

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

**N.º** 97.069

**REQUERENTE:** CIBA-GEIGY AG., suíça. industrial,  
Klybeckstrasse 141, 4002 Basel, Suíça

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE MONOXIGENASE  
 $\alpha$ -HIDROXILANTE DE PEPTIDILGLICINA"

**INVENTORES:** KENJI SUZUKI; HIROKO SHIMOI; YASUMO  
YWASAKI e YOSHIKI NISHIKAWA

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

21 de Março e 30 de Novembro de 1990 Nos.9006354,6 e  
9026082,9 no Reino Unido e em 10 de Agosto de 1990  
No.210535/90 no Japão

CIBA-GEIGY AG

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE MONOXIGENASE  $\alpha$ -HIDROXILANTE DE PEPTIDILGLICINA"

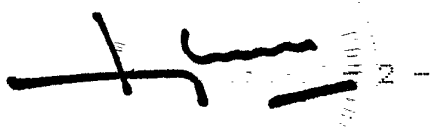
=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a produção de monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina compreendendo os passos de:

cultura de células de insectos transfectadas com um baculovirus recombinante no qual foi incorporado um DNA codificador da monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina para produzir a enzima e recuperação da enzima a partir da cultura; e um processo para a produção de um peptídeo C-terminal de  $\alpha$ -hidroxiglicilpeptídeo caracterizando-se pela conversão de um peptídeo prolongado com glicina C-terminal para dar um  $\alpha$ -hidroxiglicilpeptídeo usando a enzima preparada pelo processo atrás.



### Campo do Invento

O presente invento está relacionado com um processo para a produção de monooxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina (PAM), com a sua utilização na preparação de um  $\alpha$ -hidroxiglicil-peptídeo a partir de um correspondente peptídeo prolongado com glicina e o referido  $\alpha$ -hidroxiglicilpeptídeo per se.

### Descrição de Trabalhos Anteriores

As chamadas enzimas de  $\alpha$ -amidação C-terminal de peptídeos que catalisa a conversão de um peptídeo prolongado com glicina representado pela fórmula  $R-NH-CH_2-COOH$ , em que R representa um peptídeo e  $-NH-CH_2-COOH$  representa um resíduo de glicina presente no extremo C do peptídeo, num peptídeo  $\alpha$ -amidado representado pela fórmula  $R-NH_2$  em que o grupo amina amida o grupo  $\alpha$ -carboxilo do aminoácido C-terminal do peptídeo.

É do conhecimento geral que muitos peptídeos biologicamente activos possuem uma estrutura C-terminal  $\alpha$ -amidada e em muitos casos esta estrutura é essencial para a sua actividade biológica, mas existem dificuldades na preparação directa de um peptídeo  $\alpha$ -amidado no extremo C por síntese química e técnicas de recombinação de genes. Para ultrapassar esta dificuldade, foram feitas muitas tentativas para usar uma enzima de  $\alpha$ -amidação de peptidilglicina para preparar um peptídeo  $\alpha$ -amidado C-terminal. Por exemplo, EP 0308 067 descreve uma composição de enzimas de  $\alpha$ -amidação originada em tumores MTC e sua utilização.

Mizuno K., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 148, No 2, pp 546-552, 1987 descreve uma enzima de  $\alpha$ -amidação AE-1 derivada da pele de Xenopus laevis; e Ohaya K., et al.,

Handwritten signature and the number 3.

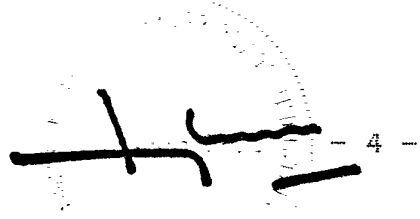
Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 150. Nº3, pp. 1275-1281, 1988 descreve um outro tipo de enzima de  $\alpha$ -amidação AE-II derivada da pele de Xenopus laevis. EP 0299790 descreve uma clonagem de cDNAs codificadores das enzimas derivadas Xenopus laevis nos plasmídeos pXA457 e pXA799, respectivamente. No entanto, a expressão do cDNA em células de E. coli proporciona um produto apenas com actividade marginal, provavelmente devido ao enrolamento incorrecto da enzima expressa ou por outros motivos, um dos quais poderá ser o produto não ter actividade de  $\alpha$ -amidação real.

Objectivo do invento

Surpreendentemente encontrou-se agora que X. laevis AE-I não é realmente uma enzima de  $\alpha$ -amidação mas antes de  $\alpha$ -hidroxilação e que a cinveração atrás referida de  $R-NH-CH_2-COOH$  em  $R-NH_2$  ocorre em dois passos. O primeiro passo é catalizado por uma monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina e conduz a um produto intermédio  $R-NH-CHOH-COOH$ . É de supor que também algumas outras enzimas de  $\alpha$ -amidação atrás referidas não sejam enzimas reais de  $\alpha$ -amidação mas antes catalizem apenas o primeiro passo da reacção e portanto sejam monoxigenases  $\alpha$ -hidroxilantes de peptidilglicina.

Existe a necessidade de um processo para a produção de uma monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina tendo uma potência elevada. Como um meio para a produção de um peptídeo ou enzima biologicamente activa, USP Nº 4,745,051 descreve a utilização de um sistema de expressão baculovirus/células de insectos.

Constitui um objectivo do presente invento proporcionar um método para a produção de uma monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina tendo uma elevada potência e um método para a



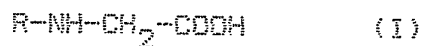
produção de  $\alpha$ -hidroxiglicilpeptídeos usando a referida monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante.

Descrição do invento

O presente invento proporciona um processo para a produção de uma monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina tendo uma elevada potência por um método de recombinação de genes usando um sistema de expressão baculovirus-células de insectos.

Mais especificamente, o presente invento proporciona um processo para a produção de uma monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina, o referido método compreendendo os passos da cultura das células de insecto transfectadas com um baculovirus recombinante no qual foi incorporado um DNA codificador de monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina para produzir a enzima; e facultativamente recuperação da enzima a partir da cultura.

