



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 951**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/605** (2006.01)  
**C07K 14/575** (2006.01)  
**A61K 38/22** (2006.01)  
**A61K 38/26** (2006.01)  
**C12N 15/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05850211 .3**  
96 Fecha de presentación : **18.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1819729**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de péptidos amidados carboxi-terminales.**

30 Prioridad: **01.12.2004 DE 10 2004 058 306**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.08.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.08.2009**

73 Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**  
**Brüningstrasse 50**  
**65929 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es: **Habermann, Paul;**  
**Decker, Heinrich;**  
**Lattemann, Claus;**  
**Maneg, Oliver;**  
**Salagnad, Christophe y**  
**Zocher, Frank**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 324 951 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

# ES 2 324 951 T3

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de péptidos amidados carboxi-terminales.

5 La presente invención se refiere a la producción de péptidos amidados carboxi terminales (terminal C), con lisina amidada en el terminal C, en particular con actividad biológica de GLP-1, a sus precursores químicos o biotecnológicos y a sus productos intermedios, a procedimientos de producción de los mismos, así como a sus usos para la preparación de productos farmacéuticos.

10 El número de personas que padecen diabetes u obesidad está aumentando con índices de crecimiento muy altos en todo el mundo. Es de esperar, por consiguiente, que los fármacos que presentan grandes ventajas terapéuticas en el campo de esta enfermedad deban estar disponibles aumentando la calidad y la cantidad.

15 La solicitud de patente US2004/0106547 A1 describe péptidos derivados de exendina, que a causa de su acción reductora del azúcar en sangre juegan un papel importante como posibles medicamentos en el tratamiento de la diabetes u otros trastornos metabólicos que pueden conducir, por ejemplo, a obesidad. En particular, a causa de su mecanismo fisiológico de acción, actualmente es de esperar que las secuelas diabéticas sean menos acusadas o muy retardadas.

20 Los péptidos descritos en el documento US2004/0106547 A1 se manifiestan particularmente activos a causa de la introducción de uno o más restos de lisina C-terminales, estando amidado en el terminal C en posición extrema.

25 Para la producción de estos péptidos se mencionan varios procedimientos de producción en el documento US2004/0106547 A1. Uno se refiere a un procedimiento biotecnológico, en el que, después de la expresión intracelular en levaduras, la proteína diana se aísla del producto de disgregación de la célula. Sin embargo, los péptidos que están amidados en el terminal C son formados solamente en trazas por microorganismos, de modo que la producción biotecnológica como la propuesta en US2004/0106547 A1 puede solamente efectuarse de forma muy laboriosa o sumamente costosa.

30 Como alternativa, la solicitud describe la síntesis química total de los péptidos en cuestión. Para esto se propone una síntesis de Merryfield modificada, que sin embargo es todavía muy laboriosa y está asociada a costes elevados. Entre las razones para esto está el hecho de que los aminoácidos utilizados para la síntesis deben en primer lugar producirse y purificarse, para a continuación, después de la modificación química, utilizarse específicamente en la síntesis de péptidos como reactivos. Los grupos protectores deben ser eliminados al final de la síntesis y el péptido o producto diana puede purificarse antes y formularse como producto farmacéutico. La síntesis química total es así factible con grandes costes, y con pocas ventajas ecológicas.

40 Las enzimas que son capaces de amidar péptidos en el terminal C se conocen ya desde hace tiempo. Estas enzimas se denominan (Eipper *et al. Mol. Endocrinol.* Nov. 1987; 1(11): 1987) enzimas alfa-amidantes de peptidilglicina (PAM). La producción y purificación de dichas enzimas PAM es conocida para los expertos en la materia y ha sido descrita con detalle: además, muchas de dichas preparaciones enzimáticas están disponibles en el mercado (p. ej. K Ohsuye *et al., Cytotechnology* 31, 1999: 85-94, documentos US 4708934, US 5789234, US 6255067, US 6319685 y JP 0177184).

45 Bradbury *et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) 112(2): 372-377 demostraron “*in vitro*” que PAM preferentemente reconoce como sustrato péptidos cuyo terminal C consiste en el aminoácido glicina. Asimismo ponen de manifiesto que los aminoácidos básicos en la posición N-terminal para la glicina retardan mucho la velocidad de reacción de las PAM.

50 Se ha descubierto ahora que los derivados de exendina con una secuencia C-terminal de aminoácidos básicos, en particular una secuencia de oligo- o poli-lisina, que lleva además un resto de glicina C-terminal, son reconocidos sorprendentemente bien como sustratos por PAM.

55 Así sorprendentemente, según la invención, se hace posible la producción biotecnológica de péptidos amidados a un coste considerablemente inferior, en particular de los péptidos amidados como se describen en el documento US2004/0106547 A1, por lo que el producto deseado puede prepararse mediante una sola etapa enzimática a partir de su péptido/proteína precursor(a) alargada glicina con terminal C.

