

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0616712-8 A2**

(22) Data de Depósito: 13/09/2006
(43) Data da Publicação: 28/06/2011
(RPI 2112)



(51) Int.Cl.:
C07K 14/575 2006.01
C07K 14/605 2006.01
C12P 21/02 2006.01
C12P 21/06 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA AMIDAR POLIPEPTÍDEOS COM TERMINAIS C DE AMINOÁCIDO BÁSICOS POR MEIO DE ENDOPROTEASES ESPECÍFICAS**

(30) Prioridade Unionista: 27/09/2005 DE 10 2005 046 113.1

(73) Titular(es): SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

(72) Inventor(es): Christophe Salagnad, Frank Zocher, Laure Landric-Burtin, Paul Habermann, Sebastian Rissom

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006008903 de 13/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/036299 de 05/04/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA AMIDAR POLIPEPTÍDEOS COM TERMINAIS C DE AMINOÁCIDO BÁSICOS POR MEIO DE ENDOPROTEASES ESPECÍFICAS. A presente invenção refere-se a um método para produzir peptídeos dibásicos ou polibásicos amidados de terminal C, consistindo na reação de dois peptídeos na presença de enzimas biologicamente ativas de tripsina e, se necessário, na purificação dos compostos de fórmula (1) desse modo obtidos, por meio de química de proteína.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA AMIDAR POLIPEPTÍDEOS COM TERMINAIS C DE AMINOÁCIDO BÁSICOS POR MEIO DE ENDOPROTEASES ESPECÍFICAS**".

5 A presente invenção refere-se a um processo para preparo de peptídeos di ou polibásicos C-terminalmente amidados, em particular aqueles possuindo a atividade biológica de GLP-1 ou análogos ou derivados dos mesmos.

10 A estabilidade, disponibilidade biomédica e duração de ação de peptídeos e proteínas farmacologicamente relevantes depende em grande parte da natureza da extremidade do terminal N ou C da molécula. A meia-vida das biomoléculas é influenciada acentuadamente pela extensão do terminal C com aminoácidos básicos. Atividades farmacêuticas particularmente boas podem ser alcançadas se na extensão de terminal C com mais do que um aminoácido básico, o aminoácido na extremidade do terminal C
15 for uma amida de amino.

Tais substâncias ativas com base em peptídeo podem ser preparadas, se os peptídeos forem suficientemente pequenos, diretamente por uma síntese química completa de acordo com um protocolo de síntese de Merrifield modificado. No entanto, limitações emergem quando um tal peptídeo é requerido em grandes quantidades. Desta forma, os aminoácidos a
20 serem empregados na síntese devem inicialmente ser preparados e purificados a fim de subsequente ser adequados após de modificação química como reagentes na síntese de peptídeo. Depois de remoção dos grupos protetores no término da síntese, o peptídeo ou produto alvo pode
25 então ser purificado e formulado como produto farmacêutico. Dependendo da composição do peptídeo, além disso, efeitos subjacentes podem originar-se durante a síntese em rendimentos restritos, racemização ou formação de subproduto por meio de acoplamento defeituoso em etapas de acoplamento individuais, desta forma possivelmente possuindo um efeito adverso no rendimento total ou a pureza do produto. A síntese total é muito complicada
30 para preparo de quantidades maiores de produto requerido. Preparação por meio de processos alternativos, especialmente biotecnológicos, portanto

seria desejável.

Enzimas capazes de amidação de terminal C de peptídeos são conhecidas a muito tempo têm sido conhecidas durante um longo tempo. Estas enzimas são designadas (Eipper e outros Mol. Endocrinol. 1987 Nov; 1 (11): 777) como enzimas de alfa-amidação de peptidilglicina (PAM). A preparação e purificação de tais enzimas de PAM é familiar ao versado e foi descrita em detalhes (M. Nogudi e outros Prot. Expr. Purif. 2003, 28: 293). No entanto, a preparação é cara em relação à preparação de outras enzimas industriais tais como, por exemplo, tripsina ou carboxipeptidase.

Uma alternativa à amidação *in vitro* por meio de mecanismo de PAM emerge quando a enzima é coexpressada na mesma célula hospedeira com a proteína precursora a ser amidada. Isto é alcançado por introdução de uma seqüência de gene que codifica para uma atividade de PAM na célula hospedeira sob o controle de uma seqüência reguladora específica de hospedeiro. Esta seqüência de expressão pode ou ser incorporada estavelmente na respectiva seqüência de DNA cromossômico, ou estar presente em um segundo plasmídeo paralelo ao plasmídeo de expressão para a proteína alvo, ou ser integrada como segundo cassete de expressão no mesmo vetor, ou ser clonada em um método de expressão policistrônica em fase com a seqüência de gene que codifica a proteína alvo sob o controle da mesma seqüência promotora. Entretanto, os rendimentos descritos são baixos, de modo que a preparação de grandes quantidades possa ser alcançada apenas por meio de volumes de fermentação correspondentes. Isto leva a uma complexidade mais onerosa de purificação. Além disso, a amidação não ocorre quantitativamente, de modo que é necessário separar proteína requerida amidada de não amidada. Uma decisão em favor de um processo de preparação secretório (por exemplo Hong e outros, Appl Biochem Biotechnol. 2003;110, p.113-23) deve levar em conta o fato que proteínas com terminal C polibásico são secretadas a apenas um nível muito pequeno ou não na totalidade.

Um outro método para amidação é com base no uso de mecanismos de autoclivagem específica de proteína (Cottingham e outros Nature

Biotech. Vol. 19, 974-977, 2001). Entretanto, não é fácil controlar esta reação, e transesterificação e desta forma a formação de produtos indesejáveis pode ocorrer. A contribuição relativamente grande da proteína de fusão pode ter efeitos adversos sobre o rendimento.

5 Os processos de amidação descritos acima iniciam de um terminal C do peptídeo alvo que é estendido em pelo menos um aminoácido glicina ou alternativamente peptídeo de inteína. Peptídeos com lisina de terminal C podem, no entanto, se eles não compreenderem nenhuma lisina ou arginina adicional subsequente na sequência, ser preparados como uma estrutura multimérica que pode subsequente ser convertida por digestão com tripsina ou enzimas do tipo tripsina na unidade monomérica. Rendimentos altos podem ser alcançados deste modo. Isto não é possível no caso dos processos descritos acima.

15 Os processos de preparação biotecnológicos conhecidos estão desse modo associados com desvantagens, e o objetivo de preparo de peptídeos ou proteínas que possuam mais do que um aminoácido lisina ou arginina básica no terminal C e sejam terminalmente amidados em grandes quantidades em custo razoável não pode ainda ser considerado como satisfatoriamente resolvido.

20 Um processo alternativo de preparação emergiria se fosse possível preparar em grandes quantidades um precursor do peptídeo alvo que é truncado por pelo menos um aminoácido básico, e subsequente estender este precursor em uma semisíntese catalisada por enzima com lisinamida ou argininamida.

25 Levin e outros (Biochemical Journal 63: 308-16;1956) descreve o efeito de tripsina em lisinamida e vários peptídeos de polilisinamida. Os resultados dos autores mostram que derivados de lisinamida não podem ser convertidos sob a influência de tripsina em derivados de lisinamida de peso molecular elevado porque hidrólise das amidas intermediariamente formadas para o ácido livre ocorre rapidamente por comparação com a reação de acoplamento. Deve ser concluído a partir disso que processos semi-sintéticos catalisados por tripsina fornecendo a preparação de peptídeos com se-

30

qüências mistas de polilisinamida ou poliargininamida ou poli-Lys/Arg ligada por C são malsucedidos ou bem-sucedidos apenas com baixos rendimentos.

Um processo químico de peptídeo que surpreendentemente permite ligação catalisada por aminoácidos tripsina básica amidada, análogos ou derivados destes, a peptídeos que possuem um aminoácido básico de terminal C com altos rendimentos (isto é, >30%) atualmente foi constatado.