O presente invento proporciona ainda um processo para a produção de um peptídeo com  $\alpha$ -hidroxiglicilo C-terminal caracterizado pela conversão de um peptídeo prolongado com glicina no extremo C da fórmula (I)



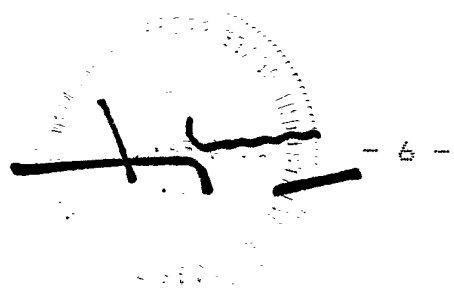
em que R representa um peptídeo e  $-NH-CH_2-COOH$  representa um resíduo glicina presente no extremo C do peptídeo R, num peptídeo com  $\alpha$ -hidroxiglicilo no extremo C da fórmula (II)



usando a enzima preparada por um processo de acordo com o presente invento.

As monoxigenases  $\alpha$ -hidroxilantes de peptidilglicina do presente invento incluem quaisquer enzimas tendo a actividade de  $\alpha$ -hidroxilação C-terminal atrás referida e derivadas de várias origens. De preferência as presentes enzimas de  $\alpha$ -hidroxilação de peptidilglicina são as descritas na literatura atrás mencionada, como sejam AE-I e AE-II derivadas da pele de Xenopus laevis, assim como seus fragmentos tendo a actividade enzimática pretendida. Mais preferencialmente a presente enzima é AE-I.

O DNA codificador da presente enzima pode ser preparado de acordo com um processo convencional. Por exemplo, RNA total foi extraído de um material em que um peptídeo com  $\alpha$ -hidroxiglicilo ou  $\alpha$ -amidado é expresso nativamente como seja a pele de Xenopus laevis, glândula pituitária intermédia bovina, átrio de rato ou similares de acordo com um processo convencional. Em seguida, RNA poli(A)+ foi isolado numa coluna de cromatografia em cligo dT-celulose de acordo com um processo convencional tal como o de Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry 18, 5294-5299 (1977). Em seguida, construiu-se uma biblioteca de cDNA de acordo com um processo convencional, por exemplo em fago lambda ou de acordo com o método de Okayama e Berg, Mol. Cell Biol. 2, 161-170, 1982; e a biblioteca de cDNA foi despistada por um método de hibridação usando uma sonda de oligonucleótidos projectada de acordo com uma sequência publicada de cDNA codificador de monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina, derivada por exemplo de boi, rã ou rato (ver Mizuno, K. et al. (1987), Biochem. Biophys. Res. Comm. 148, 544-552; Eipper, B.A. et al. (1987), Molec. Endocrinology 1, Nº 11, 777-790; Dhanya, K. et al. (1988), Biochem. Biophys. Res. Comm. 150, 1275-1281; Stoffers, D.A. et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 735-739). Numa



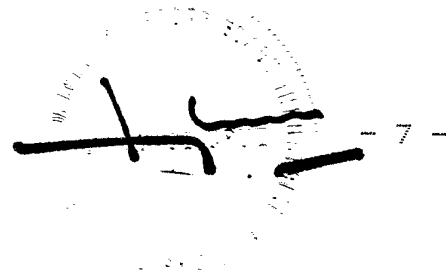
realização preferida do presente invento, clonou-se um cDNA usando uma sonda de oligonucleótidos sintetizada de acordo com a sequência de DNA de AE-I descrita em EP 0299790.

De acordo com o presente invento, um DNA codificador da presente enzima, como seja cDNA, foi inserido num vector de transferência para baculovirus para construir um vector de transferência recombinante para baculovirus e o vector de transferência recombinante para baculovirus é então cotransfectado com um DNA de baculovirus em células de insecto para que se dê uma recombinação homóloga. O vector de transferência para baculovirus é geralmente um plasmídeo contendo um segmento de DNA de baculovirus, segmento esse que compreende um gene não essencial para a replicação de baculovirus. O gene não essencial para a replicação de baculovirus é, por exemplo, um gene da poliedrina compreendendo um gene estrutural da poliedrina e um seu promotor. Tais vectores de transferência de baculovirus são por exemplo pAcYM1 (Matsuura, Y., *et al.*, J. Gen. Virol. (1987) 68, 1233-1250); pAc311, pAc360, pAc373 e pAc380 (USP 4,745,051) e similares.

Os baculovirus usados no presente invento são, por exemplo, virus da poliedrose nuclear de Autographa californica (AcMNPV), MNPV de Trichoplusia ni, MNPV de Rachiplusia ou, MNPV de Galleria mellonell e similares.

Um kit contendo uma combinação de um virus de poliedrose nuclear de Autographa californica e os vectores de transferência pAc700, pAc701, pAc702, pVL1393 podem ser adquiridos à Invitrogen.

As células de insectos usadas no presente invento são linhas estabelecidas de células de insectos, por exemplo de



Soodoptera frugiperda, tais como Sf9 (ATCC CRL1711), Sf21, Mamestra brassicae e similares.

O sistema de células de Bombix mori usando o vírus da poliedrose nuclear de Bombix mori (BmNPV) também pode ser usado no presente invento.

A recombinação homóloga foi realizada de acordo com um processo convencional, como descrito no Exemplo 3. De acordo com o presente invento, a recombinação homóloga ocorre numa taxa tão elevada como várias por centos e um vírus recombinante pode ser seleccionado com êxito como uma placa transparente poliedrina-negativa de entre as placas brancas selvagens. Assim, um vírus recombinante pretendido pode ser fácil e reprodutivelmente seleccionado.

As células de insecto transfectedadas são cultivadas de acordo com um processo convencional. Nomeadamente, as células de insecto transfectedadas podem ser cultivadas em qualquer meio de cultura de tecidos em que as células de insecto possam crescer, como seja meio de Grace ou TC100 suplementado com soro de mamífero, meio sem soro EX-CELL400 ou similares a uma temperatura de 20°C a 30°C, de preferência entre 27°C e 28°C, por exemplo 27°C durante 2 a 10 dias, de preferência 3 a 5 dias. De acordo com o presente invento, mais de 90% de uma enzima expressa é secretada para o sobrenadante de cultura e portanto a enzima pretendida pode ser recuperada a partir do sobrenadante de cultura segundo um processo convencional, como seja centrifugação, remoção de sais ou vários processos cromatográficos ou uma combinação deles.

Quando a enzima purificada assim preparada reage com um peptídeo prolongado com glicina da fórmula (I), e.g. no peptídeo modelo Ala-Ile-Gli-Val-Gli-Ala-Pro-Gli sendo idêntico aos 7

- 8 -

resíduos de aminoácidos C-terminais da calcitonina humana prolongada com um resíduo glicina C-terminal ou nos precursores da calcitonina prolongados com um resíduo glicina C-terminal como seja calcitonina humana, calcitonina de salmão, calcitonina de galinha, calcitonina de enguia, calcitonina de rato, calcitonina porcina, calcitonina ovina, calcitonina bovina ou factor de libertação da hormona de crescimento humana (GHRF), peptídeo relacionado com o gene da calcitonina humana (CGRP), hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH) e similares, são produzidos os correspondentes  $\alpha$ -hidroxilglicilpeptídeos de fórmula (II).