60 En el procedimiento según la invención se producen péptidos biológicamente activos que contienen uno o más aminoácidos básicos, preferentemente restos de lisina, histidina y/o arginina, en particular restos de lisina con un resto de lisina C terminal, en los que el último resto de lisina C-terminal está amidado en el terminal C. Preferentemente, los péptidos producidos por el procedimiento según la invención presentan la actividad biológica de GLP-1, exendina-4 o de sus análogos o derivados biológicamente activos.

65



## ES 2 324 951 T3

de fusión puede hacerse reaccionar directamente con PAM, antes de que sea procesada química o enzimáticamente a la proteína diana deseada, o es - en orden inverso - en primer lugar escindida en los fragmentos de fusión, antes de que tenga lugar la amidación por reacción con PAM. Si se selecciona una estrategia de fusión, entonces es evidente para cualquier persona experta en la materia que los participantes en la fusión deben estar unidos por un elemento enlazador que permita la escisión de los acompañantes de tal manera que el terminal N del péptido diana Lys-X<sub>m</sub>-Gly prolongado esté presente de manera correcta después del tratamiento. Existen muchas opciones para el diseño del elemento enlazador. Por ejemplo, si se elige el aminoácido metionina, entonces es posible la escisión química con haluro de cianógeno. Por ejemplo, si se elige un pentapéptido de la secuencia DDDDK como elemento enlazador, entonces es posible la escisión con enterocinasa. Si, por ejemplo, se selecciona la secuencia del tetrapéptido IEGR, entonces puede efectuarse la escisión mediante el factor Xa. Con un diseño apropiado, puede utilizarse Genenase® como enzima de tratamiento para péptidos cuyos terminales N comienzan con histidina. En los ejemplos del apartado siguiente, se describe la escisión utilizando enterocinasa.

Alternativamente, sin embargo, si es compatible con la exportación, el péptido diana puede liberarse en el medio ya sea en forma de una proteína de fusión, o directamente en forma natural. Para esto, pueden utilizarse células modificadas por ingeniería genética, en particular de microorganismos, preferentemente bacterias o levaduras. Si se seleccionan células bacterianas como sistema de expresión, existe también la opción de liberación en el periplasma o en el medio de cultivo de la proteína diana directamente o una proteína de fusión correspondiente que contiene la proteína diana.

Organismos hospedadores y métodos en principio disponibles para esto son conocidos por cualquier persona experta en la materia. Éstos están en gran medida también disponibles en el comercio, procedentes de muchos suministradores. Como ejemplos típicos, pueden mencionarse las firmas New England Biolabs, Invitrogen y Roche. En las descripciones del catálogo de dichas firmas, existen referencias de la bibliografía que proporcionan visión de conjunto de la tecnología.

Sin embargo es asimismo evidente para cualquier persona experta en la materia que la gama de microorganismos que pasan a utilizarse se está ampliando constantemente, como es el repertorio de los métodos biotecnológicos. Realizaciones especializadas a este respecto están asimismo cubiertas por el objeto de la presente invención.

Típicamente a modo de ejemplo se mencionan los siguientes sistemas hospedador/vector: bacterias del tipo de *E. coli*, *S. carnosus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas* así como levaduras del tipo de *K. lactis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae*.

A continuación, a modo de ejemplo, se describe la utilización de sistemas basados en *E. coli* K12 y *E. coli* B. Cualquier persona experta en la materia es consciente sin embargo de que estos sistemas, mencionados a modo de ejemplo ofrecen un gran número de posibilidades de variación que surgen, por ejemplo, de la elección de promotores adecuados u otras secuencias de ácidos nucleicos reguladoras, las propiedades genéticas de la célula huésped y de los vectores utilizados (p. ej. el número de copias de ADN, los medios de selección, etc.). Es además evidente para la persona experta en la materia que los ejemplos prácticos descritos en el texto representan únicamente una selección muy pequeña en relación con las posibilidades actualmente realizables.

Una alternativa a la amidación "in vitro" utilizando PAM surge cuando la enzima es coexpresada con la proteína precursora que se ha de amidar en una y la misma célula huésped. Esto se consigue introduciendo en la célula huésped la secuencia del gen que codifica una actividad de PAM bajo el control de una secuencia reguladora específica para el huésped. Esta secuencia de expresión puede ser incorporada de manera estable en la secuencia de ADN cromosómico en cuestión, o puede estar presente en un segundo plásmido en paralelo al plásmido de expresión para la proteína diana, o se puede integrar como segunda casete de expresión en uno y el mismo vector, o incluso se puede clonar en una unidad de expresión policistronica en fase con la secuencia del gen que codifica la proteína diana bajo el control de la misma secuencia activadora.

La presente invención incluye así procedimientos biotecnológicos para la producción de péptidos de fórmula I o de sus derivados, los cuales presentan al menos el 60%, preferentemente al menos el 80%, en particular al menos el 90% de homología con la fórmula I.

