

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.09.13	(73) Titular(es): SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH BRÜNINGSTRASSE 50 65929 FRANKFURT AM MAIN DE
(30) Prioridade(s): 2005.09.27 DE 102005046113	(72) Inventor(es): FRANK ZOCHER DE CHRISTOPHE SALAGNAD DE SEBASTIAN RISSOM DE PAUL HABERMANN DE LAURE LANDRIC-BURTAİN DE
(43) Data de publicação do pedido: 2008.06.18	(74) Mandatário: ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.09.07 231/2011	

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A AMIDAÇÃO DE POLIPÉPTIDOS COM AMINOÁCIDOS BÁSICOS NA EXTREMIDADE C-TERMINAL RECORRENDO A ENDOPROTEASES ESPECÍFICAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PÉPTIDOS DI OU POLIBÁSICOS AMIDADOS NA EXTREMIDADE C-TERMINAL, EM QUE DOIS PÉPTIDOS SÃO TRANSFORMADOS NA PRESENÇA DE UMA ENZIMA COM A ACTIVIDADE BIOLÓGICA DE TRIPSINA E O COMPOSTO DA FÓRMULA I OBTIDO É, EVENTUALMENTE, PURIFICADO POR QUÍMICA DE PROTEÍNAS.

RESUMO

"PROCESSO PARA A AMIDAÇÃO DE POLIPÉPTIDOS COM AMINOÁCIDOS BÁSICOS NA EXTREMIDADE C-TERMINAL RECORRENDO A ENDOPROTEASES ESPECÍFICAS"

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de péptidos di ou polibásicos amidados na extremidade C-terminal, em que dois péptidos são transformados na presença de uma enzima com a actividade biológica de tripsina e o composto da fórmula I obtido é, eventualmente, purificado por química de proteínas.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA A AMIDAÇÃO DE POLIPÉPTIDOS COM AMINOÁCIDOS BÁSICOS NA EXTREMIDADE C-TERMINAL RECORRENDO A ENDOPROTEASES ESPECÍFICAS"

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de péptidos di ou polibásicos amidados na extremidade C-terminal, em particular tais com a actividade biológica de GLP-1 ou seus análogos ou derivados.

A estabilidade, disponibilidade biomédica e duração de acção de péptidos e proteínas relevantes em termos farmacêuticos depende, em elevada magnitude, da natureza da extremidade N- ou C-terminal da molécula. O tempo de semi-vida de biomoléculas é nitidamente influenciado pelo prolongamento da extremidade C-terminal com aminoácidos básicos. É possível alcançar eficácias farmacêuticas particularmente boas quando, no caso de um prolongamento da extremidade C-terminal com mais de um aminoácido básico, o aminoácido na posição final na extremidade C-terminal é uma aminoamida.

Tais substâncias activas à base de péptidos podem ser preparadas, quando os péptidos são suficientemente pequenos, directamente por via de uma síntese química completa de acordo com um protocolo de síntese de Merrifield modificado. Daí resultam contudo limitações quando são necessárias grandes quantidades de um tal péptido. Deste modo, os aminoácidos a empregar na síntese têm de ser, em primeiro lugar, preparados e

purificados de modo a serem adequados como reagentes na síntese peptídica, subsequentemente, após modificação química. Após a remoção dos grupos de protecção no final da síntese, o péptido alvo ou o produto pode ser depois purificado e formulado como produto farmacêutico. Na síntese, consoante a formulação do péptido, efeitos adjacentes podem, além disso, levar a restrições de rendimento, racemização ou à formação de produtos secundários, devido ao acoplamento errático nos passos individuais de acoplamento, o que pode influenciar negativamente o rendimento total ou a pureza do produto. A síntese total é demasiado complicada para a preparação de quantidades maiores de produto valorizável. A preparação por via de processos alternativos, em particular biotecnológicos seria portanto desejável.

Conhecem-se, desde há muito, enzimas capazes de amidar a extremidade C-terminal de péptidos. Estas enzimas são denominadas (Eipper *et al.* Mol. Endocrinol. 1987 Nov; 1 (11): 777) enzimas de alfa-amidação de peptidilglicina (PAM). A preparação e purificação de tais enzimas PAM é corrente para o especialista e está detalhadamente descrita (M. Nogudi *et al.* Prot. Expr. Purif. 2003, 28: 293). A preparação é contudo onerosa em relação à preparação de outras enzimas tecnológicas, tais como, p. ex., tripsina ou carboxipeptidase.