A produção de tal  $\alpha$ -hidroxilglicilpeptídeo é realizada usando uma preparação contendo monoxigenase de  $\alpha$ -hidroxilação de peptidilglicina, partindo de um correspondente peptídeo prolongado com glicina num meio aquoso tal como tampão, por exemplo um tampão de fosfato, tampão acetato, tampão MES-Na, tampão TES-Na, tampão Tris-HCl ou similares, a uma temperatura de 16°C a 37°C, de preferência cerca de 30°C. Uma quantidade de enzima usada é por exemplo  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^6$  unidades/mg de proteína substrato e preferencialmente  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^5$  unidades/mg de proteína substrato. A preparação contendo monoxigenase de  $\alpha$ -hidroxilação de peptidilglicina pode ser qualquer preparação contendo a referida enzima, como seja um sobrenadante de cultura, um sobrenadante concentrado, uma preparação de enzima enriquecida ou parcialmente purificada, uma enzima purificada ou similares. Tais preparações de enzima, uma enzima purificada ou similares. Tais preparações de enzima podem ser liofilizadas para armazenamento.

Os  $\alpha$ -hidroxilglicilpeptídeos  $R-NH-CH(OH)-COOH$  produzidos pelo processo acima são quaisquer  $\alpha$ -hidroxilglicilpeptídeos incluindo os precursores das calcitoninas, tais como calcitonina humana, calcitonina de salmão calcitonina de galinha, calcitonina

de enguia, calcitonina de rato, calcitonina porcina, calcitonina ovina, calcitonina bovina ou factor de libertação da hormona de crescimento humana (GHRF), peptídeo relacionado com o gene da calcitonina humana (CGRP), hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH) e similares. Assim o presente invento também diz respeito a  $\alpha$ -hidroxiglicilpeptídeos C-terminais da fórmula R-NH-CHOH-COOH referidos atrás, à sua produção por meio de uma monooxigenase de  $\alpha$ -hidroxilação de peptidilglicina e à sua utilização para a produção dos correspondentes peptídeos  $\alpha$ -amidados da fórmula R-NH<sub>2</sub> em que o grupo amina amida o grupo  $\alpha$ -carboxilo do aminoácido C-terminal do peptídeo.

R-NH-CHOH-COOH é surpreendentemente estável em condições fisiológicas e pode ser convertido em R-NH<sub>2</sub> pela adição de uma base, e.g. um hidróxido alcalino, em particular NaOH, a um valor de pH básico, particularmente entre cerca de pH 9 e pH 12, de preferência entre cerca de pH 10 e cerca de pH 11, e.g. por incubação durante alguns minutos a pH 11 ou durante 30 minutos a pH 10.

#### Descrição dos desenhos

Fig. 1-1 representa um processo para a construção do plasmídeo intermediário pSVL/AE-I-310;

Fig. 1-2 representa um processo para a construção do vector de transferência recombinante pACYM1/AE-I para baculovírus;

Fig. 2 representa um processo para a construção de um baculovírus recombinante;

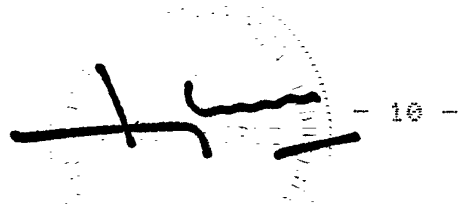


Fig. 3 representa a produção da monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina por células de insecto transfectedas com o baculovirus recombinante em meio sem soro; e

Fig. 4 representa a conversão dependente do tempo de calcitonina humana prolongada com glicina (hCT-Gli) para calcitonina humana (hCT) usando meio de cultura de células de insecto enriquecido.

Exemplos

Os exemplos que se seguem servem para ilustrar o presente invento mas não devem ser considerados como limitações dele.

EXEMPLO 1: Clonagem de cDNA codificador de monooxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina AE-I a partir da pele de Xenopus laevis

O RNA total foi extraído das peles de Xenopus laevis e isolado RNA poli(A)+ por cromatografia em coluna de oligo(dT)-celulose de acordo com um processo de Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry 12, 5294-5299 (1977). Construiu-se uma biblioteca de cDNA pelo método de Okayama e Berg, Mol. Cell. Biol. 2, 161-170, 1982, usando 10  $\mu$ g de RNApoli(A)+ e 5  $\mu$ g de DNA vector-iniciador. Um oligonucleótido sintético de 29 pb (CATCACATGCTTCTATTTGGATGCAATAT) que corresponde a 103<sup>His</sup>-112<sup>Ile</sup> em AE-I [Mizuno K., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 148, 546-552 (1987)] foi usado como sonda de hibridação de acordo com a sequência publicada da enzima de hidroxilação de Xenopus laevis, AE-I. Um dos clones positivos, pAE-I-310 observou-se ter cDNA da enzima hidroxilante de Xenopus laevis, AE-I, através de mapeamento de restrição e análise da sequência de nucleótidos. A sequência de nucleótidos do cDNA flanqueando os extremos SmaI e DraI está apresentada na Sequência de Listagem/SEQ ID NO1.

EXEMPLO 2: Construção do vector de transferência recombinante pACYM1/AE-I (Fig. 1)

O vector de transferência de partida pAcYM1 é um plasmídeo contendo um gene da poliedrina de baculovirus, descrito

detalhadamente em Matsura Y., et al., J. Gen. Virol. (1987) 68, 1233-1250.

Para construir um vector de transferência para um sistema de expressão em células de insecto, o clone de cDNA pAE-I-310 foi duplamente digerido com as enzimas de restrição SmaI e DraI.

O fragmento SmaI/DraI foi então integrado no sítio SmaI no vector pSVL (Pharmacia). O plasmídeo com a orientação pretendida foi designado pSV/AE-I-310. Em seguida o plasmídeo foi duplamente digerido com as enzimas de restrição PstI e BamHI. Um fragmento resultante de 1,3 Kpb do clone continha uma região codificadora da enzima hidroxilante AE-I. Este fragmento foi dotado de extremos cerses com DNA-polimerase de T4, seguido de ligação com um adaptador BamHI e digestão com a enzima de restrição BamHI. pAcYM1/AE-I foi preparado por inserção do fragmento modificado num vector de transferência pAcYM1 que foi previamente tratado com a enzima de restrição BamHI e desfosforilado.