Los procedimientos según la invención se caracterizan porque se producen organismos recombinantes que sintetizan un precursor del péptido que a continuación puede convertirse en un péptido correspondiente a la fórmula I en presencia de una enzima directamente o mediante enlace con uno o más aminoácidos básicos o sus derivados en orden, preferentemente restos de lisina, histidina y/o arginina en serie, en particular lisina, en la que la secuencia está amidada en el terminal C.

Son objetos adicionales de la invención asimismo los usos de los compuestos de fórmula I o los péptidos amidados en el terminal C de fórmula II según la invención, que han sido producidos por el procedimiento según la invención, en particular los compuestos según la Seq. ID. n° 1 o n° 2, para la preparación de un producto farmacéutico o una formulación farmacéutica, preferentemente para el tratamiento de trastornos del metabolismo de los carbohidratos, en particular preferentemente para el tratamiento de la diabetes mellitus.

## ES 2 324 951 T3

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

5 *Síntesis de una secuencia de ADN específica para E. coli que codifica AVE<sub>1-44</sub>-Gly*

En primer lugar se preparó la secuencia génica Seq. ID. n° 3 que codifica el péptido AVE<sub>1-44</sub>-Gly (Seq. ID. n° 2):

10 Seq. ID. n° 3:

TTTTTTAAGCTTG CACGGTGAAG GTACCTTCAC CTCCGACCTG TCCAAACAGA  
TGGAAGAAGA AGCTGTTCTG CTGTTTCATCG AATGGCTGAA AAACGGTGGT  
15 CCGTCCTCCG GTGCTCCGCC TTCGAAAAAG AAGAAAAAGA AAGGT TGATA  
ATAGCATGCA CGTGCGGCCG CACCTGGTCTGA CGAATTCAAA AAAA

20 Se efectuó la síntesis de la secuencia génica utilizando tecnología PCR. Para ello, se sintetizaron los 5 cebadores siguientes por síntesis química de ADN. Esta síntesis se efectuó utilizando el sistema de síntesis de ADN Expedite™.

25 a) El cebador zp5u tiene la secuencia (Seq. ID n° 4):

**5'- TTTTTTAAGC TTGCACGGTG AAG -3'**

La Seq. ID n° 4 comprende la zona 1-23 de la cadena sentido ("sense").

30 b) El cebador zp3a tiene la secuencia (Seq. ID. n° 5):

**5'-CTTCCATCTG TTTGGACAGG TCGGAGGTGA AGGTACCTTC  
35 ACCGTGCAAG CTTAAAAAA-3'**

La Seq. ID. n° 5 comprende la zona 1-59 de la cadena complementaria (antisentido - "antisense").

40 c) El cebador zp3b tiene la secuencia (Seq. ID. n° 6):

**5'- GGACGGACCA CCGTTTTTCA GCCATTGAT GAACAGACGA  
45 ACAGCTTCTT CTTCCATCTG TTTGGACAG -3'**

La Seq. ID. n° 6 comprende la zona 40-108 de la cadena complementaria (antisentido - "antisense").

50 d) El cebador zp3c tiene la secuencia (Seq. ID. n° 7):

**5- GTGCATGCTA TTATCAACCT TTCTTTTTCT TCTTTTTCGA  
55 AGGCGGAGCACCGGAGGACG GACCACCGTT TTTC -3'**

La Seq. ID. n° 7 comprende la zona 91-164 de la cadena complementaria (antisentido - "antisense").

60 e) El cebador zp3d tiene la secuencia (Seq. ID. n° 8):

**5'- TTTTTTGAAT TCGTCGACCA GGTGCGGCCG CACGTGCATG  
65 CTATTATCAA CCTT -3'**

La Seq. ID. n° 8 comprende la zona 144-197 de la cadena complementaria (antisentido - "antisense").

## ES 2 324 951 T3

Utilizando los cebadores, se llevaron a cabo consecutivamente 4 reacciones PCR en condiciones estándar a 54°C. En la reacción 1, se utilizaron 100 ng de cada uno de los cebadores zp3a y zp5u. El número de ciclos de PCR fue 5. En la segunda reacción, 1/40 de la reacción se trató con 100 ng de cada uno de los cebadores zp5u y zp3b en 10 ciclos. En la reacción 3, 1/40 del producto de la reacción 2 se trató con 100 ng de cada uno de los cebadores zp5u y zp3c en 10 ciclos adicionales. Por último, se sintetizó el fragmento de ADN deseado en 25 ciclos de PCR con 1/40 del producto de la reacción 3 y los cebadores zp5u y zp3d, y se verificó su longitud por electroforesis en gel. El fragmento de ADN deseado se purificó y se hizo reaccionar con las enzimas de restricción EcoR1 y a continuación con Hind3 de acuerdo con la información del fabricante (New England Biolabs).

