

(11) *Número de Publicação:* **PT 92177 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C12N015/17 A

C12N015/62 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.11.02	(73) <i>Titular(es):</i> HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT BRUNINGSTRASSE, 64 D-6230 FRANKFURT/MAIN 80 DE
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.11.03 DE 3837273 1989.08.19 DE 3927449	(72) <i>Inventor(es):</i> EUGEN UHLMANN DE KLAUS-PETER KOLLER DE GUNTHER JOHANNES RIESS DE HOLGER WALLMEIER DE
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.05.31	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 12/94 1994.12.05	
(54) <i>Epígrafe:</i> PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM PRECURSOR DE INSULINA EM ESTREPTOMICETES	
(57) <i>Resumo:</i>	

[Fig.]

80

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 92 177

REQUERENTE: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã.

EPÍGRAFE: " PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM PRECURSOR DE INSULINA EM ESTREPTOMICETES "

INVENTORES: Dr.Klaus-Peter Koller, Dr.Günther Johannes Riess, Dr.Eugen Uhlmann e Dr.Holger e Dr. Holger Wallmeier.

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

Descrição referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã (inventores: Dr. Klaus-Peter Koller, Dr. Gunther Johannes Riess, Dr. Eugen Uhlmann e Dr. Holger Wallmeier, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM PRECURSOR DE INSULINA EM ESTREPTOMICETES".

DESCRIÇÃO

Já foi descrito um processo para a preparação de proteínas de fusão caracterizado por se acoplar o gene estrutural para a proteína pretendida na extremidade C-terminal do gene de tendamistato eventualmente modificado, provocar a expressão deste gene estrutural numa célula hospedeira de um estreptomicete e isolar a partir do sobrenadante de cultura a proteína de fusão segregada (DE 37 14 866 A1 ou EP 0 289 936 A2). O pedido de patente anterior refere-se para além disso a estruturas génicas que compreendem o gene de tendamistato eventualmente modificado, em cuja extremidade C-terminal se encontra acoplado um gene estrutural para uma outra proteína, a vectores que contém esta estrutura génica, a células de estreptomicetes que contém estes vectores bem como a proteínas de fusão que são caracterizadas por uma fracção situada na extremidade N-terminal

BAD ORIGINAL


de tendamistato eventualmente modificado. O pedido de patente anterior contém exemplos de proteínas de fusão nas quais a sequência de ácidos aminados do tendamistato se encontra acoplada através de um elo em ponte à pró-insulina de macaco.

Atingiu-se agora um desenvolvimento daquela invenção através do qual é possível preparar proteínas de fusão de modo especialmente vantajoso fazendo seguir à fracção de tendamistato uma pro-insulina encurtada cuja cadeia C é constituída somente por um ou dois resíduos de lisina. Estes precursores podem ser transformados em insulina humana de modo muito simples e económico.

Formas de concretização preferenciais da presente invenção referem-se especialmente a estruturas génicas para a amplificação e para a expressão do gene que codifica para a proteína de fusão. As formas de concretização preferidas da presente invenção são elucidadas em seguida, sendo ainda definidas na reivindicação da patente.

Na base das estruturas génicas utilizadas de acordo com a presente invenção está de modo vantajoso um gene sintético que codifica para um derivado encurtado da pró-insulina. De modo especialmente adequado toma-se em consideração na construção deste gene a utilização de códons específica dos estreptomicetes. Verificou-se que deste modo é possível aumentar o rendimento das proteínas de fusão.

Para além disso, resulta vantajosa a integração duma sequência de terminação na estrutura génica sintética, conseguindo-se em consequência também um incremento da velocidade de síntese.

Uma grande vantagem do processo da presente invenção consiste em que as proteínas de fusão podem ser detectadas com a ajuda dos ensaios em placa que foram descritos em EP-A1 0 161 629 no Exemplo 3 bem como na publicação de pedido

BAD ORIGINAL

de Patente Alemã 3 536 122, Exemplo 2. Deste modo, é possível elucidar convenientemente não só a selecção dos clones de interesse como também o procedimento final, uma vez que é possível revelar facilmente a influência dos diferentes parâmetros sobre o rendimento.

As proteínas de fusão obtidas de acordo com a presente invenção apresentam-se manifestamente numa conformação que corresponde à da insulina madura ou pelo menos próxima desta. Deste modo não apenas se elucida consideravelmente o procedimento adicional para obtenção da insulina como ainda se verifica surpreendentemente, para períodos de fermentação que permitem já um bom rendimento, não ocorrer qualquer ataque notável pelas proteases segregadas para o meio de fermentação.

