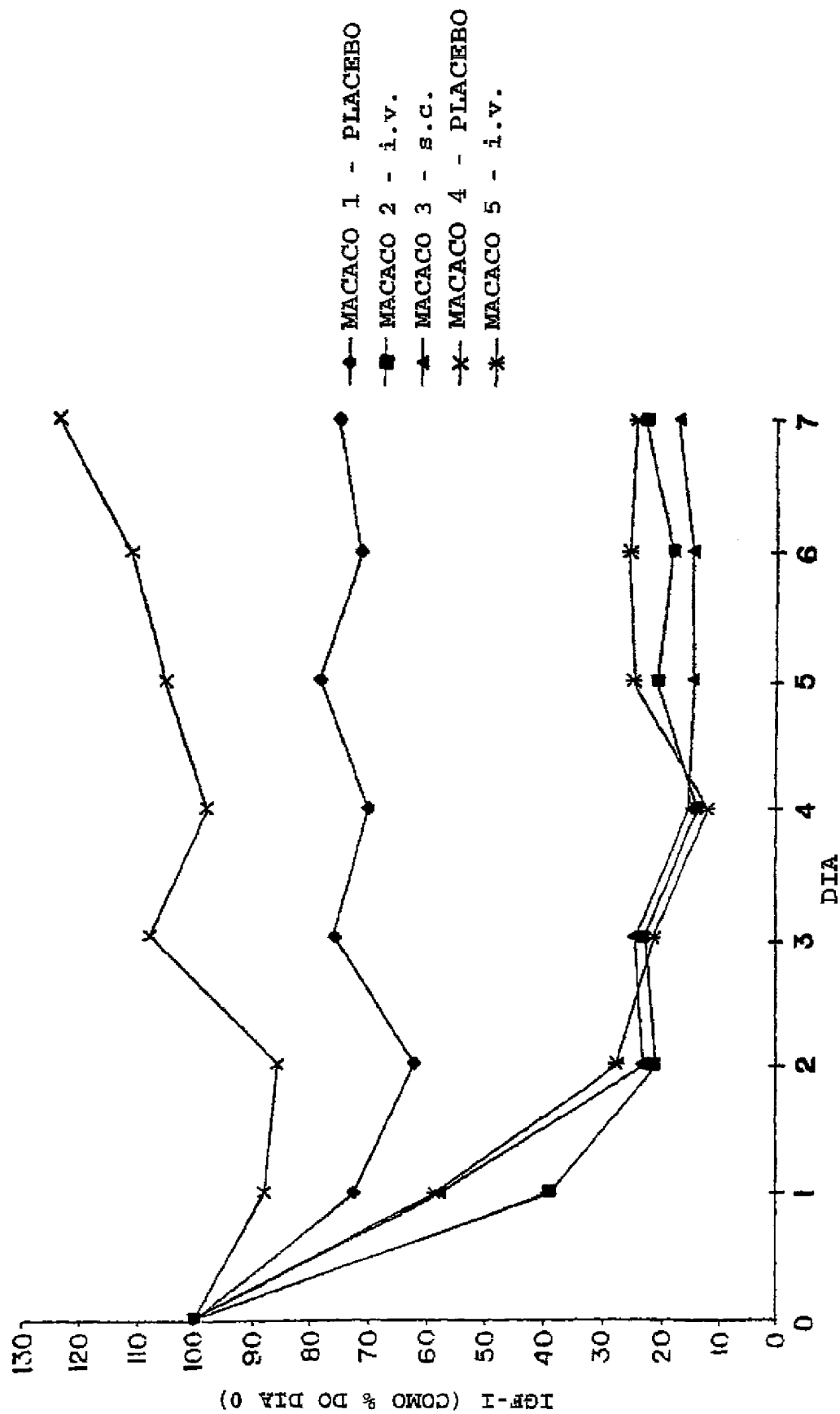


FIG. 12