Adicionalmente foi possível observar para o processo da invenção, surpreendentemente, que introdução de grupos protetores (cf. Pitraschke e outros, Tetrahedron: Asymmetry 9, p 1505-1518, 1998) tais como, por exemplo, -Boc (t-butiloxicarbonila), -Z (benziloxicarbonila) ou -DDZ (dimetilfenilpropiloxicarbonila) nos aminoácidos básicos amidados (lisinamida, argininamida) não resultam em uma melhora em relação à eficiência e seletividade da reação de ligação. O processo da invenção desta forma tem a vantagem de que é possível aplicar com mascaramento com grupos protetores, desta forma evitando perdas de rendimento por meio de remoção do grupo protetor e a remoção de reagentes tóxicos. Isto resulta no processo possuindo enormes vantagens de custo sobre síntese química total.

Um aspecto da invenção é desta forma um processo para preparo de peptídeos di ou polibásicos amidados C-terminalmente da fórmula geral I



onde

(AA)_n é um peptídeo consistindo em n aminoácidos do mesmo ou diferente tipo, no qual

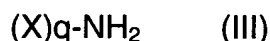
AA é um aminoácido ou análogos ou derivados deste;
n é um número inteiro entre 3 e 2000; e
X é um aminoácido básico ou análogos ou derivados deste;
m é um número inteiro entre 2 e 15,

no qual

um composto da fórmula geral II



é reagido com um composto da fórmula geral III



na qual AA, n e X são tal como definido acima, e

p e q são números inteiros, e

$$p + q = m,$$

5 na presença de uma enzima possuindo a atividade biológica de tripsina, e

onde apropriado o composto resultante da fórmula I é submetido à purificação química de proteína;

em particular em que m é um número inteiro entre 2 e 10, ou em
10 que m é um número inteiro entre 2 e 6.

Um aspecto adicional da invenção é um processo descrito acima em que n é um número inteiro entre 10 e 1000, ou entre 15 e 500, ou entre 20 e 400.

Um aspecto adicional da invenção é um processo descrito acima
15 em que

a) um peptídeo de fusão o qual compreende um ou mais compostos da fórmula II como parte do peptídeo de fusão é expresso;

b) os compostos da fórmula II são liberados do referido peptídeo de fusão através de clivagem química ou enzimática;

20 c) o intermediário da etapa b) é, onde apropriado depois de purificação química de proteína, reagido na presença de uma enzima possuindo a atividade biológica de tripsina com um composto da fórmula III; e

d) onde apropriado o composto resultante da fórmula I é submetido à purificação química de proteína e isolamento;

25 em que em particular a eliminação do composto da fórmula II da proteína de fusão ocorre através de mecanismo de haleto de cianogênio, enterocinase, fator Xa, Genenase, trombina ou tripsina; e também preferido, a proteína de fusão é expressa em um sistema de expressão selecionado do grupo compreendendo E. coli, S. carnosus, Salmonella, Bacillus subtilis,
30 Pseudomonas fluorescens, K. lactis, P. pastoris, Schizosaccharomyces pombe e S. cerevisiae.

Um aspecto adicional da invenção é um processo descrito acima

no qual os referidos peptídeos da fórmula geral I possuem a atividade biológica de GLP-1 ou derivados ou análogos deste.

Um aspecto adicional da invenção é um processo descrito acima no qual o composto da fórmula I é caracterizado pela fórmula IV:

- 5 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS(X)m-NH₂ (IV);
em que sucessivamente pode em particular ser caracterizado pelas seqüências:

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKK-NH₂
(SEQ ID N°. 1);

- 10 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK-NH₂ (SEQ ID N°. 2);

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKR-NH₂ (SEQ ID N°. 3);

- 15 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKR-NH₂
(SEQ ID N°. 4) ou
HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSRK-NH₂ (SEQ ID N°. 5).

A invenção também refere-se a compostos da fórmula I caracterizados pelas seqüências:

- 20 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK-NH₂ (SEQ ID N°. 2);

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKR-NH₂ (SEQ ID N°. 3);

- 25 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKR-NH₂
(SEQ ID N°. 4) ou
HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSRK-NH₂ (SEQ ID N°. 5);

seu uso, especialmente em formulações de depósito.

- 30 Um aspecto adicional da invenção é um medicamento compreendendo um ou mais dos compostos da fórmula I caracterizado pelas seqüências:

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK-NH₂ (SEQ ID

Nº. 2);

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKR-NH₂ (SEQ ID Nº. 3);

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKCR-NH₂
5 (SEQ ID Nº. 4) ou

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSRK-NH₂ (SEQ ID Nº. 5).

Os significados para os propósitos da presente invenção são:

O termo "análogo" de um aminoácido quer dizer um aminoácido
10 de ocorrência natural que não está codificado no código genético mas é adequado para incorporação em uma cadeia de peptídeo. Exemplos de análogos de um aminoácido são ornitina e citrulina, e também todos os outros aminoácidos de ocorrência não-natural que possuem qualquer função básica na cadeia lateral, tais como, por exemplo, ácido 2,4-diaminobutanóico; 3-
15 metilornitina; 4-metilornitina, 5-aminoleucina; 4-aminoleucina; 3-aminoleucina; 5-aminonorleucina; 4-aminonorleucina; 3-aminonorleucina; 4-aminonorvalina; 3-aminonorvalina; 6-metilisina; 5-metilisina; 4-metilisina; 3-metilisina.

O termo "derivado" de um aminoácido quer dizer um aminoácido ou um análogo de um aminoácido o qual é substituído por um ou mais grupos químicos. Exemplos de tais grupos químicos são grupos protetores habituais em química de peptídeo, tal como -Boc (t-butiloxicarbonila), -Z (benzilo-
20 xiloxicarbonila), -DDZ (dimetilfenilpropilóxi-carbonila), -Fmoc (N-alfa-(9-fluorenilmetiloxicarbonila), -2-bromo-Z, -2-cloro-Z, -Tfa (trifluoroacetila), -nicotinoíla, -4-nitro-Z, -2-picolinoíla, -Tos (4-toluenosulfonila), -For (formila), -bio-
25 tinila, -dansila, -Dnp (dinitrofenila), -Mca (monocloracetila), -Mtt (N-metiltritila), -Nde (N-1-(4-nitro-1,3-dioxindan-2-ilideno)etila), -acetimidoíla, -acetila, -miristoíla, -palmitoíla, N-litocolil-γ-glutamila ou -ω-carboxiheptadecanoíla.

Um tal grupo é além disso um grupo C(O)-(C₆-C₂₄)alquila, um grupo C(O)-(C₆-C₂₄)alquenila, um grupo C(O)-(C₆-C₂₄)alcanodienila, ou um
30 grupo C(O)-(C₆-C₂₄)alcanotrienila, onde grupos alquila, alquenila, alcanodienila e alcanotrienila onde presentes podem ser cadeia ramificada ou linear. (C₁-C₆)Alquila significa um radical de hidrocarboneto possuindo 1, 2, 3, 4, 5

ou 6 átomos de C. Exemplos de radicais de (C₁-C₆)alquila são metila, etila, n-propila, isopropila, (1-metiletila), n-butila, isobutila (2-metilpropila), sec-butila (1-metilpropila), *terc*-butila (1,1-dimetiletila), n-pentila, isopentila, *terc*-pentila, neopentila, hexila. (C₆-C₂₄)alquila correspondentemente significa um radical de hidrocarboneto possuindo 6 a 24 átomos de C. Radicais de alquila podem ser cadeia linear ou ramificada. Radicais de (C₆-C₂₄)alquila preferidos são resíduos de ácido graxo, por exemplo hexila, octila, decanila, undecanila, dodecanila, tridecanila, tetradecanila (miristila), pentadecanila, hexadecanila, heptadecanila, octadecanila (estearila), nonadecanila, eicosanila, dicosanila, 9,11-dimetiltridecanila, 11-metiltridecanila.