As modificações na molécula da pró-insulina de acordo com a presente invenção com a respectiva cadeia C encurtada proporcionam um procedimento simples para obtenção da insulina humana, nomeadamente por cisão química com hidroxilamina e/ou por cisão enzimática com o auxílio de tripsina ou, de modo vantajoso, de endoproteínases de lisilo. A cisão enzimática é preferida. As endoproteínases de lisilo cindem de modo específico as frações carboxiterminais após o ácido aminado lisina. Através duma ordenação conveniente das cadeias A e B nas proteínas de fusão obtém-se por acção das referidas enzimas um precursor da insulina em que as pontes de dissulfureto se encontram surpreendentemente situadas correctamente.

De modo conveniente prevê-se na construção génica entre a fracção de tendamistato e o início da molécula de pró-insulina um elo em ponte que permite a separação do derivado de pró-insulina da fracção de tendamistato com a mesma enzima que é utilizada para a separação do derivado da pró-insulina nas duas cadeias de insulina.

Se se cindem as proteínas de fusão da presente invenção com uma endopeptidase de lisilo, obtém-se - de

BAD ORIGINAL


acordo com a construção da cadeia C modificada - des-B³⁰-insulina, a qual pode ser transformada em insulina humana por transpeptidização, ou B³¹-Lys-insulina ou B³¹-Lys-B³²-Lys-insulina, as quais podem ser transformadas em insulina humana por exemplo pela acção de carboxipeptidase B.

Obtêm-se rendimentos especialmente elevados na proteína pretendida quando se utilizam construções génicas com um gene de tendamistato encurtado. Esta forma de concretização do processo da presente invenção possui uma grande vantagem, pois a fracção da insulina modificada na proteína de fusão corresponde aproximadamente a metade, contendo neste caso consideravelmente menos "balastro". A dobragem correcta da proteína de fusão não é prejudicada pelo encurtamento da fracção de tendamistato, de modo que é possível o procedimento vantajoso com a proteína de fusão menor de acordo com a presente invenção. Esta vantagem não deve também ser compensada por uma velocidade de decomposição aumentada por meio das proteases próprias do hospedeiro - inesperadamente verifica-se na verdade uma estabilidade aumentada perante estas proteases.

A presente invenção refere-se por conseguinte a uma ampla série de construções génicas vantajosas que dão origem a precursores de insulina que podem ser facilmente separados das suas "fracções de balastro" das proteínas de fusão. Por meio deste procedimento simples é possível adicionalmente melhorar o rendimento em insulina humana.

A separação da proteína de fusão a partir do meio de cultura, o tratamento a fim de se obterem os precursores de insulina e a respectiva transformação em insulina humana podem ser efectuados usando técnicas conhecidas em si. Deste modo é possível isolar a proteína de fusão de modo vantajoso por cromatografia de adsorção ou de permuta iónica e/ou por filtração em gel e separar a fracção de pró-insulina por via química ou de preferência por via enzimática. A construção dos

elos em ponte correspondentes e conhecida em geral, encontrando-se descrita por exemplo em EP-A2 0 229 993.

A partir de EP-B 0 089 007 são conhecidos análogos de pré-pró-insulina e de pró-insulina que possuem na extremidade C da pré-cadeia (ou na extremidade N da pró-insulina) Lys ou Arg (o que igualmente se considera preferido nas construções da presente invenção), cuja cadeia B termina com B²⁹-Lys e em que o peptídeo C pode ser encurtado em Lys ou em Arg, de tal modo que também na estrutura da pró-insulina a B²⁹-Lys se segue, no caso mais simples, apenas Lys ou Arg, terminando deste modo a cadeia A. Estes compostos servem de precursores para a preparação de insulinas com o auxílio de tripsina ou de endopeptidases semelhantes à tripsina e de um éster de um ácido aminado natural, o qual eventualmente possui grupos protectores.

São conhecidos a partir de EP-A 0 195 691 precursores de insulina em que as cadeias B e A se encontram ligadas por meio do elo em ponte -X-Y-, em que X e Y são iguais ou diferentes e representam Lys ou Arg. Estes precursores da insulina são expressos em leveduras e podem ser transformados em insulina humana por tratamento enzimático. São conhecidos a partir de EP-A 0 163 529 precursores de insulina com a cadeia C encurtada. Em EP-B 0 132 769 e 0 132 770 são descritos derivados da insulina bem como composições farmacêuticas que os contêm.

Nos exemplos que se seguem a presente invenção é elucidada mais em pormenor. Os dados em percentagem referem-se a peso sempre que nada em contrário seja indicado.