Uma alternativa à amidação "*in vitro*" por via de PAM emerge quando se recorre à coexpressão da enzima com a proteína precursora a amidar na mesma célula hospedeira. Isto pode ser alcançado introduzindo-se, na célula hospedeira, uma sequência genética que codifica para uma actividade PAM sob controlo de uma sequência reguladora específica do hospedeiro. Esta sequência de expressão pode estar incorporada estavelmente na

respectiva sequência cromossomal de ADN ou estar presente num segundo plasmídeo paralelamente ao plasmídeo de expressão para a proteína alvo, ou estar integrada no mesmo vector como segunda cassette de expressão, ou estar clonada numa abordagem policistronica da expressão, em fase com a sequência genética, que codifica a proteína alvo sob controlo da mesma sequência de promotor. Os rendimentos descritos são contudo reduzidos, de modo que a preparação de grandes quantidades só é possível através de volumes de fermentação correspondentes. Isto conduz a uma purificação onerosa mais complicada. Além disso, a amidação não ocorre de forma quantitativa, de modo que é necessário separar a proteína valorizável amidada, da não amidada. Se a decisão recair sobre um processo de preparação por secreção (p. ex. Hong *et al.*, Appl Biochem Biotechnol. 2003; 110, pág. 113-23) é necessário ter em consideração o facto de as proteínas com uma extremidade C-terminal polibásica serem segregadas apenas numa magnitude muito reduzida, ou não o serem de todo.

Um método adicional para a amidação baseia-se no aproveitamento de mecanismos de auto-dissociação específicos das proteínas (Cottingham *et al.* Nature Biotech. vol. 19, 974-977, 2001). Contudo esta reacção não é fácil de controlar e pode levar a uma trans-tioesterificação e, com isto, à formação de produtos indesejados. A fracção relativamente grande de proteína de fusão pode ter efeitos adversos relativamente ao rendimento.

Os processos de amidação descritos acima partem de uma extremidade C-terminal da proteína alvo prolongada com, pelo menos, um aminoácido glicina ou alternativamente um péptido de inteína. Os péptidos que comportam uma lisina na extremidade C-terminal, se não contiverem nenhuma lisina adicional ou

arginina no decurso adicional da sequência, podem ser preparados na forma de estrutura multimérica que pode ser subsequentemente convertida na unidade monomérica por digestão com tripsina, ou com enzimas semelhantes à tripsina. Por este meio é possível alcançar elevados rendimentos. Isto não é possível no caso dos processos descritos acima.

Os processos de preparação biotecnológicos conhecidos estão deste modo associados a desvantagens e o objectivo de preparar péptidos ou proteínas, que comportem mais que um aminoácido básico, lisina ou arginina, na extremidade C-terminal e que estejam amidados na posição final, de forma económica em grandes quantidades, ainda não pode ser considerado como satisfatoriamente solucionado.

Um processo de preparação alternativo emergiria se fosse possível preparar grandes quantidades de um precursor da proteína alvo truncado em, pelo menos, um aminoácido básico e prolongando este subsequentemente, numa semi-síntese catalisada enzimaticamente, com uma lisinamida ou argininamida.

Levin *et al.* (Biochemical Journal 63:308-16; 1956) descrevem o efeito de tripsina sobre a lisinamida e diversos péptidos de poli-lisinamida. Os resultados dos autores mostram que os derivados de lisinamida sob influência de tripsina não são transformados em derivados de lisina de peso molecular mais elevado dado que a hidrólise das amidas formadas intermediamente, formando ácido livre, ocorre rapidamente quando comparada com a reacção de acoplamento. Daí conclui-se necessariamente que processos semi-sintéticos catalisados com tripsina, que prevêm a preparação de péptidos com poli-lisinamida ou poli-argininamida, ou sequências mistas

poli-Lys/Arg, localizada na extremidade C-terminal não têm qualquer sucesso ou têm-no com rendimentos reduzidos.

Descobriu-se agora um processo de química de péptidos que, surpreendentemente com elevados rendimentos (isto é, >30%), permite a ligação, catalisada por tripsina, de aminoácidos básicos amidados, seus análogos ou derivados, a péptidos que apresentam um aminoácido básico na extremidade C-terminal.

Além disso, foi possível verificar surpreendentemente que, no caso do processo de acordo com a invenção, a introdução de grupos de protecção (comparar Pitraschke *et al.*, Tetrahedron: Asymmetry 9, pág. 1505-1518, 1998) tais como, p. ex., -Boc (t-butiloxicarbonilo), -Z (benziloxicarbonilo) ou -DDZ (dimetilfenilpropiloxi-carbonilo) nos aminoácidos básicos amidados (lisinamida, argininamida) não conduz a uma melhoria da reacção de ligação em termos de eficiência e selectividade. O processo de acordo com a invenção oferece assim a vantagem de permitir dispensar o mascaramento com grupos de protecção, o que permite evitar perdas de rendimento devidas à remoção do grupo de protecção e a eliminação de reagentes tóxicos. Advêm daqui enormes vantagens em termos de custos do processo face à síntese química total.