Um tal grupo é além disso um grupo C(O)-fenil-(C₅-C₈)heteroarilfenila, C(O)-bifenila ou C(O)-terfenila, onde os grupos fenila, bifenila, terfenila ou heteroarila são não substituídos ou são substituídos por um ou dois grupos selecionados do grupo de (C₁-C₁₀)alquila ou O(C₁-C₁₀)alquila. Em radicais de fenila monosubstituída, o substituinte pode estar presente na posição 2, na posição 3 ou na posição 4. Fenila disubstituída pode ser substituída na posição 2,3, posição 2,4, posição 2,5, posição 2,6, posição 3,4 ou posição 3,5. Em radicais de fenila trissubstituída, os substituintes podem estar presentes na posição 2,3,4, posição 2,3,5, posição 2,4,5, posição 2,4,6, posição 2,3,6 ou posição 3,4,5. Heteroarila significa, por exemplo, furanila, tienila, pirrolila, imidazolila, pirazolila, triazolila, tetrazolila, oxazolila, isoxazolila, tiazolila, isotiazolila, piridila, pirazinila, pirimidinila, piridazinila, indolila, indazolila, quinolila, isoquinolila, ftalazinila, quinoxalinila, quinazolinila e cinolinila.

O termo "aminoácido básico" quer dizer lisina, arginina ou derivados ou análogos destas, tais como, por exemplo, ornitina ou citrulina, de preferência lisina ou arginina, especialmente lisina. Neste contexto, lisina ou arginina pode, no lugar do grupo carboxamida, ser derivada por um ou mais de outro grupo reativo, em particular selecionada do grupo de éster de amino, éster de peptídeo, anidrido e haleto, e ser correspondentemente empregada no processo da invenção.

O termo "enzima possuindo a atividade biológica de tripsina"

quer dizer, além das tripsinas conhecidas e comercialmente disponíveis das fontes convencionais tais como rato, gado, porco, ser humano, cão, camundongo, as isoenzimas, derivados ou variantes destes, também enzimas possuindo propriedades bioquímicas altamente relacionada tais como, por exemplo, catepsina, tripsina de *Fusarium oxysporum* e de *Streptomyces* (*S. griseus*, *S. exfoliatus*, *S. erythraeus*, *S. fradiae* e *S. albidoflavus*), triptase, mastina, acrosina, calicreína, hepsina, prostasina I, endopeptidase de lisila (Lys-C) e endoproteinase-Arg-C (clostripaína).

Está claro à pessoa versada neste contexto que esta lista não é definitiva, e outras enzimas, isoenzimas, derivados ou variantes capazes especificamente de clivar-se C-terminalmente a aminoácidos básicos estão continuamente sendo encontrados durante pesquisa biotecnológica. Alternativamente, a especificidade de enzimas pode ser alterada através de modificação química de peptídeo ou mutação ao nível de DNA (muteínas). Além disso, a especificidade e atividade de enzimas podem ser acentuadamente modificadas através de escolha adequada das condições de reação.

Na modalidade preferida do processo da invenção, a capacidade de microorganismos para preparar peptídeos heterólogos é utilizada. Para este propósito, a seqüência de peptídeo desejada é transladada na seqüência de DNA correspondente, que é acoplada a uma seqüência promotora específica de hospedeiro. É possível neste caso, dependendo da estratégia de expressão, expressar o peptídeo alvo a fim de que ele seja formado pela célula diretamente ou indiretamente como peptídeo de fusão remanescente dentro das células.

Se uma estratégia de fusão usando um peptídeo de fusão adequado for escolhida, estará então claro para o versado que os parceiros de fusão devem ser conectados juntos por um ligador, que a divisão específica dos parceiros de um modo que permita a fim de que o terminal N desejado do peptídeo alvo esteja disponível depois do processo. Para os propósitos da presente invenção, o peptídeo alvo é um composto da fórmula II. Um grande número de possibilidades, que são conhecidas ao versado e são continuamente expandidas, é disponível para o projeto de ligadores ade-

quados. Se, por exemplo, o aminoácido metionina for escolhido, uma clivagem química com haleto de cianogênio é possível. Se, por exemplo, um pentapeptídeo da sequência DDDDK é escolhido como ligador, uma clivagem com enterocinase é possível. Se, por exemplo, a sequência de tetrapeptídeo IEGR é escolhida, a clivagem pode ocorrer com fator Xa. Com um projeto apropriado, Genenase[®] pode ser usada como enzima de processo para peptídeos cujo terminal N começa com histidina. Se o terminal N é caracterizado pelo dipeptídeo Gly-Ser, é possível escolher o tetrapeptídeo LV-PR como ligador, a fim de que um reconhecimento e sítio de clivagem para trombina origine-se. Ainda que uma enzima possuindo a atividade biológica de tripsina seja empregada de acordo com a invenção para o acoplamento de peptídeo, o uso de uma tal enzima é possível em princípio até neste ponto no processo da invenção. Desta forma, tripsina pode inicialmente ser usada em meio aquoso para eliminação da parte de fusão do peptídeo de fusão uma vez que lisina ou arginina é inserida como ligador entre parte de fusão e peptídeo alvo.

No entanto, é também possível alternativamente para o peptídeo alvo, se ele for de exportação compatível, ser secretado no meio de cultura celular ou na forma de um peptídeo de fusão ou em sua forma nativa. É possível usar para este propósito células hospedeiras recombinantes, especialmente aquelas de microorganismos, de preferência de bactérias ou leveduras. Se células bacterianas são escolhidas como sistema de expressão, há a opção adicional do peptídeo alvo ou um peptídeo correspondente de fusão que inclui o peptídeo alvo, isto é um composto da fórmula II para os propósitos da invenção, sendo diretamente secretado no periplasma ou no meio de cultura. Está claro à pessoa versada neste contexto que a exportação é freqüentemente restrita se a extremidade de terminal C consistisse em mais do que um aminoácido básico.

Os organismos e métodos hospedeiros disponíveis em princípio para este propósito são conhecidos ao versado (cf., por exemplo, Gellissen, Gerd (ed.) *Production of Recombinant Proteins*, ISBN 3-527-31036-3). Eles são também a um grande nível comercialmente disponível de um grande

número de fornecedores. Representantes que podem ser mencionados são as companhias New England Biolabs, Invitrogen e Roche. As descrições de catálogo de tais companhias incluem referências à literatura fornecendo uma visão geral da tecnologia. Está também claro ao versado neste contexto que a faixa de microorganismos a ser usada está continuamente expandindo, tal como é o repertório dos métodos biotecnológicos. Modalidades as quais são mais específicas neste respeito são também incluídas no tema da presente invenção.

Exemplos de sistemas de hospedeiros/vetor mencionados como representantes são os seguintes: bactérias do tipo de *E. coli*, *S. carnosus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis* ou *Pseudomonas*, especialmente *Pseudomonas fluorescens*, e leveduras do tipo de *K. lactis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* e *S. cerevisiae*.

No entanto, o versado está ciente que estes sistemas mencionados como exemplos oferecem um grande número de possíveis variações que emergem, por exemplo, da escolha de promotores adequados ou outras seqüências de ácido nucléico reguladoras, das propriedades genéticas da célula hospedeira e dos vetores usados (por exemplo, em relação ao número de cópia de DNA, a escolha dos mecanismos de seleção etc.).

O versado está também ciente que um processo de purificação específica deve ser adaptado para cada peptídeo alvo, por causa de suas propriedades físico-químicas, quando ele pretende-se ser fornecido em forma isolada. Isto é alcançado em princípio por meio de combinação adequada de métodos de separação bioquímica e biofísica conhecidos. Está também claro neste contexto que novas possibilidades estão continuamente sendo abertas para obtenção ou otimização da purificação bem-sucedida desejada com base em novos materiais (por exemplo, para a cromatografia).

Pode ser vantajoso para os propósitos da presente invenção fundir o peptídeo precursor com uma seqüência de peptídeo que, por exemplo, permite purificação através de cromatografia por afinidade.

Para desenvolvimento adicional da invenção, derivados de exendina tais como descritos em US 2004/0106547 foram preparados a título

de exemplo. Tais peptídeos derivados de exendina podem, por causa de seu efeito de redução de glicose sangüínea, desempenhar um importante papel no desenvolvimento do medicamento no tratamento de diabetes ou outros distúrbios metabólicos que levam por exemplo, a obesidade. É por esse motivo vantajoso para propósitos farmacêuticos possuir tais peptídeos disponíveis em forma apropriada.