### EXEMPLO 3: Construção de baculovirus recombinante (Fig.2)

O plasmídeo de transferência contendo um cDNA de AE-I foi recombinado com o genoma do vírus selvagem da poliedrose nuclear de Autographa californica (AcMNPV) por recombinação homóloga. O AcMNPV tipo selvagem pode ser adquirido comercialmente à Invitrogen. Em seguida 1 µg do DNA viral foi misturado com 25-100 µg de DNA do plasmídeo pAcYM1/AE-I em 950 µl de tampão HEPES (20 mM HEPES (pH 7,0)/1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/5mM KCl/140 mM NaCl/10 mM glucose) e após precipitação com 50 µl de 2,5M CaCl<sub>2</sub>, as partículas de DNA foram colocadas sobre 2x10<sup>6</sup> células Sf9 e a cultura foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante da cultura foi substituído por 2 ml de meio de Grace



(GIBCO) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO). Após 4 dias de incubação a 27°C, o sobrenadante foi colhido e diluído 10 a 1000 vezes, seguido do ensaio em placas. As placas que se formam a partir de um baculovírus recombinante tendo uma inserção de DNA estranho no seu genoma podem distinguir-se das placas virais não recombinantes a olho nu. Duas placas negativas para a poliedrina foram repicadas e posterior purificação e amplificação dos vírus recombinantes foi realizado segundo um processo convencional (A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Cultures Procedures, M.D. Summers, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin Nº 1555).

EXEMPLO 4: Produção de enzima

Primeiro  $5 \times 10^6$  células Sf9 (ATCC CRL1711) foram misturadas com os vírus recombinantes isolados a uma MOI (multiplicidade de infecção) de 10 e suplementado com 8 ml de EX-CELL 400 (J R Scientific), um meio sem soro. As células de insecto infectadas foram cultivadas no meio EX-CELL 400 a 27°C durante 7 dias.

O meio de cultura de células de insecto preparado como descrito atrás foi centrifugado e o sobrenadante concentrado 40 vezes usando um concentrador Amicon e a amostra concentrada foi aplicada numa coluna de filtração em gel de Sephadex B-25, PD-10 (Pharmacia), para remover os materiais de baixo peso molecular. A actividade da enzima eluída da coluna é estável durante pelo menos 2 meses a -20°C.

A actividade enzimática de monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina foi medida de acordo com Jones, B.N. et al. (Anal. Biochem. 168, 272-279, 1988), com uma ligeira modificação. Um as condições de ensaio padrão são pH 6,4 em 200 mM TES-Na/ácido ascórbico 2 mM/ 50 mM KCl/  $1 \mu$   $\text{CuSO}_4$ / N-etilmaleimida 2mM/

N-dansil-Tir-Fen-Gli 20  $\mu$ M/ 100  $\mu$ g/ml de catalase e a reacção foi iniciada pela adição de uma enzima a 30°C e parada após 15-30 min pela adição de EDTA para uma concentração final de 50 mM, seguido da adição de NaOH para uma concentração final de 0,2 N e neutralização com HCl. A amostra foi analisada numa coluna Hi-pore (4,6 x 40 mm) (Bio-Rad) usando uma condição isocrática de 62,5 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}/33\%$ acetonitrilo, pH 7,0. Uma unidade de actividade enzimática é definida como a quantidade de enzima para produzir 1 pmole do produto por minuto.

O resultado da cultura está apresentado na Fig. 3.

Uma linha a cheio indica a actividade medida segundo o método descrito atrás. Uma linha a ponteados indica actividade medida sem tratamento alcalino e neutralização.

Note-se que o peptídeo prolongado com  $\alpha$ -hidroxiglicina pode ser convertido com no correspondente peptídeo  $\alpha$ -amidado por tratamento alcalino, por exemplo durante alguns minutos a pH 11 ou durante 30 minutos a pH 10.

Para purificar a enzima, o meio de cultura (500 ml) preparado como atrás foi tratado como se segue. Após remoção das células a baixa velocidade o meio foi dialisado contra 10 mM Tris-Cl/ 0,1% Lubrol, pH 7,5 (Tampão A) e aplicado a uma coluna de 2,6x22 cm de DEAE-Celulose (DE52) equilibrada com Tampão A e as fracções contendo a actividade de enzima hidroxilante foram colhidas, dialisadas contra 50 mM MES-Na, pH 5,7 e aplicadas numa coluna Mono S HR5/5 (Pharmacia) equilibrada com 50 mM MES-Na, pH 5,7. A enzima hidroxilante foi eluída com um gradiente de sal linear de 0-500 mM NaCl no mesmo tampão. As fracções com elevada afinidade foram reunidas e dialisadas contra o Tampão A, seguido de aplicação numa coluna DEAE GLASS (Nacalai) equilibrada com o



Tampão A. A enzima hidroxilante foi eluída com um gradiente linear de 0-500 mM de NaCl no Tampão A.

O resultado da purificação está apresentado na Tabela 1.

TABELA 1

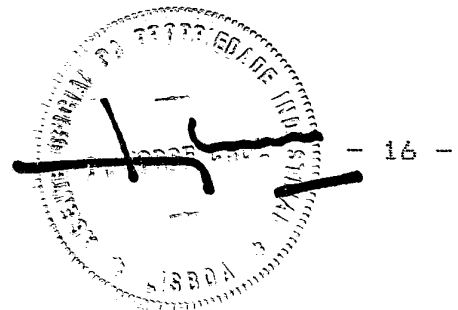
Passo de purificação	Proteína (mg)	Actividade (unidades) $\times 10^6$	Actividade específica (u/mg) $\times 10^4$	Recuperação %	Purificação (vezes)
Meio	504	10,5	2,08	100	1,0
DE52	40,6	5,94	14,6	57	7,0
Mono S	1,08	1,93	179	18	86
DEAE GLASS	0,70	1,50	214	14	103

A proteína purificada mostrou-se homogénea numa electroforese em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida, tendo um peso molecular de 41 KDa. O peso molecular aparente determinado por filtração em gel foi de 43 KDa.

Note-se, para a hidroxilação dos peptídeos é desnecessário purificar monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina até 100% de homogeneidade e as impurezas não perturbam a hidroxilação dos peptídeos prolongados com glicina.