Thorkildsen *et al.* (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 307, N°. 2, 490-496, 2003) descrevem que o agonista ZP10A do receptor do "péptido 1 semelhante à glucagina" reforça a expressão de ARNm de insulina e impede a progressão da diabetes em ratinhos db/db.

Na patente europeia N° 0490249 é descrito um processo para a preparação de factor libertador de hormona do crescimento

GRF(1-44)-NH₂, no qual o GRF (1-43)-OH é transformado com Leu-NH₂ na presença de tripsina.

Schellenberger *et al.* (*Advances in the Biosciences*, vol. 65, 159-166, 1987) descrevem estudos sobre a caracterização da especificidade da subunidade S'' de proteases de serina em sínteses controladas cineticamente.

Um objecto da invenção é assim um processo para a preparação de péptidos di ou polibásicos amidados na extremidade C-terminal da fórmula geral I

(AS)-X-NH₂ (I),

em que

AS é um péptido caracterizado pela sequência

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNNGG PSSGAPPSKK KKKK-NH₂

(SEQ ID N° 1);

ou

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNNGG PSSGAPPSKK KKKR-NH₂

(SEQ ID N° 4)

e

X é lisina ou arginina;

em que um péptido caracterizado pela sequência

HGEGTFTSDL SKQMEEEA VR LFIEWLKNNGG PSSGAPPSKK KKK

(SEQ ID N° 7)

é transformado com H-Arg-NH₂ ou H-Lys-NH₂ na presença de uma enzima com a actividade biológica de tripsina, em que a enzima tem a capacidade de dissociar uma ligação peptídica C-terminal para formar aminoácidos básicos e o composto obtido da fórmula I é, eventualmente, purificado por química de proteínas.

É, além disso, objecto da invenção, um processo descrito acima em que, no caso da preparação do péptido caracterizado pela sequência SEQ ID N° 1, a relação molar do péptido caracterizado pela sequência SEQ ID N° 7 e H-Lys-NH₂ perfaz 1:44 e, no caso da preparação do péptido caracterizado pela sequência SEQ ID N° 4, a relação molar do péptido caracterizado pela sequência SEQ ID N° 7 e H-Arg-NH₂ perfaz 1:585.

É, além disso, objecto da invenção, um processo descrito acima, em que

- a) se expressa um péptido de fusão que contém um péptido caracterizado pela sequência ID N° 7;
- b) o péptido caracterizado pela sequência ID N° 7 é libertado do dito péptido de fusão por meio de dissociação enzimática;
- c) o produto intermédio do passo b) é transformado, eventualmente após purificação por química de proteínas, com H-Lys-NH₂ ou H-Arg-NH₂ na presença de uma enzima com a actividade biológica de tripsina; e

d) o composto obtido, caracterizado, em termos de péptidos, pelas sequências SEQ ID N° 1 ou 4 da fórmula I, é, eventualmente, purificado por química de proteínas e isolado.

É, além disso, objecto da invenção, um processo descrito acima, em que os ditos péptidos da fórmula geral I apresentam a actividade biológica de GLP-1, ou seus derivados ou análogos.

É, além disso, objecto da invenção, um processo descrito acima, em que a dissociação da proteína de fusão ocorre por meio de enterocinase, factor Xa, Genenase, trombina ou tripsina.

É, além disso, objecto da invenção, um processo descrito acima, em que a proteína de fusão é expressa num sistema de expressão seleccionado do grupo contendo *E.coli*, *S.carnosus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas flueorescens*, *K.lactis*, *P.pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* e *S.cerevisiae*.

No sentido da presente invenção significam:

O termo "análogo" de um aminoácido significa um aminoácido de ocorrência natural que não está codificado no código genético, mas que é adequado para ser incorporado numa cadeia peptídica. São exemplos para análogos de um aminoácido, a ornitina e citrulina e também todos os outros aminoácidos que não ocorrem naturalmente, que comportem uma qualquer função básica na cadeia lateral, tal como, p. ex., ácido 2,4-diaminobutanóico; 3-metil-ornitina; 4-metil-ornitina, 5-aminoleucina; 4-amino-leucina; 3-amino-leucina; 5-amino-norleucina; 4-amino-norleucina; 3-amino-norleucina;

undecanilo, dodecanilo, tridecanilo, tetradecanilo (miristilo), pentadecanilo, hexadecanilo, heptadecanilo, octadecanilo (estearilo), nonadecanilo, eicosanilo, dicosanilo, 9,11-dimetil-tridecanilo, 11-metiltridecanilo.