O pedido de patente internacional WO 02/066628 descreve um derivado de hirudina que possui os aminoácidos Lys-Arg na extremidade de terminal C. O perfil de efeito antitrombótico pode ser modificado através de amidação da arginina de terminal C. Para este propósito, o precursor com lisina de terminal C é preparado e subsequente uma reação de acoplamento com argininamida é realizada de acordo com a invenção para resultar no derivado de hirudin amidado. Os precursores podem ser preparados tal como descrito no pedido por meio de secreção de levedura. Para este propósito, por exemplo, a seqüência de gene para Leu-hirudin descrita em EP-A 0 324 712 é estendida por um códon para lisina, e o procedimento descrito a título de exemplo na patente é continuado para preparar o hirudin estendido com lisina. Alternativamente, é também possível seguir a rotina de secreção do precursor por bactérias. A tecnologia descrita no pedido de patente EP-A 1 216 259 pode ser usada para este propósito, por exemplo.

Os seguintes exemplos servem para ilustrar a presente invenção e de modo algum devem ser interpretados como limitantes em relação aos temas da presente invenção.

Exemplo 1: Síntese de uma seqüência de DNA específico de E. coli codificando para AVE (1-43)

Primeiramente, a seqüência de gene SEQ ID N°. 6 codificando para o peptídeo AVE (1-43) (SEQ ID N°. 7) foi preparada:

SEQ ID N°. 6:

TTTTTAAAGCTTGACGGTGAAGGTACCTTCACCTCCGACCTGTCCAAA
CAGATGGAAGAAGAAGCTGTTCTGTTCATCGAATGGCTGAAAAACG
GTGGTCCGTCCTCCGGTGCTCCGCCTTCGAAAAAGAAGAAAAAGTGAT
AATAGCATGCACGTGCGGCCGCACCTGGTTCGACGAATTCAAA AAAA

SEQ ID N°. 7:

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKK

A seqüência de gene foi sintetizada através de mecanismo de tecnologia de PCR. Para este propósito, os seguintes 5 iniciadores foram preparados através de síntese de DNA química. Esta síntese ocorreu usando o sistema de síntese de DNA Expedite® (de Applied Biosystems).

a) Iniciador zp5u possui a seqüência (SEQ ID N°. 8):

5'-TTTTTTAAGCTTGCACGGTGAAG -3'

SEQ ID N°. 8 inclui a região 1-23 do filamento de sentido ("sentido"). O tripleto de CAC codifica histidina como primeiro aminoácido do peptídeo alvo.

b) Iniciador zp3a possui a seqüência (SEQ ID N°. 9):

5'-CTTCCATCTGTTTGGACAGGTCGGAGGTGAAGGTACCTTCACCGTG
CAAG CTTAAAAAA-3'

SEQ ID N°. 9 inclui a região 1-59 da cepa complementar ("anti-sentido").

c) Iniciador zp3b possui a seqüência (SEQ ID N°. 10):

5'-GGACGGACCAACCGTTTTTCAGCCATTCGATGAACAGACGAACAGCT
TCTTCTTCCATCTGTTTGGACAG-3'

SEQ ID N°. 10 inclui a região 40-108 do filamento complementar ("anti-sentido").

d) Iniciador zp3c possui a seqüência (SEQ ID N°. 11):

5-CGTGCATGCTATTATCACTTTTTCTTCTTTTTTCGAAGGCGGAGCACC
GGAGGACGGACCAACCGTTTTTC-3'

SEQ ID N°. 11 inclui a região 91-159 do filamento complementar ("anti-sentido").

O tripleto anti-sentido CTT codifica o último aminoácido (AA₄₃) do peptídeo alvo.

e) Iniciador zp3d possui a seqüência (SEQ ID N°. 12):

5'-TTTTTTGAATTCGTCGACCAGGTGCGGCCGCACGTGCATGCTATTA
TCACTT-3'

SEQ ID N°. 12 inclui a região remanescente do filamento com-

plementar ("anti-sentido").

Usando os iniciadores, 4 reações PCR foram subsequente-
mente realizadas sob condições padrões em 54°C. Na reação 1, 100 ng de cada
um dos iniciadores zp3a e zp5u foram empregados. O número de ciclos na
5 PCR foi 5. Na segunda reação, 1/40 da reação foi reagido com 100 ng de
cada um dos iniciadores zp5u e zp3b em 10 ciclos. Na reação 3, 1/40 do
produto de reação 2 foram reagidos com 100 ng de cada um dos iniciadores
zp5u e zp3c em um adicional de 10 ciclos. Finalmente, o fragmento de DNA
desejado foi sintetizado em 25 ciclos de PCR com 1/40 do rendimento de
10 reação 3 e os iniciadores zp5u e zp3d, e seu comprimento foi checado atra-
vés de eletroforese de gel. O fragmento de DNA desejado foi purificado e
reagido com as enzimas de restrição EcoR1 e subsequente-mente com
Hind3 de acordo com a informação do fabricante (New England Biolabs).

Em paralelo, o DNA do plasmídeo pUC19 (New England Bio-
15 labs) foi reagido com as enzimas EcoR1 e Hind3. Os fragmentos das mistu-
ras de clivagem foram separados em um gel de agarose a 1,2% e em se-
guida o fragmento de vetor remanescente de pUC19 e o produto desejado
da reação 4 foram isolados. Os fragmentos purificados foram ligados juntos
em uma reação de T4 ligase em 16°C durante a noite. Subsequente-mente,
20 células de *E. coli* competentes (Stratagene, strain *E. coli* XL10 Gold) foram
transformadas com a mistura de ligação e semeadas em placas de ágar
compreendendo 25 mg/l de ampicilina. DNA de plasmídeo foi isolado dos
clones individuais e caracterizado através de análise de sequência de DNA.

O DNA de plasmídeo do fragmento desejado recebeu a desig-
25 nação pSCHPUCZP1-43 e serviu como material de partida para preparo de
vetores de expressão para sintetização dos compostos da fórmula I em célu-
las de *E. coli* K12.

Exemplo 2: construção de um vetor de expressão para AVE (1-43)

US 5496924, os conteúdos dos quais são por meio deste ex-
30 pressamente incluídos no presente pedido através de referência, sugerem
um sistema de expressão que em princípio permite a preparação de proteí-
nas de fusão talhadas. A vantagem do sistema é que proteínas de fusão

com uma pequena parte balastro podem ser preparadas. O sistema de expressão é usado a título de exemplo no pedido. Fusão dos segmentos de sequência A-B por meio da sequência de reconhecimento de enterocinase DDDDK com AVE (1-43) resulta em uma proteína de fusão possuindo a seguinte sequência de gene e sequência de aminoácido (SEQ ID N°. 13 e No. 14):

SEQ ID N°. 13:

5'-GGAAACAGAATTCATGGCGCCGACCTCTTCTTCTACCAAAAAGCTCA
ACTGCAACTGGAACACCTGCTGCTGGACCTGCAGATGATCCTGAACGG
TATCAACAACCTACAAAAACCCGAAACTGACGCGTATCGACGATGACGAT
10 AAACACGGTGAAGGTACCTTCACCTCCGACCTGTCCAAACAGATGGAA
GAAGAAGCTGTTCGTCTGTTCATCGAATGGCTGAAAAACGGTGGTCCG
TCCTCCGGTGCTCCGCCTTCGAAAAAGAAGAAAAAGTGATAATAGCATG
CACGTGCGGCCGCAAGCTTAAAAAA-3'

Os códons ATG e AAG marcam o primeiro e último aminoácido do peptídeo de fusão.

SEQ ID N°. 14:

MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRI DDDDKHGEFT
FTSDLKQME EEAVRLFIEW LKNGGPSSGA PPSKKKKK

A sequência de gene codificada foi preparada através de mecanismo de tecnologia de PCR. Para este propósito, os seguintes iniciadores foram sintetizados:

1) Iniciador psw3_zpcolf (SEQ ID N°. 15):

5'-CGTATCGACGATGACGATAAACACGGTGAAGGTACCTTC-3'

A sequência do iniciador neste caso abrange o sítio de reconhecimento de enterocinase e o início da sequência de codificação de AVE₁₋₄₃.