EXEMPLO 5: Preparação de uma calcitonina humana prolongada com  $\alpha$ -hidroxiglicil no extremo C

Vinte seis mg de calcitonina humana prolongada com glicina no extremo C foi adicionado em 0,2 M MES-Na contendo 2 mM

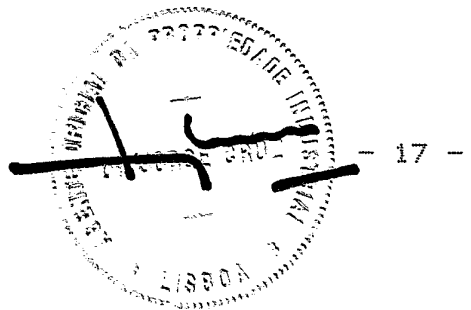


L-ascorbato, 0,1 mg/ml de catalase e 10 mM KI. Em seguida adicionou-se à solução 0,6 mg de monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina purificada. Após incubação a 30°C durante 5 horas a solução de reação foi tratada com uma cassete Sep-pak (Waters) e liofilizada. A amostra liofilizada foi dissolvida em ácido acético a 90% e aplicada numa coluna Bio-Rad Hi Pore RP304 (10x250 mm). A eluição foi realizada com um gradiente linear de acetonitrilo (19-23%) em formato de amônio 10 mM (pH 4,0). As frações contendo o peptídeo produto foram liofilizadas. A HPLC analítica feita usando uma coluna Bio-Rad Hi Pore304 (4,6x250 mm) com um gradiente linear de acetonitrilo (8-50%) em formato de amônio (pH 4,0) indicou que o produto obtido estava puro.

Análise do produto: Trinta  $\mu$ g do produto obtido foi sujeito a degradação de Edman com um sequenciador de proteínas em fase gasosa equipado com um analisador de PTH. A estrutura dos aminoácidos obtidos corresponde aos da cadeia de 32 aminoácidos da calcitonina humana.

Cinco mg do produto dissolvido em água (90% H<sub>2</sub>O e 10% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, pH 3,2) foi analisado com <sup>1</sup>H-NMR. Os sinais dos prótons foram assinalados por DQF-COSY (Double Quantum Filtered Chemical Shift Correlated Spectroscopy). Uma ressonância de 5,4 ppm foi assinalada para um próton  $\alpha$  no espectro de NMR. A ressonância deste próton  $\alpha$  mostra um grande desvio abaixo do campo relativamente a outros prótons  $\alpha$ . Este resultado sugere que o peptídeo contém um resíduo de  $\alpha$ -hidroxiglicina na sua estrutura.

Vinte  $\mu$ g do produto foram analisadas por espectrometria de massa com bombardeamento por átomos rápidos com iões positivos (FAB-MS). Obteve-se um pico distinto à volta do número de massa 3490, o que é compatível com a calcitonina humana prolongada com



$\alpha$ -hidroxiglicina. Para a calcitonina humana, foi avaliado um número de massa de 3420 em FAB-MS (calculado: 3418).

#### EXEMPLO 6: Produção de calcitonina humana

Para determinar a conversão dependente do tempo de calcitonina humana prolongada com glicina, 25 mg de calcitonina humana prolongada com glicina (hCT-Gli) foi incubado com 5,25 ml do meio concentrado obtido no Exemplo 4 a 30°C em 15 ml de tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 6,2) contendo L-ascorbato 5 mM, 0,5  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$ , 20  $\mu$ g/ml de catalase (Boehringer), 10 mM KI, 0,25 mM N-etilmaleimida, 1 acetoneitrilo e 0,1% Lubrol tipo PX. A vários tempos durante a incubação, 4  $\mu$ l das amostras foram diluídas 50 vezes com 11%  $\text{HCOONH}_4$  (pH 4)/ 10% acetoneitrilo e depois 25  $\mu$ l da amostra foi directamente aplicado numa coluna de HPLC (Tampão A (fase móvel), 10 mM  $\text{HCOONH}_4$  (pH 4,0)/ 10% acetoneitrilo; Tampão B, 10 mM  $\text{HCOONH}_4$  (pH 4,0)/ 50% acetoneitrilo. Coluna Bio-Rad Hi-Pore RP 304, 4,6 mm D.I. x 250 mm).

A Figura 4 mostra a conversão dependente do tempo de hCT-Gli pela enzima expressa, em que respectivamente os círculos abertos indicam o substrato, hCT-Gli, e os círculos a cheio indicam o produto.

Vinte e cinco mg de hCT-Gli foi convertido em calcitonina humana (hCT) usando 5 ml de um sobrenadante concentrado derivado de 200 ml do sobrenadante da cultura, após 4 horas de incubação a reacção foi parada pela adição de 150  $\mu$ l de 0,5 M EDTA (pH 7,0) e a solução foi tratada com uma base como referido atrás.

Em seguida a mistura de reacção foi passada através de uma coluna Seppak C-18 (Waters) e hCT foi purificado numa coluna

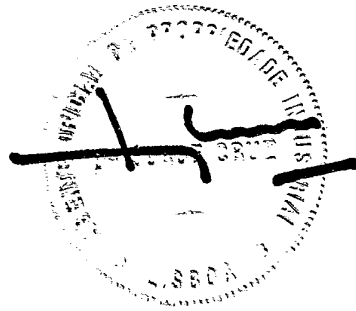


de HPLC em fase reversa semi-preparativa (YMC SH-343-5, 20 mm I.D. 23% acetonitrilo) a um solvente B (o mesmo tampão em 30% acetonitrilo) durante 60 min a um fluxo de 10 ml/min. As fracções contendo hCT foram colhidas e liofilizadas e a hCT mostrou-se estar pura por cromatografia. O produto foi também confirmado como hCT por análise com um analisador de aminoácidos, um sequenciador de aminoácidos em fase gasosa e um espectrómetro FAB-MASS.

Depósito de microorganismos:

E. coli contendo o plasmídeo pAcVM11 foi depositado no Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology, (FRI), 1-3, Higashi-1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan, como FERM BP-2796, de acordo com o Tratado de Budapeste, em 7 de Março, 1990.

O plasmídeo pSVL/AE-I-310 foi depositado na FRI como FERM BP-2797, de acordo com o Tratado de Budapeste, em 7 de Março, 1990.



LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS:

SEQ. ID NO: 1

TIPO DE SEQUÊNCIA: Nucleótidos com correspondente proteína

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 1391 pares de bases

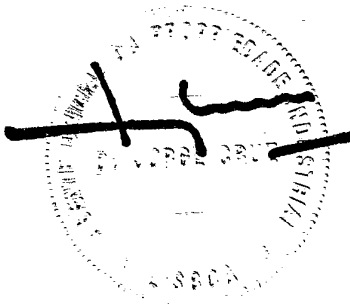
TIPO DE CADEIA: dupla

TOPOLOGIA: Linear

TIPO DE MOLÉCULA: cDNA para mRNA

ORGANISMO FONTE DE ORIGEM: Xenopus laevis

PROPRIEDADES: gene da monoxigenase alfa-hidroxilante de  
peptidilglicina de Xenopus laevis



GGGAAGAATG TGTATTTCTG GTTACCTGCG GGGCTAGCAC TGATGGAGTA 50  
GGGGGGATTG ATCCAGCTTC CTAATTACCA GGATTACAAC TTGCCTTTAA 100  
TTTACTCCTG CAGTAAGGCA CAGACCACAG GGTGGAC ATG GCC AGC CTC 149  
Met Ala Ser Leu  
-37 -35

AGT AGC AGC TTT CTT GTG CTC TTT CTC TTA TTT CAG AAC AGC 191  
Ser Ser Ser Phe Leu Val Leu Phe Leu Leu Phe Gln Asn Ser  
-30 -25 -20

TGC TAC TGT TTC AGG AGT CCC CTC TCT GTC TTT AAG AGG TAT 233  
Cys Tyr Cys Phe Arg Ser Pro Leu Ser Val Phe Lys Arg Tyr  
-15 -10

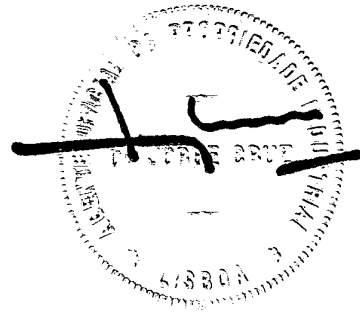
GAG GAA TCT ACC AGA TCA CTT TCC AAT GAC TGC TTG GGA ACC 275  
Glu Glu Ser Thr Arg Ser Leu Ser Asn Asp Cys Leu Gly Thr  
-5 1 5

ACG CGG CCC GTT ATG TCT CCA GGC TCA TCA GAT TAT ACT CTA 317  
Thr Arg Pro Val Met Ser Pro Gly Ser Ser Asp Tyr Thr Leu  
10 15 20

GAT ATC CGC ATG CCA GGA GTA ACT CCG ACA GAG TCG GAC ACA 359  
Asp Ile Arg Met Pro Gly Val Thr Pro Thr Glu Ser Asp Thr  
25 30 35

TAT TTG TGC AAG TCT TAC CGG CTG CCA GTG GAT GAT GAA GCC 401  
Tyr Leu Cys Lys Ser Tyr Arg Leu Pro Val Asp Asp Glu Ala  
40 45 50





REIVINDICAÇÕES:

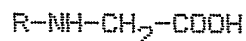
1ª - Processo para a produção de monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina, caracterizado pela cultura de células de insectos transfectadas com um baculovirus recombinante no qual foi inserido um DNA codificador de uma monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina para produzir a enzima.

2ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um baculovirus recombinante através da inserção de um fragmento de cDNA codificador de uma monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina num plasmideo de transferência compreendendo um gene de poliedrina para construir um vector de transferência rcombinante e inserção do referido fragmento de cDNA num genoma de baculovirus por recombinação homóloga.

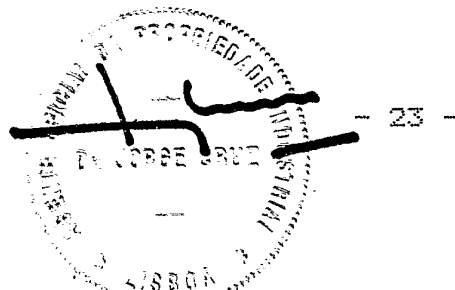
3ª - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o vector de transferência ser pACYM1 e o baculovirus ser o virus da poliedrose nuclear de Autographa californica (AcMNPV).

4ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina ser recuperada na forma purificada ou enriquecida.

5ª - Processo para a produção de um  $\alpha$ -hidroxilglicil-peptideo C-terminal caracterizado por compreender a conversão de um peptideo prolongado com glicina C-terminal da fórmula (I)



(I)



em que R representa um peptídeo e  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$  representa um resíduo glicina presente no extremo C do peptídeo R, num  $\alpha$ -hidroxiglicilpeptídeo da fórmula (II)



usando a enzima preparada por um processo de acordo com a reivindicação 1.

6ª - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o  $\alpha$ -hidroxiglicilpeptídeo ser calcitonina humana, calcitonina de salmão, calcitonina de galinha, calcitonina de enguia, calcitonina de rato, calcitonina bovina, calcitonina porcina, calcitonina ovina, factor de libertação da hormona de crescimento humana (GHRF), peptídeo relacionado com o gene da calcitonina humana (CGRP) ou hormona de libertação de hormona luteinizante (LHRH).

7ª - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o  $\alpha$ -hidroxiglicilpeptídeo ser calcitonina  $\alpha$ -hidroxiglicilada no extremo C.

8ª - Processo para a produção de um peptídeo  $\alpha$ -amidado no extremo C da fórmula  $\text{R}-\text{NH}_2$  (I) caracterizado por compreender a conversão de um peptídeo com  $\alpha$ -hidroxiglicil C-terminal da fórmula  $\text{R}:\text{NH}-\text{CHOH}-\text{COOH}$  (II) por tratamento com uma base.

9ª - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o material de partida da fórmula (II) ser obtido de acordo com o processo da reivindicação 5.



10a - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o material de partida da fórmula (II) ser calcitonina humana  $\alpha$ -hidroxilglicilada no extremo C.

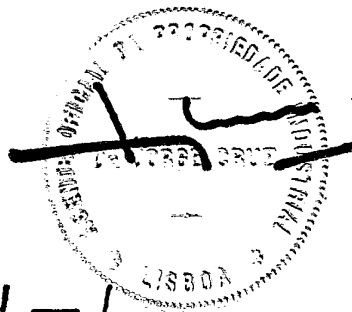
11a - Método para o ensaio da monoxigenase  $\alpha$ -hidroxilante de peptidilglicina, caracterizado por compreender os passos de:

- a) reacção de uma amostra a testar com um peptídeo substracto tendo um residuo de glicina no extremo C num meio de reacção tendo um valor de pH óptimo para a acção da enzima;
- b) aumento do valor de pH da mistura de reacção para pelo menos pH 10;
- c) neutralização do meio para um pH neutro;
- e
- d) determinação de uma quantidade de peptídeo amidado no extremo C formado.