Além disso, um tal grupo é um grupo C(O)-fenil-(C₅-C₈)heteroaril-fenilo, C(O)-bifenilo ou C(O)-terfenilo, em que os grupos fenilo, bifenilo, terfenilo ou heteroarilo não estão substituídos ou estão substituídos com um ou dois grupos seleccionados do grupo alquilo(C₁-C₁₀) ou O-alquilo(C₁-C₁₀). Em resíduos fenilo monossustituídos o substituinte pode encontrar-se na posição 2, na posição 3 ou na posição 4. Fenilo substituído duas vezes pode estar substituído na posição 2,3, posição 2,4, posição 2,5, posição 2,6, posição 3,4 ou posição 3,5. Em resíduos fenilo substituídos três vezes os substituintes podem encontrar-se 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. Heteroarilo significa, por exemplo, furanilo, tienilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, indolilo, indazolilo, quinolilo, isoquinolilo, ftalazinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo e cinolinilo.

O termo "aminoácido básico" significa lisina, arginina, ou seus derivados ou análogos, tais como, p. ex., ornitina ou citrulina, de um modo preferido, lisina ou arginina, em particular, lisina. Neste caso, a lisina ou arginina podem estar derivatizadas, em vez do grupo carboxamida, com um ou vários de um outro grupo reactivo, seleccionado em particular do grupo de éster de aminoácido, éster de péptido, anidrido e halogeneto e

ser correspondentemente empregues no processo de acordo com a invenção.

O termo "enzima com a actividade biológica de tripsina" significa, a par das tripsinas conhecidas e disponíveis comercialmente provenientes de fontes convencionais tais como, de rato, bovino, porco, ser humano, cão, murganho, suas isoenzimas, derivados ou variantes, também enzimas com propriedades bioquímicas fortemente relacionadas, tais como, p. ex. catepsina, tripsina de *Fusarium oxisporum* e de *Streptomyces* (*S. griseus*, *S. exfoliatus*, *S. erythraeus*, *S. fradiae* e *S. albidoflavus*), triptase, mastina, acrosina, calicreína, hepsina, prostasina I, lisil endopeptidase (Lys-C) e endoproteínase-Arg-C (clostripaína).

Neste caso, é claro para o especialista que esta enumeração não é definitiva e que, no âmbito na investigação biotecnológica são descobertas continuamente outras enzimas, isoenzimas, derivados ou variantes, capazes de dissociar especificamente a extremidade C-terminal a aminoácidos básicos. Alternativamente é possível alterar a especificidade de enzimas mediante modificação péptido-química ou mutação ao nível do ADN (muteínas). Além disso, a especificidade e actividade de enzimas podem ser modificadas marcadamente mediante a selecção adequada das condições reaccionais.

Na forma de realização preferida do processo de acordo com a invenção aproveita-se a capacidade de microrganismos de produzir péptidos heterólogos. Para o efeito, traduz-se a sequência peptídica desejada para a sequência de ADN correspondente, que é acoplada a uma sequência promotora específica do hospedeiro. Consoante a estratégia de expressão, é

possível, neste caso, exprimir o péptido alvo de um modo tal, que este seja formado directa ou indirectamente pelas células como péptido de fusão, permanecendo intracelularmente.

Quando se opta por uma estratégia de fusão, recorrendo-se a um péptido de fusão adequado, então é claro para o especialista que os parceiros de fusão têm de estar ligados entre si por via de um ligante que permita a dissociação específica dos parceiros, de um modo tal que a extremidade N-terminal da proteína alvo esteja presente após o processamento. No sentido da presente invenção o péptido alvo é um composto da fórmula II. Existe um grande número de possibilidades para a configuração de ligantes adequados, que o especialista conhece, e que aumentam continuamente. Quando se opta, p. ex., pelo aminoácido metionina, então é possível uma dissociação química com halogeneto cianogénico. Quando se opta, p. ex., por um pentapéptido com a sequência DDDDK como ligante, então é possível uma dissociação com enterocinase. Quando se opta, p. ex., pela sequência tetrapeptídica IEGR, então a dissociação pode efectuar-se por via do factor Xa. Com uma configuração apropriada, pode utilizar-se Genenase® como enzima de processamento para péptidos cuja extremidade N-terminal começa com histidina. Se a extremidade N-terminal for caracterizada pelo dipéptido Gly-Ser, pode optar-se pelo tetrapéptido LVPR como ligante, de modo a originar um local de reconhecimento e de dissociação para a trombina. Embora, de acordo com a invenção, para o acoplamento peptídico, seja empregue uma enzima com a actividade biológica de tripsina, o emprego de uma tal enzima é já possível, por princípio, neste momento do processo de acordo com a invenção. Assim, pode usar-se, em primeiro lugar, tripsina em meio aquoso para a dissociação da parte de fusão do péptido

de fusão, desde que a lisina ou arginina esteja inserida como ligante entre a parte de fusão e o péptido alvo.