En paralelo, ADN del plásmido pUC19 (New England Biolabs) se trató con las enzimas EcoR1 y Hind3. Los fragmentos de las mezclas de la escisión se separaron mediante un gel de agarosa al 1,2% y luego se aislaron el fragmento de pUC19 y el producto deseado a partir de la reacción 4. Los fragmentos purificados se ligaron en una reacción de T4 ligasa a 16°C durante una noche. A continuación, células de *E. coli* competentes (Stratagene, cepa XL10 Gold de *E. coli*) se transformaron con la mezcla de ligadura y se extendieron en placas sobre agar-agar que contenían 25 mg/l de ampicilina. El ADN del plásmido se aisló a partir de los clones individuales y se caracterizó mediante el análisis de la secuencia de ADN.

El ADN plásmido del fragmento deseado se denominó pSCHPUCZP10. Se utilizó como material de partida para la producción de vectores de expresión para la síntesis de péptidos precursores según la invención en células K12 de *E. coli*.

### Ejemplo 2

*Construcción de los vectores de expresión que codifican el péptido precursor AVE<sub>1-44</sub>-Gly*

Para la producción del péptido AVE<sub>1-44</sub>-Gly, se introdujo la secuencia de codificación en el vector pThioHisA de la firma Invitrogen (Catálogo nº K360-01). Se formó una proteína de fusión que comprende tiorredoxina, que está ligada al péptido precursor AVE<sub>1-44</sub>-Gly por la secuencia DDDDK de reconocimiento de la enterocinasa. Mediante reacción con enterocinasa (Invitrogen), se liberó AVE<sub>1-44</sub>-Gly y puede convertirse a continuación en la proteína diana AVE<sub>1-44</sub>-NH<sub>2</sub> de acuerdo con el Ejemplo 7 (a continuación) en presencia de PAM (Wako Pure Chemicals Ind. Ltd.).

Se sintetizaron dos cebadores con las siguiente secuencia:

Cebador Zp\_thiohisf con una secuencia de escisión BamH1 (Seq. ID. nº 9):

**5'- TTTTTTGGAT CCGGTGATGA CGATGACAAG CACGGTGAAG GTACCTTC-3'**

Cebador Zp\_thiohisrev con una secuencia de escisión EcoR1 (Seq. ID. nº 10):

**5' - TTTTTTGAAT TCGTCGACCA GGTGC -3'**

Los cebadores Zp\_thiohisf y ZP\_thiohisrev se utilizaron en una reacción PCR en condiciones normales con ADN pSCHPUCZP10 como plantilla. Se produjo un fragmento de PCR, que después de la escisión con las enzimas BamH1 y EcoR1 se insertó directamente en el vector pTHIOHisA, se abrió igualmente con BamH1 y EcoR1, en una reacción con T4 ligasa. Células BL21 de *E. coli* competentes se transformaron con la mezcla de ligadura y se extendieron en placas en agar-agar selectivo que contenía 25 mg/l de ampicilina. El ADN plásmido se volvió a aislar a partir de algunos clones y se analizó por PCR y subsiguiente análisis de la secuencia de ADN. En los clones positivos deseados, que se denominaron pTHIOHisAZP10-Gly, se comprobó de manera análoga la expresión de la proteína de fusión de acuerdo con el ejemplo 14 de la patente US 5.496.924. Basándose en los análisis de expresión positivos, se seleccionó un clon y fermentó para la producción de cantidades mayores de material. La proteína de fusión formada contiene tiorredoxina, que está ligada a AVE<sub>1-44</sub>-Gly mediante una secuencia de reconocimiento de enterocinasa. (Seq. ID. nº 12).

El documento US 5.496.924 propone un sistema de expresión que, básicamente, permite la producción de proteínas de fusión hechas a medida. La ventaja del sistema se basa en el hecho de que pueden producirse proteínas de fusión con un contenido indigestible pequeño. Si los segmentos A-B de la secuencia se fusionan con AVE<sub>1-44</sub>-Gly mediante la secuencia DDDDK de reconocimiento de enterocinasa, entonces se obtiene una proteína de fusión con el gen y la secuencia de aminoácidos (Seq. ID. nº 11 y nº 12) siguientes:

## ES 2 324 951 T3

Seq. ID. nº 11:

5       GGAAACAGAATTC ATGGCGCCGA CCTCTTCTTC TACCAAAAAG CTCAACTGC  
      AACTGGAACA CCTGCTGCTG GACCTGCAGA TGATCCTGAA CGGTATCAAC  
      AACTACAAAA ACCCGAAACT GACGCGTATC GACGATGACG ATAAACACGG  
10       TGAAGGTACC TTCACCTCCG ACCTGTCCAA ACAGATGGAA GAAGAAGCTG  
      TTCGTCTGTT CATCGAATGG CTGAAAACG GTGGTCCGTC CTCCGGTGCT  
      CCGCCTTCGA AAAAGAAGAA AAAGAAAGGT TGATAATAGC ATGCACGTGC  
15       GGCCGCAAGC TTAATAAA

Seq. ID. nº 12:

20       MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRI DDDDKHGEGT  
      FTSDLKQME EEAURLFIEW LKNGGPSSGA PPSKKKKKKK

Se efectuó la preparación de la secuencia génica de codificación por tecnología PCR. Para ello se sintetizaron los siguientes cebadores:

30       1) Cebador psw3\_zpcolf (Seq. ID. nº 13):

35       **5'- CGTATCGACG ATGACGATAA ACACGGTGAA GGTACCTTC -3'**

La secuencia del cebador cubre de esta manera el sitio de reconocimiento de enterocinasa y el comienzo de la secuencia codificadora de AVE<sub>1-44</sub>-Gly.