EXEMPLO 1

Sintetiza-se o gene sintético (1) reproduzido no Quadro 1 de um modo conhecido em si por meio do método da fosfoamidite. Para a selecção dos codões foi tida em

conta a preferência dos estreptomicetes para G e C. Como no gene que codifica para a pro-insulina de macaco do pedido de patente anterior (ver Quadro 2) o gene (1) de acordo com o Quadro 1 também apresenta uma sequência saliente na extremidade 5' típica para a enzima de restrição EcoRI. A seguir ao gene estrutural encontram-se dois codões de paragem e uma sequência adaptadora com o local de reconhecimento para a enzima SalI. Na extremidade 3 encontra-se a sequência saliente correspondente à enzima HindIII.

Corta-se o plasmídeo comercial pUC19 com as enzimas EcoRI e HindIII e promove-se a ligação do gene sintético (1) de acordo com o Quadro 1. Obtém-se deste modo o plasmídeo p 11 (2). Após amplificação corta-se o gene sintético com as enzimas EcoRI e SalI sob a forma do fragmento (3) que é utilizado na construção subsequente descrita seguidamente.

Digere-se completamente o plasmídeo pUC19 com SmaI e liga-se com a sequência de terminação reproduzida no Quadro 2. Deu-se a denominação de pT1 (5) aos plasmídeos que possuem esta sequência na orientação correcta. Abre-se este plasmídeo (5) com EcoRI e preenche-se o local de corte com polímerase de ADN (fragmento de Klenow). Por nova ligação obtém-se o plasmídeo pT2 (6). Este plasmídeo é aberto com as enzimas SalI e SphI e isola-se o fragmento maior.

Corta-se o plasmídeo pKK400 (8) (ver pedido de patente anterior, Figura 4, (20)) com SphI e EcoRI e isola-se o fragmento menor (9) com o gene de tendamistato.

Por ligação dos fragmentos (3), (7) e (9) obtém-se o plasmídeo pKK500 (10), no qual a sequência de tendamistato se segue o elo em ponte que codifica para 12 ácidos aminados.

BAD ORIGINAL

~~CONFIDENTIAL~~

Phe Asn Ala Met Ala Thr Gly Asn Ser Asn Gly Lys
TTC AAT GCG ATG GCG ACC GGG ATT TCG AAC GGC AAG
AAG TTA CCG TAC CCG TGG CCG TAA AGC TTG CCG TTC

EcoRI

e em seguida o gene para a pré-insulina modificada da presente invenção. A ordenação correcta é verificada por corte com SphI e SstI, obtendo-se deste modo a partir do plasmídeo de 3,5 kb de dimensão um fragmento de 833 pb. Por sequenciação de ADN segundo o método de di-desoxi confirma-se a correcção da sequência.

As construções genéticas de acordo com a presente invenção nas quais a Lys do peptídeo de fusão é completada por uma outra Lys são preparadas de modo análogo. Para este fim duplica-se o triplete que codifica para a lys, AAG. Obtem-se de modo análogo o plasmídeo p I2 e a partir deste e vector pKK600.

EXEMPLO 2

De modo análogo ao descrito no pedido de patente anterior para o vector pGF 1, obtêm-se a partir dos vectores pKK500 e pKK600 os plasmídeos de expressão pGF2 e pGF3. Para este fim isolam-se a partir dos vectores pKK500 e pKK600 por dupla digestão com SphI e SstI as inserções de 823 pb e de 826 pb respectivamente e ligam-se estes fragmentos de ADN no plasmídeo de expressão pIJ702 cortado com as mesmas enzimas. Transforma-se *S. lividans* Tk 24 com a mistura de ligação e isola-se o ADN plasmídico dos transformantes resistentes à tiosstreptona que apresentam actividade de tendamistato (ensaio em placa). Todos os clones positivos contém a inserção utilizada proveniente de pKK500 ou de pKK600, respectivamente.

A expressão da proteína de fusão codificada pode ser efectuada de modo conhecido. Incubam-se os transformantes de estirpe *S.*

BAD ORIGINAL


lividans TK 24 durante quatro dias a 28°C em balões cónicos e separa-se o micélio do caldo de cultura por meio de centrifugação, sendo então possível detectar a proteína de fusão na solução limpa como se segue:

Tratam-se 10 a 100 µl da solução com 20 a 200 µl de ácido tricloroacético a 15 % e concentra-se a proteína precipitada por centrifugação, lava-se e retoma-se em tampão de amostra contendo SDS (U. Laemmli, Nature 227 (1970) 680-685). Após 2 minutos de incubação a 90°C separam-se os constituintes por electroforese em gel de poliacrilamida contendo 10 a 17 % de SDS. Obtém-se uma proteína de peso molecular de 15 KD, portanto na ordem de grandeza esperada de peso molecular para a proteína de fusão de tendamistato com pro-insulina. A proteína de fusão reage tanto com anticorpos contra tendamistato como também com anticorpos contra insulina.