2) Iniciador psw3_zpcolrev (SEQ ID N°. 16):

5'-GTGTTTATCGTCATCGTCGATACGCGTCAGTTTCGG-3'

A sequência neste caso corresponde a um derivado de sequência sintética de interleucina2 que, tal como mostrado na Tabela I de US 5496924, abrange aminoácidos 34-38 e 2/3 do códon para o aminoácido metionina. O restante da sequência do iniciador sobrepõe-se com iniciador psw3_zpcolf.

3) pBprimef1 (SEQ ID N°. 17):

5'-TGAGCGGATAACAATTTACAC-3'

O iniciador hibridiza-se a montante com o sítio de clivagem de EcoRI que está presente no plasmídeo pK50 (cf. figura 33 em US 5496924).

5 4) psw3_ave_1-43_rev com sítio de clivagem de Hind3 (SEQ ID N°. 18):

5'-TTTTTTAAGCTTGCGGCCGCACGTGCATGCTATTATCACTT

Duas PCRs foram realizadas em paralelo. Uma foi realizada em DNA do plasmídeo pK50 com o par de iniciador pBprimef1 e psw3_zpcolrev em 50°C e a outra reação foi realizada com o par de iniciador psw3_zpcolf e psw3_ave_1-43_rev em 54°C em DNA do plasmídeo pSCHPUCZP1-43. Os rendimentos de PCR foram purificados depois de fracionamento através de eletroforese de gel, e uma alíquota de cada um foram misturadas na relação 1:1 e em seguida reagidas em uma terceira PCR com o par de iniciador pBprimef1 e psw3_ave_1-43_rev. O rendimento de PCR foi reagido com as enzimas EcoR1 e Hind3 e empregado em uma reação de ligase T4 no plasmídeo pK50 que foi aberto em paralelo com estas enzimas. Células E. coli BL21 competentes são transformadas com a mistura de ligação e semeadas em ágar seletivo compreendendo 25 mg/l de ampicilina. DNA de plasmídeo foi reisolado de alguns clones e analisado através de PCR e subsequente análise de sequência de DNA. Plasmídeos corretos recebem o nome pBZP43. Clones de E. coli BL21:pBZP43 são checados quanto à expressão da proteína de fusão. Isto ocorre de uma maneira análoga ao exemplo 14 de US patente 5496924. Os produtos de expressão foram analisados através de espectrometria de massa e através de SDS-PAGE, e o terminal N foi determinado através de análise de sequência de proteína. Um clone adequado para fermentação de maiores quantidades de material foi selecionado.

Exemplo 3: Construção de um vetor de expressão para AVE (1-39)

30 Plasmídeo pBZP43 serve como padrão para a reação PCR realizada com os iniciadores pBprimef1 (exemplo 2) e psw3_ave_39rev. O produto de PCR é reagido com enzimas de restrição EcoRI e NotI de acordo

com a informação do fabricante da enzima, e inserido em uma reação de ligase T4 no plasmídeo pBZP43 aberto com EcoRI/NotI. O resultado é o plasmídeo pBZP39, com o qual, o procedimento descrito no Exemplo 2 é continuado.

5 psw3_ave_39rev (SEQ ID N°. 19):

5'-TTTTTTGCGGCCGCACGTGCATGCTATTATCATTTCTGAAGGCGGAGC
ACC-3'

O triplete TTT codifica lisina na posição 39.

Exemplo 4: construção de um vetor de expressão para AVE (1-38-Arg)

10 Plasmídeo pBZP43 serve como padrão para a reação PCR realizada com os iniciadores pBprimef1 (Exemplo 2) e psw3_ave38_argrev. O produto de PCR é reagido com enzimas de restrição EcoRI e NotI de acordo com a informação do fabricante da enzima, e inserido em uma reação de ligase T4 no plasmídeo pBZP43 aberto com EcoRI/NotI. O resultado é o
15 plasmídeo pBZP38arg, com o qual, o procedimento descrito no Exemplo 2 é continuado.

Iniciador: psw3_ave38_argrev (SEQ ID N°. 20):

5'-TTTTTTGCGGCCGCACGTGCATGCTATTATCATACGCGAAGGCGG
AGCACCG-3'

20 O triplete AGG codifica arginina na posição 39.

Exemplo 5: fermentação das cepas construídas no Exemplo 2-4

A fermentação ocorreu tal como descrito no pedido de patente Alemã DE 10 2004 058306.4, Exemplo 3, com leves diferenças. Células de *E. coli* BL21 transformadas com vários vetores de plasmídeo codificando
25 para derivados alvo de peptídeo (proteína de fusão) foram cultivadas em meio de sal mineral ou meio de complexo (vide Exemplo 1) em 30°C ou 37°C e pH de 7,0 em um fermentador. O pH foi ajustado com uma solução de NH_4^+ (26% em água). A aeração da cultura foi assegurada por uma estratégia de controle que mantinha o oxigênio dissolvido no caldo de cultura
30 constante em 30%. Para processos de batelada de alimentação em mineral sal médio, uma solução de glicose (60% em peso/volume) foi alimentada (8 g/L/h a 26g/L/h). Expressão de proteína foi induzida através de adição de

IPTG (1-4 mM de conc. final (f.c.)). A duração de indução foi 6 a 8 h. Expressão das proteínas alvo foi detectada através de eletroforese de gel de SDS poliacrilamida (SDS-PAGE).

- Expressão de proteína de fusão de precursor de AVE em *E. coli* BL21/pBZP43 foi realizada tal como descrito abaixo:

- 100 µL de suspensão de célula foram removidos da cultura contínua de células de *E. coli* BL21 armazenadas em -80°C e incubados em 0,5 L de meio de pré-cultura com agitação em 37°C durante 10 a 16 h. A cultura principal no fermentador foi inoculada com uma quantidade apropriada de pré-cultura para uma densidade de inoculação de 0,01 a 0,05 OD₆₀₀.

Meio de pré-cultura:

5 g/L de Bacto triptona

10 g/L de extrato de levedura

5 g/L de NaCl

- 15 Meio de cultura principal:

Meio de sal mineral definido (meio mínimo) com base de glicose como fonte de carbono (Jeffrey H. Miller: Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)).

- Depois que a glicose inicialmente presente no meio de cultura principal tinha sido consumida, uma solução de glicose foi alimentada. Expressão de proteína foi induzida através de adição de IPTG (1 mM de f.c.), e a expressão máxima da proteína de fusão depois de indução foi observada. O sistema analítico de SDS-PAGE de Novex (NuPage® Novex 12% gel system, Invitrogen®) foi usado por exemplo, de acordo com informação do fabricante para analisar na fermentação em cada caso 0,02 OD_{600nm} de suspensão de célula removida do fermentador em vários tempos de cultivo.

Exemplo 6: purificação das proteínas de fusão preparadas no Exemplo 5

- 1000 g de biomassa de cepa de *E. coli* recombinante foram res-suspensos em 1000 ml de tampão de Tris (50 mM de Tris/HCl, pH 7,4). As células foram rompidas por homogenização de alta pressão (homogenizador de alta pressão Rannie, 100 MPa (1000 bar) duas vezes. O DNA genômico foi digerido através de adição de Benzonase (1000 U/L) e cloreto de magné-

sio (10 mM) durante 1,5 horas. A proteína de fusão foi purificada através de cromatografia de leito expandido. Para este propósito, o homogeneizado de célula foi diluído a 10 litros com tampão (50 mM de Tris/HCl, pH 7,4) e diretamente carregado em uma coluna de cromatografia (Streamline SP XL, GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão (50 mM de Tris/HCl pH 7,4). Carregamento de amostra foi seguido por uma etapa de lavagem com tampão de equilíbrio (6 volumes de coluna), seguido por uma outra etapa de lavagem com tampão de sal elevado a 7% (50 mM de Tris/HCl pH 7,4; 1 M de NaCl). Eluição ocorreu por lavagem com 10 volumes de coluna de tampão de sal elevado a 20%. A mistura de eluição foi checada através de eletroforese de gel de SDS (NuPage® Novex 12% gel system, Invitrogen) e H-PLC. A mistura de proteína de fusão foi empregada para a reação de clivagem de protease depois de diafiltração em tampão de enterocinase (50 mM de Tris/HCl pH 7,4; 50 mM de NaCl, 2mM de CaCl_2). As proteínas de fusão foram clivadas por enterocinase (Invitrogen) em tampão de enterocinase (20 mM de Tris/HCl, 50 mM de NaCl, 2 mM de CaCl_2 pH 7,4) de acordo com a informação do fabricante.