40       2) Cebador psw3\_zpcolrev (Seq. ID. nº 14):

45       **5'- GTGTTTATCG TCATCGTCGA TACGCGTCAG TTTCGG -3'**

La secuencia corresponde de este modo a la secuencia de interleucina-2 sintética que según la Tabla 1 del documento US 5.496.924 abarca los aminoácidos 34-38 así como 2/3 del codón para el aminoácido metionina. El resto de la secuencia de cebador se solapa con el cebador psw3\_zpcolf.

50       3) pBprimef1 (Seq. ID. nº 15):

55       **5' - TGAGCGGATA ACAATTTAC AC -3'**

El cebador se hibrida aguas arriba con la secuencia de escisión EcoR1 que está contenida en el plásmido pK50 (Figura 33 del documento US 5.496.924).

60       4) psw3\_zp10colrev con la secuencia de escisión Hind3 (Seq. ID. nº 16):

65       **5' - TTTTTTAAGC TTGCGGCCGC ACGTGCATGC TATTATCAAC CTTC- 3'**

Se llevaron a cabo dos PCR en paralelo. Una se llevó a cabo en ADN del plásmido pK50 con el par de cebadores pBprimef1 y psw3\_zpcolrev a 50°C y la otra reacción con el par de cebadores psw3\_zpcolf y psw3\_zp10colrev a 54°C en ADN del plásmido pTHIOHisAZP10-Gly. Los productos de la PCR se purificaron después de la separación por electroforesis en gel, una alícuota de cada uno se mezcló en una proporción 1:1 y luego se hicieron reaccionar en una tercera PCR con el par de cebadores pBprimef1 y psw3\_zp10colrev. El producto de la PCR se trató con las enzimas EcoR1 y Hind3 y se insertó en el plásmido pK50, se abrió en paralelo con estas enzimas, en una reacción

## ES 2 324 951 T3

con T4 ligasa. Células BL21 de *E. coli* competentes se transformaron con la mezcla de ligadura y se extendieron en placas en agar-agar selectivo que contenía 25 mg/l de ampicilina. El ADN del plásmido se volvió a aislar a partir de algunos clones y se analizó mediante PCR y subsiguiente análisis de la secuencia de ADN. Los clones positivos se denominaron pBZP100 y se comprobó la expresión de la proteína de fusión.

Los productos de expresión se analizaron por espectrometría de masas y por SDS-PAGE, y el terminal N se determinó por análisis de la secuencia de proteínas. Se seleccionó un clon adecuado para la fermentación de mayores cantidades de material.

### Ejemplo 3

#### *Fermentación de las cepas construidas en el Ejemplo 2*

Células BL21 de *E. coli* transformadas con diferentes vectores de plásmidos que codifican derivados del péptido diana (proteína de fusión) se cultivaron en un fermentador en medio de sal mineral o medio complejo (véase el Ejemplo 1) a 30°C o 37°C y un valor del pH de 7,0. El ajuste de pH se efectuó utilizando una solución de  $\text{NH}_4^+$  (al 26% en agua). La aireación del cultivo se aseguró mediante una estrategia de control que mantuvo el oxígeno disuelto en el caldo de cultivo constante en el 30%. Para los procesos discontinuos de alimentación en medio salino mineral, se alimentó una solución de glucosa (60% p/v) en (8 g/l/h a 26 g/l/h) después de la terminación de la fase discontinua. La inducción de la expresión proteica se efectuó mediante la adición de IPTG (concentración final (c.f.) 1-4 mM). La duración de la inducción fue de 6 a 8 h. La expresión de las proteínas diana se detectó por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

La expresión de AVE<sub>1-44</sub>-Gly(-proteína de fusión) en BL21 de *E. coli*/pBZP100 se realizó como se describe a continuación:

Se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  de suspensión celular de un cultivo permanente de células BL21 de *E. coli* almacenadas a -80°C, y se incubaron durante 10-16 h con agitación a 37°C en 0,5 l de medio de precultivo. El cultivo principal en el fermentador se inoculó a una densidad de inoculación de 0,01 a 0,05 D.O.<sub>600</sub> con la cantidad de precultivo apropiada.

Medio de precultivo:

5 g/l de triptona Bacto

10 g/l de extracto de levadura

5 g/l de NaCl

Medio del cultivo principal:

Medio de sales minerales definidas (medio mínimo) a base de glucosa como fuente de carbono (Jeffrey H. Miller: Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)).