EXEMPLO 3

Digere-se o vector de expressão pTF2 (DE 37 14 866 A1, Exemplo 4) com as enzimas de restrição EcoRI e SstI e retira-se o fragmento que codifica para a pró-insulina de macaco. Utiliza-se o fragmento de 5,65 Kpb para a reacção de ligação descrita seguidamente.

A partir do plasmídeo pKK500 (Exemplo 1) recorta-se com as mesmas enzimas de restrição um fragmento de ADN de 285 pb de comprimento, o qual contém o gene da pró-insulina encurtado bem como a sequência de terminação.

A ligação do fragmento de 5,65 kpb de comprimento do plasmídeo pTF2 com o fragmento de 285 pb de comprimento de pKK500 da origem ao plasmídeo de expressão pTF3.

Transformam-se protoplastos de *Sterptomyces lividans* TK24 com a mistura de ligação, obtendo-se clones que

BAD ORIGINAL

são resistentes à tioestreptona e que segregam uma proteína de fusão que reage com anticorpos contra pró-insulina. Esta proteína de fusão é constituída pelos primeiros 41 ácidos aminados de tendamistato, pelo elo em ponte

Pro-Ser-Leu-Asn-Ser-Asn-Gly-Lys

e pela pró-insulina encurtada.

QUADRO 1

B¹ 10
ASN SER ASN GLY LYS PHE VAL ASN GLN HIS LEU CYS GLY SER HIS
AAT TCG AAC GCC AAG TTC GTC AAC CAG CAC CTG TCG GGC TCG CAC
GC TTG CCG TTC AAG CAG TTG GTC GTG CAC ACG CCG AGC GTG

(EcoRI)

20 30
LEU VAL GLU ALA LEU TYR LEU VAL CYS GLY GLU ARG GLY PHE PHE
CTC GTC GAG CCG CTC TAC CTG GTG TGC GGG GAG CCG GGC TTC TTC
GAG CAC CTC CCG GAG ATG GAC CAC ACG CCG CTC GCG CCG AAG AAG

C A¹ 40
TYR THR PRO LYS THR LYS GLY ILE VAL GLU GLN CYS CYS THR SER
TAC ACC CCC AAG ACC AAG GGC ATC CTG GAG CAG TGC TGT ACG TCC
ATG TGG GGG TTC TGG TTC CCG TAG CAC CTC GTC ACG ACA TGC AGG

50
ILE CYS SER LEU TYR GLN LEU GLU ASN TYR CYS ASN STP STP
ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTC GAG AAC TAC TGC AAC TAG TAA
TAG ACC AGG GAG ATG GTC GAG CTC TTG ATG ACG TTG ATC ATT

GTC GAC CTG CAG CCA

CAG CTG GAC GTC GGT TCG A

SalI

(HindIII)

BAD ORIGINAL

QUADRO 2

5'-CGATAAACGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGGATC
GCTATTGGCTATGTTAATTTCCGAGGAAAAACCTCGAAAAAAAACCTCTAAAAGTTGCACCTAG-5'

R E I V I N D I C A Ç Ã O

Processo para a preparação de proteínas de fusão por acoplamento do gene estrutural para a proteína pretendida na extremidade C-terminal do gene de tendamistato, expressão desta estrutura génica numa célula hospedeira de um estreptomicete e isolamento a partir do sobrenadante da proteína de fusão segregada, caracterizado por o gene estrutural para a proteína pretendida codificar para um derivado da proinsulina no qual a cadeia B se encontra ligada à cadeia A por meio de um elo em ponte, que codifica para Lys ou para Lys-Lys.

A requerente reivindica as prioridades dos pedidos alemães apresentados em 3 de Novembro de 1988 e em 19 de agosto de 1989, sob os n.ºs. P 38 37 273.8 e P 39 27 449.7, respectivamente.

Lisboa, 2 de Novembro de 1989
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



BAD ORIGINAL



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM PRECURSOR DE INSULINA EM ESTREPTOMICETES"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de proteínas de fusão por acoplamento do gene estrutural para a proteína pretendida na extremidade C-terminal do gene de tendamistato, expressão desta estrutura génica numa célula hospedeira de um estreptomicete e isolamento a partir do sobrenadante da proteína de fusão segregada, em que o gene estrutural para a proteína pretendida codifica para um derivado da proinsulina no qual a cadeia B se encontra ligada à cadeia A por meio de um elo em ponte, que codifica para Lys ou Para Lys-Lys.

Fig. 1