Lisboa, 19 de Março de 1991

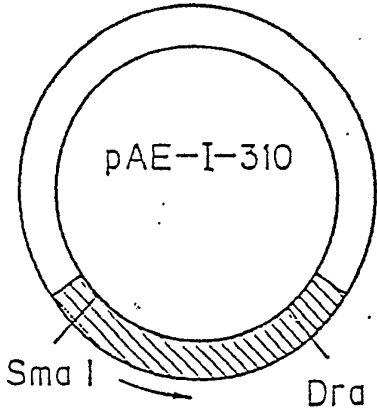
**J. PEREIRA DA CRUZ**  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º  
1200 LISBOA

1/5

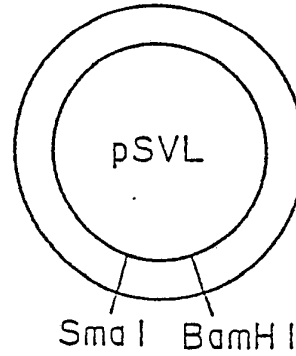


Vector de Clonagem  
Okayama-Berg

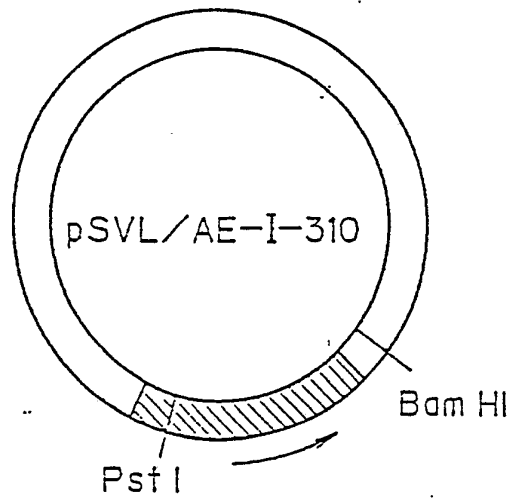
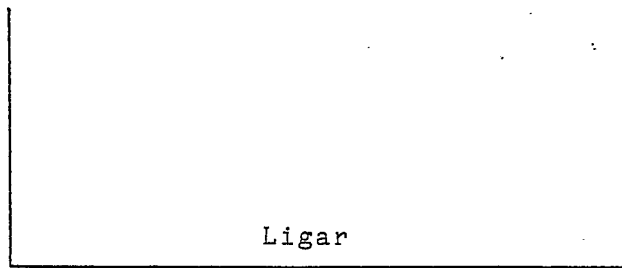
Fig. 1-1



Digerir com as enzimas  
de restrição Sma I e Dra I



Digerir com as enzimas de  
restrição Sma I  
Disfosforilação com fosfatase  
alcalina



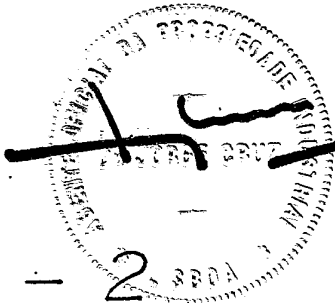
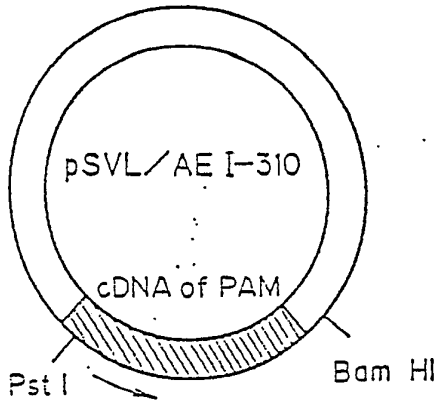
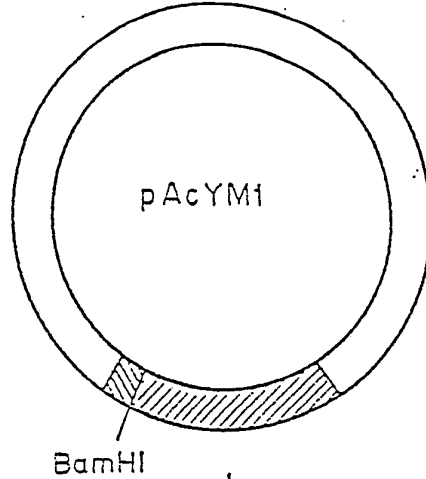


Fig. 1 - 2

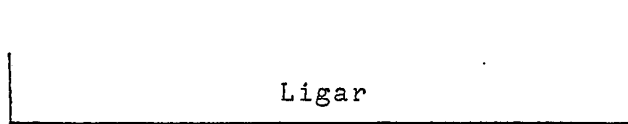
Vector de transferência para baculo-virus



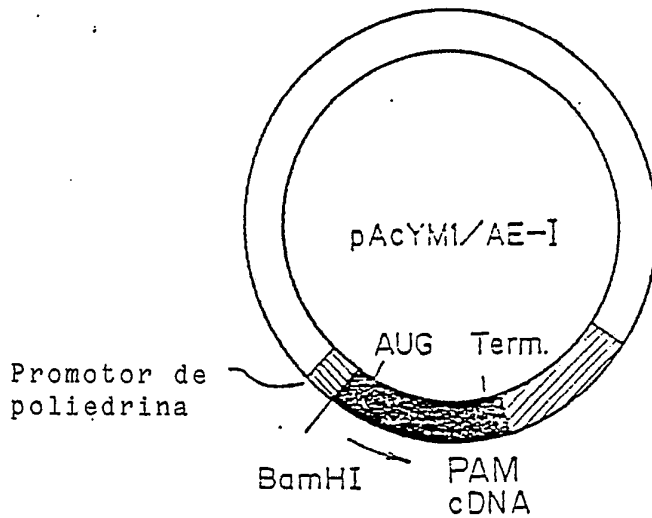
Digerir com as enzimas de restrição PstI e BamHI, preenchimento com DNA-polimerase de T4, ligar com adaptadores Bam HI, digerir com a enzima de restrição Bam HI