Después del consumo de la glucosa inicialmente presente en el medio de cultivo principal, se alimentó una solución de glucosa. La expresión de la proteína se indujo mediante adición de IPTG (c.f. 1 mM), y se observó la expresión máxima de la proteína de fusión después de la inducción.

Utilizando por ejemplo el sistema analítico SDS-PAGE de la firma Novex (sistema NuPage® Novex en gel al 12%, Invitrogen™), se analizaron las fracciones de 0,02 D.O.<sub>600nm</sub> de la suspensión celular, que se habían extraído del fermentador a diferentes tiempos de cultivo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Ejemplo 4

#### *Purificación de la proteína de fusión*

##### *Aislamiento de la proteína de fusión BZP-AVE<sub>1-44</sub>-Gly*

200 g de biomasa de la cepa recombinante de *E. coli* se volvieron a poner en suspensión en 300 ml de tampón Tris (Tris 50 mM/HCl, pH 7,4; EDTA 1 mM). Se llevó a cabo la disgregación celular por doble homogeneización a alta presión (homogeneizador Rannie a alta presión, 1000 bares). Se eliminaron los componentes insolubles en el homogeneizado por centrifugación. Se filtró a presión el sobrenadante (filtro Sartorius de 0,22  $\mu\text{m}$ , Tipo 111) y se aplicó sobre una columna de cromatografía (Source S, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con tampón (Tris 50 mM/HCl pH 7,3; EDTA 1 mM). Una vez se ha aplicado la muestra, se efectuó una etapa de lavado con tampón de equilibrio (2 volúmenes de columna), seguido de una etapa de lavado adicional con tampón con alto contenido en sales al 10% (Tris 50 mM/HCl pH 7,3; NaCl 1 M, EDTA 1 mM). El fraccionamiento se efectuó por aplicación de

## ES 2 324 951 T3

un gradiente salino utilizando tampón con alto contenido en sales sobre 5 volúmenes de columna. El contenido en proteína de fusión de las fracciones individuales fue analizado por electroforesis en gel de SDS (sistema NuPage® Novex de gel al 12%, Invitrogen). Las fracciones que contienen proteína de fusión se combinaron y se concentraron entre 5 y 10 veces (corte de la membrana de 10 kDa en una celda de ultrafiltración Millipore). El concentrado se utilizó directamente para la reacción de escisión de la proteasa mediante intercambio de tampón en tampón de enterocinasa (Tris 50 mM/HCl pH 7,4; NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM), o se purificó más por filtración en gel (Superdex 75, Amersham Biosciences) antes de la reacción de escisión.

La escisión de las proteínas de fusión se efectuó con enterocinasa (Invitrogen) en tampón de enterocinasa (Tris 20 mM/HCl, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7,4) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Ejemplo 5

#### 15 *Purificación de una proteína de fusión tiorredoxina que contiene la Seq. ID. n° 3*

200 g de biomasa de una cepa recombinante de *E. coli* se volvieron a poner en suspensión en tampón Tris 50 mM (pH 7,4; EDTA 1 mM). Se llevó a cabo la disgregación celular por doble homogeneización a alta presión (homogeneizador Rannie a alta presión, 1000 bares). Se eliminaron los componentes insolubles en el homogeneizado por centrifugación. Se filtró a presión el sobrenadante (filtro Sartorius de 0,22  $\mu$ m, Tipo 111) y se aplicó sobre una columna de cromatografía (Source Q, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con tampón (Tris 50 mM/HCl pH 7,4; EDTA) 1 mM. Una vez se ha aplicado la muestra, se efectuó una etapa de lavado con tampón de equilibrado (2 volúmenes de columna), y se efectuó el fraccionamiento mediante aplicación de un gradiente salino utilizando un tampón con alto contenido en sales (Tris 50 mM/HCl pH 7,4; NaCl 0,3 M, EDTA 1 mM) sobre 6 volúmenes de columna. El contenido en proteína de fusión de las fracciones individuales fue analizado por electroforesis en gel de SDS (sistema NuPage® Novex de gel al 12%, Invitrogen™). Las fracciones que contienen proteína de fusión se combinaron y se concentraron 5 a 10 veces (corte de la membrana de 10 kDa en una celda de ultrafiltración Millipore). El concentrado se fraccionó más por cromatografía de filtración en gel (Superdex 75, Amersham Biosciences). Una columna previamente equilibrada (Tris 50 mM/HCl pH 7,4; NaCl 200 mM) se cargó con hasta 5% del volumen de columna con solución concentrada de proteína de fusión. La elución se efectúa enjuagando con tampón de equilibrado. El contenido en proteína de fusión de las fracciones individuales fue analizado de nuevo por electroforesis en gel de SDS (sistema NuPage® Novex de gel al 12%, Invitrogen™). Las fracciones pertinentes se combinaron, se concentraron hasta aprox. 5 mg/ml (concentradores Vivaspín con un corte de 10 kD, Vivascience) e intercambio de tampón en tampón de enterocinasa (Tris 20 mM/HCl pH 7,4; NaCl 50 mM) se efectuó por medio de unidades de diafiltración (Vivascience).