Exemplo 7: separação dos produtos de clivagem da reação de clivagem de enterocinase

20 Separação dos produtos de clivagem ocorre de acordo com Exemplo 6 de pedido de patente Alemã DE102004058306.4. Clivagem das proteínas de fusão por enterocinase foi seguida por separação dos produtos de clivagem um do outro através de cromatografia de permuta de íon (fonte 30S, Amersham Biosciences). A intensidade iônica da solução foi levada a 25 cerca de 7 mS/cm por diluição com H_2O . Depois que a solução de proteína tinha sido carregada na coluna previamente equilibrada (20 mM de Tris/HCl, pH 7,4; ajustada a uma condutividade de cerca de 7 mS/cm com NaCl), material não ligado foi lavado com tampão B a 15% (20 mM de Tris/HCl, pH 7,4; 500 mM de NaCl). Eluição dos precursores de peptídeo de AVE ocorreu 30 através de aplicação de um gradiente sobre 10 volumes de coluna a tampão B a 100%. Frações contendo precursor de AVE foram identificadas através de eletroforese de gel de SDS, HPLC e espectrometria de massa. As fra-

ções correspondentes foram combinadas, dessalinizadas e, depois de remoção de solvente orgânico, liofilizadas.

Exemplo 8: acoplamento de peptídeo de AVE (1-39) com H-Lys(Boc)-NH₂

0,2 mg de AVE (1-39) (PM 4218; 0,047 μ mol; 1 g/L de concentração final) são pesados em um vaso de reação de polipropileno de 1,5 mL. 11 μ L de tampão de acetato de piridina a 0,1 M de pH 5,6, 60 μ L de uma solução a 129 g/L de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl em tampão de acetato de piridina a 0,1 M de pH 5,6 (contém 7,75 mg de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl = 27,5 μ mols = 585 mols de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl por mol de AVE (1-39)) e 119 μ L de DMF são adicionados. A solução clara é equilibrada em 12°C. A reação é iniciada através de adição de 10 μ L de uma solução de tripsina a 2 g/L em água (contém 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-39)). A solução de reação é incubada em 12°C durante agitação em 1000 min⁻¹. Amostras para controle de processo são tiradas regularmente e paradas através de diluição com 9 vol de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrila e 64% de ácido trifluoroacético. O progresso da reação é seguido por LC-MS. Depois que o rendimento máximo é alcançado, a reação é acidificada a um pH abaixo de 2,5 através de adição de ácido trifluoroacético e é purificado através de cromatografia.

20 Exemplo 9: Acoplamento de peptídeo de AVE (1-43) com H-Lys-NH₂

3,85 mg de AVE (1-43) (PM 4731; 0,814 μ mol; 20 g/L de concentração final) são pesados em um vaso de reação de polipropileno de 1,5 ml. 41 μ L de uma solução de 620 g/L de H-Lys-NH₂.2HCl em tampão de acetato de sódio a 0,1 M de pH 5,8 (contém 25,6 mg de H-Lys-NH₂.2HCl = 117,5 μ mols = 144 mols de H-Lys-NH₂.2HCl por mol de AVE (1-43)), 116 μ L de DMF e 32 μ L de tampão de acetato de sódio a 0,1 M de pH 5,8 são adicionados. A solução clara é equilibrada em 12°C. A reação é iniciada através de adição de 2,9 μ L de uma solução de tripsina de 20 g/L em água (contém 0,06 mg de tripsina = 0,015 g de tripsina por g de AVE (1-43)). A solução de reação é incubada em 12°C durante agitação em 900 min⁻¹. Amostras para controle de processo são tiradas regularmente e paradas por diluição com 9 vol de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrila e 64%

de ácido trifluoroacético. O progresso da reação é seguido por LC-MS. Depois que o rendimento máximo é alcançado, a reação é acidificada a um pH abaixo de 2,5 através de adição de ácido trifluoroacético, e é purificado através de cromatografia.

5 Exemplo 10: acoplamento de peptídeo de AVE (1-39) com H-Lys-NH₂

0,2 mg de AVE (1-39) (PM 4218; 0,047 μ mol; 1 g/L de concentração final) são pesados em um vaso de reação de polipropileno de 1,5 mL. 11 μ L de tampão de acetato de piridina a 0,1 M de pH 5,6, 60 μ L de uma solução a 100 g/L de H-Lys-NH₂.2HCl em tampão de acetato de piridina a 10 0,1 M de pH 5,6 (contém 6,0 mg de H-Lys-NH₂.2HCl = 27,5 μ moles = 585 mols de H-Lys-NH₂.2HCl por mol de AVE (1-39)) e 119 μ L de DMF são adicionados. A solução clara é equilibrada em 12°C. A reação é iniciada através de adição de 10 μ L de uma solução a 2 g/L de tripsina em água (contém 15 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-39)). A solução de reação é incubada em 12°C durante agitação em 1000 min⁻¹. Amostras para controle de processo são tiradas regularmente e paradas através de diluição com 9 vol de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrila e 64% de ácido trifluoroacético. O progresso da reação é seguido por LC-MS. Depois que o rendimento máximo é alcançado, a reação é acidificada a um pH a- 20 baixo de 2,5 através de adição de ácido trifluoroacético e é purificada através de cromatografia.

Exemplo 11: acoplamento de peptídeo de AVE (1-39) com H-Arg-NH₂

0,2 mg de AVE (1-39) (PM 4218; 0,047 μ mol; 1 g/L de concentração final) são pesados em um vaso de reação de polipropileno a 1,5 mL. 25 11 μ L de tampão de acetato de piridina a 0,1 M de pH 5,6, 60 μ L de uma solução a 113 g/L de H-Arg-NH₂.2HCl em tampão de acetato de piridina a 0,1 M de pH 5,6 (contém 6,77 mg de H-Arg-NH₂.2HCl = 27,5 μ moles = 585 mols de H-Arg-NH₂.2HCl por mol de AVE (1-39)) e 119 μ L de DMF são adicionados. A solução clara é equilibrada em 12°C. A reação é iniciada através de adição de 10 μ L de uma solução a 2 g/L de tripsina em água (contém 30 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-39)). A solução de reação é incubada em 12°C durante agitação em 1000 min⁻¹. Amostras para

controle de processo são tiradas regularmente e paradas através de diluição com 9 vol de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrila e 64% de ácido trifluoroacético. O progresso da reação é seguido por LC-MS. Depois que o rendimento máximo é alcançado, a reação é acidificada a um pH abaixo de 2,5 através de adição de ácido trifluoroacético e é purificado através de cromatografia.

Exemplo 12: acoplamento de peptídeo de AVE (1-43) com H-Arg-NH₂

0,25 mg de AVE (1-43) (PM 4731; 0,047 μ mol; 1,1 g/L de concentração final) são pesados em um vaso de reação de polipropileno de 1,5 mL. 11 μ L de tampão de acetato de piridina a 0,1 M de pH 5,6, 60 μ L de uma solução a 113 g/L de H-Arg-NH₂.2HCl em tampão de acetato de piridina a 0,1 M de pH 5,6 (contém 6,77 mg de H-Arg-NH₂.2HCl = 27,5 μ mols = 585 mols de H-Arg-NH₂.2HCl por mol de AVE (1-43)) e 119 μ L de DMF são adicionados. A solução clara é equilibrada em 12°C. A reação é iniciada através de adição de 10 μ L de uma solução a 2 g/L de tripsina em água (contém 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-43)). A solução de reação é incubada em 12°C durante agitação em 1000 min⁻¹. Amostras para controle de processo são tiradas regularmente e paradas através de diluição com 9 vol de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrila e 64% de ácido trifluoroacético. O progresso da reação é seguido por LC-MS. Depois que o rendimento máximo é alcançado, a reação é acidificada a um pH abaixo de 2,5 através de adição de ácido trifluoroacético e é purificada através de cromatografia.