Digerir com a enzima de restrição Bam HI  
Desfosforilase com fosfatase alcalina



Vector de transferência recombinante para BV



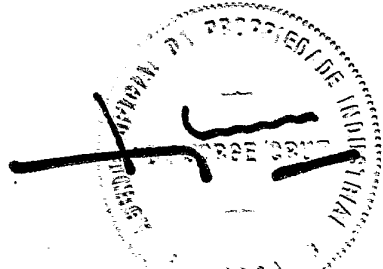
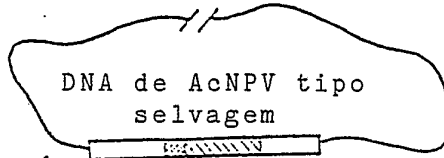
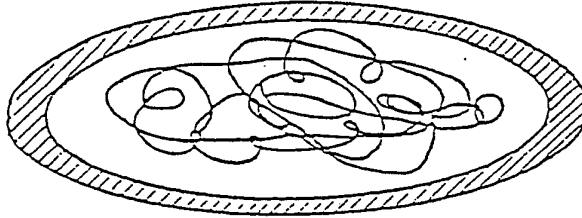
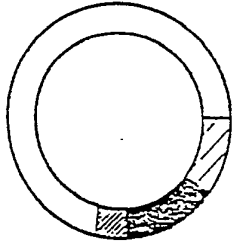


Fig. 2

Virus da poliedrose nuclear de Autografia Californica

pAcYM1/AE-I



Co-transfecção  
Células de insecto 4-5 dias de incubação  
Recombinação homóloga

Colher sobrenadante

Ensaio de placas

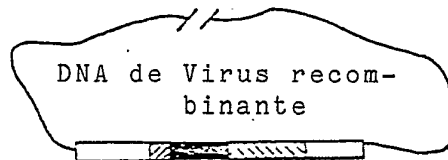
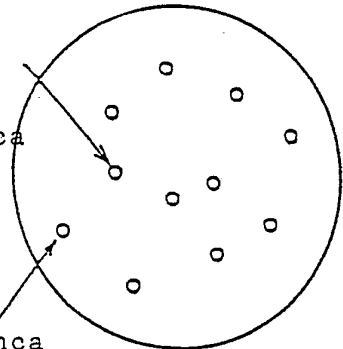
Poliedrina  
Negativa

Placa branca

Placa branca  
tipo selvagem

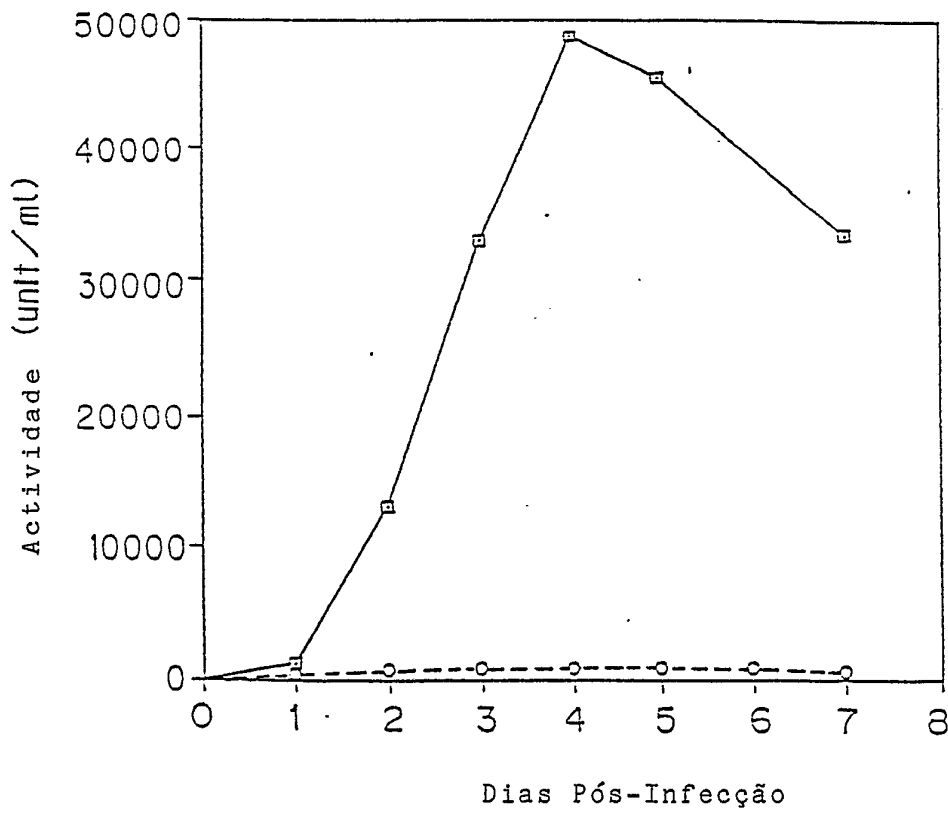
Isolamento de placas  
transfectante

Amplificação



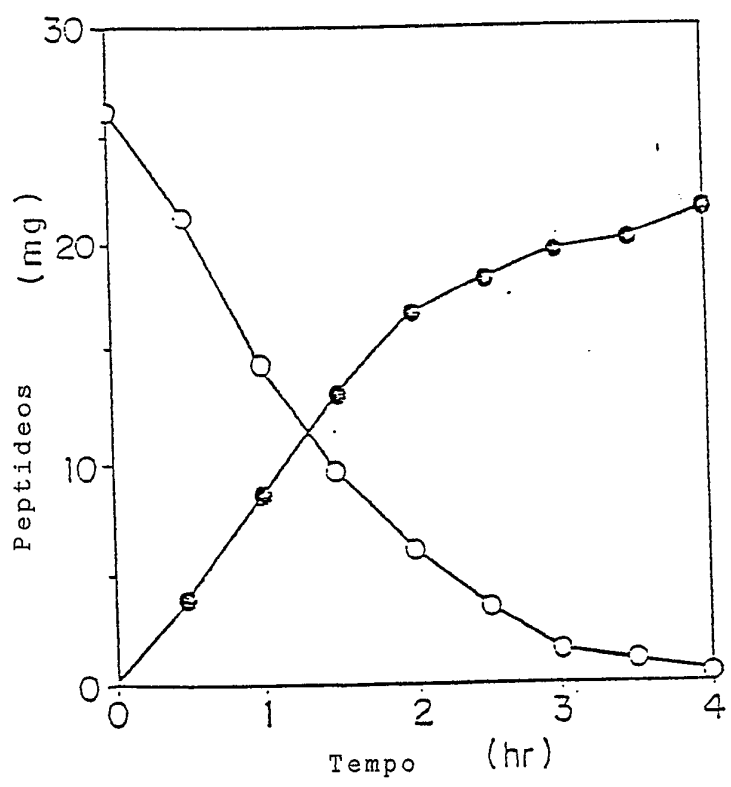
Promotor de poliedrina

Fig. 3



~~Handwritten signature or scribble~~

Fig. 4



—●— hCT  
—○— hCT-Gly