El tratamiento de la etapa precursora a AVE<sub>1-44</sub>-Gly se efectuó a continuación utilizando enterocinasa de modo análogo al Ejemplo 4.

### Ejemplo 6

#### *Separación de los productos de escisión procedentes de la reacción de escisión mediante enterocinasa*

Después de la escisión de las proteínas de fusión utilizando enterocinasa, se separaron los productos de escisión uno de otro mediante cromatografía de intercambio iónico (Source 30S, Amersham Biosciences) La fuerza iónica de la solución se ajustó a aprox. 10 mS/cm mediante adición de cloruro de sodio. Después de la aplicación de la solución de proteínas sobre la columna previamente equilibrada (Tris 20 mM/HCl, pH 7,4; ajustada con NaCl a una conductividad de aprox. 10 mS/cm), el material no ligado se separó con tampón (Tris 20 mM/HCl, pH 7,4; ajustado con NaCl hasta una conductividad de aprox. 10 mS/cm). La elución del péptido AVE<sub>1-44</sub>-Gly se efectuó por aplicación de un gradiente a NaCl 500 mM sobre 10 volúmenes de columna.

La identificación de las fracciones que contienen AVE<sub>1-44</sub> o las etapas precursoras a AVE<sub>1-44</sub> se efectuó por electroforesis en gel de SDS, HPLC y espectrometría de masas. Se combinaron las fracciones apropiadas y se liofilizaron después de la eliminación del disolvente orgánico.

Por último, para confirmar la secuencia de aminoácidos, la AVE<sub>1-44</sub>-Gly aislada se secuenció totalmente por la vía Edman.

### Ejemplo 7

#### *Conversión de AVE<sub>1-44</sub>-Gly en AVE<sub>1-44</sub>-NH<sub>2</sub>*

La reacción se llevó a cabo utilizando la enzima PAM (enzima amidante peptidil-glicina de Wako Pure Chemicals Ind., Ltd. (n° de pedido 161-16971)) de acuerdo con las instrucciones del fabricante referentes a las condiciones de reacción.

## ES 2 324 951 T3

Se preparó la disolución siguiente:

CuSO<sub>4</sub> 1 μM

5 KI 5 mM

ascorbato de Na 3 mM

10 230 U/ml de catalasa (bovina, Fluka)

600 U/ml de PAM (Wako Chemicals)

Tris 0,1 M/HCl pH 7,0 con Triton X-100 al 0,001%

15 La solución se preincubó durante 1 h a 37°C y a continuación se añadió la solución de la proteína AVE<sub>1-44</sub>Gly (Tris/HCl pH 7,0, concentración final 80 μg/ml). Después, la mezcla de reacción se incubó más a 37°C. El curso de la reacción fue seguido por la toma de muestras en diferentes tiempos. A conversión máxima, la reacción se interrumpió por adición de una solución de EDTA 50 mM.

20 La mezcla de reacción se separó a continuación por cromatografía de intercambio de iones (Firma Shodex, columna tipo IEC CM-825 (8 x 75 mm)). el siguiente gradiente se aplicó a esta columna:

Eluyente A - tampón fosfato 40 mmol pH 7 + acetonitrilo al 20%

25 Eluyente B - tampón fosfato 50 mmol pH 7 + NaCl 1 M

La columna se operó a temperatura ambiente con un caudal a través de 2 ml/min ó 1 ml/min.

30 Se recogieron las fracciones eluidas (detección a 280 nm) y se determinó la masa del péptido oportuno por MALDI-MS. Los análisis espectrométricos de masas se realizaron con un instrumento del tipo Reflex IV de BRUKER. Las muestras se utilizaron directamente para el análisis MALDI-MS, o se diluyeron a una concentración de aprox. 50 pmol/μl con TAAq al 50% ([1+1] TFA al 0,1% + acetonitrilo al 50%).

35 Se confirmó la masa esperada para AVE<sub>1-44</sub>-NH<sub>2</sub>. El producto obtenido puede suministrarse para utilización farmacéutica adicional.

40 Las formulaciones farmacéuticas en lo sucesivo pueden producirse de manera conocida por una persona experta en la materia mediante la adición de aditivos de la formulación farmacéutica adecuada al péptido o derivado del péptido biológicamente activo.