Exemplo 13: acoplamento de peptídeo de AVE (1-38)-Arg com H-Lys-NH₂

0,2 mg de AVE (1-38)-Arg (PM 4246; 0,047 μ mol; 1 g/L de concentração final) são pesados em um vaso de reação de polipropileno de 1,5 mL. 11 μ L de tampão de acetato de piridina a 0,1 M de pH 5,6, 60 μ L de uma solução a 100 g/L de H-Lys-NH₂.2HCl em tampão de acetato de piridina a 0,1 M de pH 5,6 (contém 6,0 mg de H-Lys-NH₂.2HCl = 27,5 μ mols = 585 mols de H-Lys-NH₂.2HCl por mol de AVE (1-38)-Arg) e 119 μ L de DMF são adicionados. A solução clara é equilibrada em 12°C. A reação é iniciada através de adição de 10 μ L de uma solução a 2 g/L de tripsina em água

(contém 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-38)-Arg). A solução de reação é incubada em 12°C durante agitação em 1000 min⁻¹. Amostras para controle de processo são tiradas regularmente e paradas através de diluição com 9 vol de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrila e 64% de ácido trifluoroacético. O progresso da reação é seguido por LC-MS. Depois que o rendimento máximo é alcançado, a reação é acidificada a um pH abaixo de 2,5 através de adição de ácido trifluoroacético e é purificado através de cromatografia.

Exemplo 14: acoplamento de peptídeo de AVE (1-43) com H-Lys(Boc)-NH₂

20 mg de AVE (1-43) (PM 4731; 1,058 μmols; 20 g/L de concentração final) são pesados em um vaso de reação de polipropileno de 2 mL. 370 μL de uma solução a 482 g/L de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl em tampão de citrato de sódio a 0,1 M de pH 5,5 (contém 155 mg de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl = 550 μmols = 130 mols H-Lys(Boc)-NH₂.HCl por mol de AVE (1-43)) e 600 μL de DMF são adicionados. A solução clara é equilibrada em 12°C. A reação é iniciada através de adição de 30 μL de uma solução a 3,3 g/L de tripsina em água (contém 0,1 mg de tripsina = 5 mg de tripsina por g de AVE (1-43)). A solução de reação é incubada em 12°C durante agitação em 1000 min⁻¹. Amostras para controle de processo são tiradas regularmente e paradas por diluição com 9 vol de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrila e 64% de ácido trifluoroacético. O progresso da reação é seguido por LC-MS. Depois que o rendimento máximo é alcançado, a reação é acidificada através de adição de ácido trifluoroacético a uma concentração final de 50% (v/v). Isto para a reação e no mesmo tempo quantitativamente remove o grupo protetor Boc. O produto de reação é purificado através de cromatografia.

Exemplo 15: purificação dos derivados de AVE amidados.

A mistura de reação das reações de acoplamento é subsequente separada através de cromatografia de RP usando Amberchrom CG300 XT 20 como material de suporte, e o peptídeo alvo amidado é subsequente isolado da fração eluída apropriada através de uma etapa de permuta de íon com fonte 30S como suporte. Depois de dessalinização em colunas Amberchrom, o produto é disponível para formulação como me-

dicamento. A identidade da estrutura do produto foi demonstrada através de análise de MALDI-MS e RMN.

Exemplo 16: preparação de Leu-hirudin₁₋₆₅ Lys-Arg-NH₂.

O Exemplo 1 do pedido de patente EP-A 1 216 259 descreve a
 5 preparação de um plasmídeo de expressão que permite a secreção de Leu-
 hirudin em sobrenadantes bacterianos. DNA do plasmídeo é empregado
 como padrão em uma PCR padrão. O iniciador dianteiro usado na reação é
 a seqüência smompaf2 descrita no exemplo. O iniciador reverso usado é um
 oligonucleotídeo hir_lys66_rev (SEQ ID N°.: 21) que possui a seguinte se-
 10 quência:

5' - TTTTAAAGC TTCTATTATT TCTGAAGGTA TTCCTCAGGG - 3'

Hind3

O códon sublinhado na mesma codifica para lisina. A seqüência
 de posição 22 a posição 40 (extremidade) é complementar o segmento de
 15 seqüência 178-195 da seqüência representada na Tabela 1 do pedido EP-A
 1 216 259.

Tal como descrito no exemplo, a PCR é realizada e o produto é
 digerido com as enzimas de restrição EcoR1 e Hind3 e inserido no vetor cor-
 respondentemente aberto pJF118. Depois da caracterização, DNA é trans-
 20 formada em E. coli K12 tal como no Exemplo 11 do pedido de patente EP-A
 1 216 259, e o produto intermediário é expressado e purificado. Em seguida,
 correspondendo ao Exemplo 13 do presente pedido, correspondendo às
 molaridades, a reação ocorre com argininamida para produzir Leu-hirudin₁₋₆₅
 Lys-Arg-NH₂. Se a expressão é realizada diretamente na cepa MC1061 u-
 25 sada como cepa hospedeira intermediária, o produto é encontrado também
 no espaço periplasmático. Isto torna necessário uma ruptura de célula de
 acordo com métodos conhecidos como etapa de preparação adicional para
 isolamento do produto intermediário.

Exemplo 17: análise de reações de acoplamento de peptídeo em derivados
 30 de AVE.

As reações de acoplamento de acordo com os Exemplos 8 a 14
 são seguidas analiticamente através de RP-HPLC em uma coluna de Wa-

- ters de 5 μm , 150 $\times$ 4,6 mm, Symmetry 300. Ácido fórmico (eluente A) a 0,1% (v/v) e acetonitrila com ácido fórmico (eluente B) a 0,1% servem como eluentes. Um gradiente linear de 20 a 50% de B durante 15 min em uma temperatura de coluna de 60°C e uma taxa de fluxo de 1 mL/min é usada
- 5 para eluição. Detecção ocorre em 215 nm. Normalmente 5 μL de uma amostra de reação diluída de 1:25 são injetados. Os derivados de AVE desprotegidos são detectados em tempos de retenção entre 7 e 10 min.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> Método para amidação de polipeptídeos com C-terminais de aminoácido básico por meio de mecanismo de endoproteases específicas

5

<130> DE 2005/042

<140>

<141>

<160> 21

10

<170> PatentIn vide 2.1

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 44

<212> PRT

<213> sequência artificial

15

<220>

<223> descrição da sequência artificial:

derivado de exendina-4

<400> 1

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

20

1

5

10

15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys

35

40

25

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> seqüência artificial

$\langle 220 \rangle$

30

<223> descrição da sequência artificial:

derivado de exendina-4

<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

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys

35

40

5 <210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

10 <223> descrição da sequência artificial:

derivado de exendina-4

<400> 3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1

5

10

15

15 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Arg

35

40

<210> 4

20 <211> 44

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> descrição da sequência artificial:

25 derivado de exendina-4

<400> 4

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

30

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Arg

35

40

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> seqüência artificial

<220>

<223> descrição da seqüência artificial:

5 derivado de exendina-4

<400> 5

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

10 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Arg Lys

35 40

<210> 6

<211> 192

15 <212> DNA

<213> seqüência artificial

<220>

<223> descrição da seqüência artificial: gene para
seqüência ID No. 7

20 <400> 6

ttttttaagc ttgcacggtg aaggtacctt cacctccgac ctgtccaaac agatggaaga 60

agaagctgtt cgtctgttca tcgaatggct gaaaaacggt ggtccgtcct ccggtgctcc 120

gccttcgaaa aagaagaaaa agtgataata gcatgcacgt gcggccgcac ctggtcgacg 180

aattcaaaaa aa 192

25 <210> 7

<211> 44

<212> PRT

<213> seqüência artificial

<220>

30 <223> descrição da seqüência artificial:

derivado de exendina-4

<400> 7

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

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys

35

40

- 5 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>
- 10 <223> descrição da sequência artificial: iniciador
 <400> 8
 tttttttaagc ttgcacggtg aag 23
 <210> 9
 <211> 59
- 15 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> descrição da sequência artificial: iniciador
 <400> 9
- 20 cttccatctg tttggacagg tcggaggtga aggtaccttc accgtgcaag cttaaaaaa 59
 <210> 10
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> sequência artificial
- 25 <220>
 <223> descrição da sequência artificial: iniciador
 <400> 10
 ggacggacca ccgttttttca gccattcgat gaacagacga acagcttctt cttccatctg 60
 tttggacag 69
- 30 <210> 11
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>

- <223> descrição da sequência artificial: iniciador
 <400> 11
 cgtgcatgct attatcactt tttcttcttt ttcgaaggcg gagcaccgga ggacggacca 60
 ccgttttttc 69
- 5 <210> 12
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>
- 10 <223> descrição da sequência artificial: iniciador
 <400> 12
 ttttttgaat tcgtcgacca ggtgcggccg cacgtgcatg ctattatcac tt 52
 <210> 13
 <211> 314
- 15 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> descrição da sequência artificial: gene para
 sequência ID No.14
- 20 <400> 13
 ggaaacagaa ttcattggcgc cgacctcttc ttctaccaa aagctcaact gcaactggaa 60
 cacctgctgc tggacctgca gatgatcctg aacggtatca acaactacaa aaacccgaaa 120
 ctgacgcgta tcgacgatga cgataaacac ggtgaaggta ccttcacctc cgacctgtcc 180
 aaacagatgg aagaagaagc tgttcgtctg ttcattgaat ggctgaaaaa cgggtggtccg 240
 25 tcttcgggtg ctccgccttc gaaaaagaag aaaaagtgat aatagcatgc acgtgcggcc 300
 gcaagcttaa aaaa 314
 <210> 14
 <211> 88
 <212> PRT
- 30 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> descrição da sequência artificial:
 proteína de fusão
 <400> 14

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30
5 Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Gly Glu
35 40 45
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
10 65 70 75 80
Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys
85
<210> 15
<211> 39
15 <212> DNA
<213> sequência artificial
<220>
<223> descrição da sequência artificial: iniciador
<400> 15
20 cgtatcgcgcg atgacgataa acacggtgaa ggtaccttc 39
<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> sequência artificial
25 <220>
<223> descrição da sequência artificial: iniciador
<400> 16
gtgtttatcg tcatcgtcga tacgcgtcag tttcgg 36
<210> 17
30 <211> 22
<212> DNA
<213> sequência artificial
<220>
<223> descrição da sequência artificial: iniciador

<400> 17
 tgagcggata acaatttcac ac 22
 <210> 18
 <211> 41
 5 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> descrição da sequência artificial: iniciador
 <400> 18
 10 ttttttaagc ttgcggccgc acgtgcatgc tattatcact t 41
 <210> 19
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 15 <220>
 <223> descrição da sequência artificial: iniciador
 <400> 19
 ttttttgccg ccgcacgtgc atgctattat catttcgaag gccggagcacc 50
 <210> 20
 20 <211> 52
 <212> DNA
 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> descrição da sequência artificial: iniciador
 25 <400> 20
 ttttttgccg ccgcacgtgc atgctattat catacgcgaa gccggagcac cg 52
 <210> 21
 <211> 40
 <212> DNA
 30 <213> sequência artificial
 <220>
 <223> descrição da sequência artificial: iniciador
 <400> 21
 ttttttaagc ttctattatt tctgaaggta ttcctcaggg 40

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparo de peptídeos di ou polibásicos C-terminalmente amidados da fórmula geral I



5 onde

(AA)_n é um peptídeo consistindo em n aminoácidos do mesmo ou diferente tipo, no qual

AA é um aminoácido ou análogos ou derivados do mesmo;

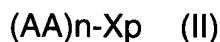
n é um número inteiro entre 3 e 2000; e

10 X é um aminoácido básico ou análogos ou derivados do mesmo;

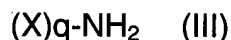
m é um número inteiro entre 2 e 15,

no qual

um composto da fórmula geral II



15 é reagido com um composto da fórmula geral III



na qual AA, n e X são tais como definidos acima, e

p e q são números inteiros, e

p + q = m,

20 na presença de uma enzima possuindo a atividade biológica de tripsina, e onde apropriado o composto resultante da fórmula I é submetido à purificação química de proteína.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que m é um número inteiro entre 2 e 10.

25 3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que m é um número inteiro entre 2 e 6.

4. Processo de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 a 3, em que n é um número inteiro entre 10 e 1000.

5. Processo de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 a 4, em que n é um número inteiro entre 15 e 500.

30 6. Processo de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 a 5, em que n é um número inteiro entre 20 e 400.

7. Processo de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 a 6, em que

a) um peptídeo de fusão que compreende um ou mais compostos da fórmula II como parte do peptídeo de fusão é expressado;

5 b) os compostos da fórmula II são liberados do referido peptídeo de fusão através de clivagem química ou enzimática;

c) o intermediário de etapa b) é, onde apropriado depois de purificação química de proteína, reagido na presença de uma enzima possuindo a atividade biológica de tripsina com um composto da fórmula III; e

10 d) onde apropriado o composto resultante da fórmula I é submetido à purificação química de proteína e isolamento.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que a eliminação do composto da fórmula II da proteína de fusão ocorre através de mecanismo de haleto de cianogênio, enterocinase, fator Xa, Genenase, trombina ou tripsina.

9. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que a proteína de fusão é expressada em um sistema de expressão selecionado do grupo compreendendo *E. coli*, *S. carnosus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* e *S. cerevisiae*.

10. Processo para preparo peptídeos de di ou polibásicos C-terminalmente amidados da fórmula geral I de acordo com uma ou mais reivindicações de 1 a 2, em que os referidos peptídeos da fórmula geral I possuem a atividade biológica de GLP-1 ou derivados ou análogos do mesmo.

25 11. Processo de acordo com quaisquer reivindicações de 1 a 10, em que o composto da fórmula I é caracterizado pela fórmula IV:
HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS(X)m-NH₂ (IV).

12. Processo de acordo com quaisquer reivindicações de 1 a 11, em que o composto da fórmula I é caracterizado pela sequência:
30 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKK-NH₂ (SEQ ID N°.1);
HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK-NH₂ (SEQ ID

Nº. 2);

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKR-NH₂ (SEQ ID

Nº. 3);

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKR-NH₂

5 (SEQ ID Nº. 4) ou

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSRK-NH₂ (SEQ ID

Nº. 5).

13. Composto da fórmula I caracterizado pela seqüência:

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK-NH₂ (SEQ ID

10 Nº. 2);

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKR-NH₂ (SEQ ID

Nº. 3);

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKR-NH₂

(SEQ ID Nº. 4) ou

15 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSRK-NH₂ (SEQ ID

Nº. 5).

14. Uso de um composto como definido na reivindicação 12 como medicamento, especialmente em formulações de depósito.

20 15. Medicamento compreendendo um ou mais dos compostos da fórmula I caracterizado pelas seqüências:

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK-NH₂ (SEQ ID Nº. 2);

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKR-NH₂ (SEQ ID Nº. 3);

25 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKR-NH₂ (SEQ ID Nº. 4) ou

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSRK-NH₂ (SEQ ID Nº. 5).

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA AMIDAR POLIPEPTÍDEOS COM TERMINAIS C DE AMINOÁCIDO BÁSICOS POR MEIO DE ENDOPROTEASES ESPECÍFICAS".

- 5 A presente invenção refere-se a um método para produzir peptídeos dibásicos ou polibásicos amidados de terminal C, consistindo na reação de dois peptídeos na presença de enzimas biologicamente ativas de tripsina e, se necessário, na purificação dos compostos de fórmula (I) desse modo obtidos, por meio de química de proteína.