45

50

55

60

65

# ES 2 324 951 T3

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de péptidos amidados en el terminal C de fórmula general II

5



en la que

10

AS significa uno o más aminoácidos genéticamente codificables;

n es de 5 a 2000, preferentemente de 10 a 1000, en particular 15 a 500, muy especialmente preferentemente de 20 a 400; y

15

(AS)<sub>n</sub> y/o (AS)<sub>n</sub>-X<sub>m</sub> significa preferentemente un péptido o proteína biológicamente activo,

X significa uno o más aminoácidos básicos o uno de sus derivados,

20

preferentemente lisina, histidina y/o arginina, en particular lisina;

m es de 1 a 15, preferentemente de 3 a 10, en particular de 6 a 8; y

n y m significan números enteros y

25

en la que

a) células huésped se cultivan en un medio nutriente adecuado,

30

b) se expresa un compuesto de fórmula general I:



35

en la que

Y significa uno o más aminoácidos con carga neutra, preferentemente glicina, p es de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5, en particular 1;

40

a) opcionalmente el compuesto de la fórmula I se libera de un péptido precursor adecuado por escisión enzimática o química;

b) los productos de expresión de la etapa b) o los productos intermedios de la etapa c), eventualmente después de una etapa de purificación, se hacen reaccionar con una enzima alfa-amidante (PAM); y

45

c) el péptido amidado en el terminal C de la fórmula general II se purifica de manera adecuada, preferentemente por un método cromatográfico preparativo.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de la fórmula I está definido por la Seq. ID. nº 2, así como sus derivados biológicamente activos con una homología de al menos el 60%.

50

3. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 1-2, en el que el compuesto de la fórmula I se libera de péptidos precursores adecuados por escisión enzimática.

55

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el compuesto de la fórmula I se libera de péptidos precursores adecuados por medio de la enzima enterocinasa.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, para la preparación de un compuesto de la fórmula I que está definido por la secuencia Seq. ID. nº 1.

60

65

# ES 2 324 951 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Aventis Pharma Deutschland GmbH
- 5 <120> Procedimiento para la producción de péptidos amidados carboxi terminales con efecto de GLP1
- <130> DEAV2004/0076
- 10 <140>  
<141>
- <160> 16
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 20 <211> 44  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido MOD\_RES K44
- <400> 1
- 30 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15  
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
35 20 25 30  
Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys  
35 40
- 40 <210> 2  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- 50 <400> 2
- His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15  
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
55 20 25 30  
Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Gly  
35 40 45
- 60 <210> 3  
<211> 198  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>

## ES 2 324 951 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN

<400> 3

```
5      ttttttaagc ttgcacggtg aaggtacctt cacctccgac ctgtccaaac agatggaaga 60
      agaagctggt cgtctgttca tcgaatggct gaaaaacggt ggtccgtcct ccggtgctcc 120
      gccttcgaaa aagaagaaa agaaaggttg ataatagcat gcacgtgcgg ccgcacctgg 180
      tcgacgaatt caaaaaaa 198
```

<210> 4

10 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

20 <400> 4

```
      tttttaagc ttgcacggtg aag          23
```

<210> 5

<211> 59

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

35 <400> 5

```
      ctccatctg ttggacagg tcggaggiga aggtaccttc accgtgcaag cttaaaaaa 59
```

<210> 6

<211> 69

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 6

```
50      ggacggacca ccgtttttca gccattcgat gaacagacga acagcttctt ctccatctg 60
      tttggacag 69
```

<210> 7

<211> 74

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 7

```
65      gtgcatgcta ttatcaacct ttctttttct tctttttcga aggcggagca ccggaggacg 60
      gaccaccgtt tttc 74
```

<210> 8

## ES 2 324 951 T3

<211> 54  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

10 <400> 8  
**tttttgaat tcgtcgacca ggtgcggccg cacgtgatg ctattatcaa cct** **54**

<210> 9  
15 <211> 48  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 9  
25 **tttttggat ccggtgatga cgatgacaag cacggtgaag gtaccttc** **48**

<210> 10  
30 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 10  
40 **tttttgaat tcgtcgacca ggtgc** **25**

<210> 11  
<211> 321  
45 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 11  
55 **ggaacagaa ttcattggcgc cgacctcttc ttctaccaaa aagactcaac tgcaactgga 60**  
**acacctgctg ctggacctgc agatgatcct gaacggtatc acaactaca aaaacccgaa 120**  
**actgacgcgt atcgacgatg acgataaaca cgggtgaagg accttcacct ccgacctgtc 180**  
**caaacagatg gaagaagaag ctgttcgtct gttcatcgaa tggctgaaaa acggtggtcc 240**  
**gtcctccggt gctccgcctt cgaaaaagaa gaaaaagaaa gtttgataat agcatgcacg 300**  
**tcgcgccgca agcttaaaaa a** **321**

60 <210> 12  
<211> 90  
<212> PRT  
65 <213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 324 951 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 12

```

5      Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
      1          5          10
      His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
      20          25
10     Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Gly Glu
      35          40          45
15     Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val
      50          55          60
      Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala
      65          70          75          80
20     Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly

```

85

90

25

<210> 13

<211> 39

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

35

<400> 13

**cgtatcgacg atgacgataa acacggtgaa ggtacctc** 39

40

<210> 14

<211> 36

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

50

<400> 14

**gtgttatcg tcatcgtcga tacgcgtcag ttcgg** 36

55

<210> 15

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

65

<400> 15

**tgagcggata acaatttcac ac** 22

<210> 16

# ES 2 324 951 T3

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

10 <400> 16

**ttttaagc ttgcgccgc acgtgatgc tattatcaac ctc**

**44**

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65