Alternativamente também é possível segregar o péptido alvo para o meio de cultura celular, quando este é compatível com exportação, na forma de uma proteína de fusão ou na sua forma nativa. Para o efeito, podem utilizar-se células hospedeiras recombinantes, em particular as de microrganismos, de um modo preferido de bactérias ou leveduras. Quando se opta por células bacterianas como sistema de expressão, tem-se ainda a opção de segregar directamente o péptido alvo ou um péptido de fusão correspondente, o qual compreende o péptido alvo, isto é, no sentido da invenção, um composto da fórmula II, para o periplasma ou para o meio de cultura. Neste caso, é claro para o especialista que a exportação é frequentemente restringida quando a extremidade C-terminal consiste de mais de um aminoácido básico.

O especialista conhece os organismos hospedeiros e métodos em princípio disponíveis para o efeito (comparar, p. ex., Gellissen, Gerd (ed.) *Production of Recombinant Proteins*, ISBN 3-527-31036-3). Em grande parte, estes também podem ser obtidos comercialmente, junto de um grande número de fornecedores. Mencionam-se, a título representativo, as firmas New England Biolabs, Invitrogen e Roche. Nas descrições dos catálogos de tais firmas encontram-se citações da literatura que proporcionam uma visão geral sobre a tecnologia. Para o especialista é contudo claro, neste caso, que o espectro dos microrganismos a utilizar aumenta continuamente, bem como o repertório de métodos biotecnológicos. As formas de realização mais específicas, deste ponto de vista, são também compreendidas pelo objecto da presente invenção.

A título representativo mencionam-se, a título de exemplo, os seguintes sistemas hospedeiro/de vector: bactérias do tipo *E. coli*, *S. carnosus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis* ou *Pseudomonas*, em particular *Pseudomonas fluorescens*, bem como leveduras do tipo *K. lactis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* e *S. cerevisiae*.

O especialista tem contudo consciência que estes sistemas mencionados, a título de exemplo, oferecem um grande número de possibilidades de variação que resultam, p. ex., da escolha de promotores adequados ou de outras sequências nucleotídicas reguladoras, das propriedades genéticas da célula hospedeira e dos vectores utilizados (p. ex. no que diz respeito ao número de cópias do ADN, à escolha do meio de selecção etc.).

O especialista tem igualmente consciência que, para cada péptido alvo, caso se pretenda preparar o mesmo na forma isolada, é necessário adaptar um processo específico para a purificação com base nas suas propriedades físico-químicas. Isto é alcançado, por princípio, através da combinação adequada de métodos de separação bioquímicos ou biofísicos conhecidos. Neste caso, é igualmente claro que se criam continuamente novas possibilidades, com base em materiais inovadores (p. ex. para a cromatografia), para alcançar ou otimizar o sucesso de purificação desejado.

Vantajosamente, no sentido da presente invenção, a fusão do péptido precursor pode ser feita com uma sequência peptídica que permita, p. ex., uma purificação por cromatografia de afinidade.

Para um desenvolvimento adicional da invenção preparam-se, a título de exemplo, derivados de exendina, tais como estes são

conhecidos a partir do documento US2004/0106547. Tais péptidos derivados de exendina podem, em virtude do seu efeito redutor da glicose sanguínea, desempenhar um papel importante no desenvolvimento de medicamentos no tratamento de diabetes ou outros distúrbios metabólicos que conduzem, p. ex., à obesidade. No sentido farmacêutico é, por conseguinte, sensato disponibilizar tais péptidos de forma suficiente.

O pedido de patente internacional WO 02/066628 descreve um derivado de hirudina, que termina na extremidade C-terminal com os aminoácidos Lys-Arg. O perfil de acção antitrombótico é passível de ser alterado por amidação da arginina C-terminal. Para o efeito, prepara-se o precursor que termina na extremidade C-terminal com lisina e realiza-se, subsequentemente, de acordo com a invenção, uma reacção de acoplamento com argininamida, o que origina o derivado de hirudina amidado. A preparação dos precursores pode efectuar-se, tal como descrito no pedido, por via da secreção de leveduras. Para o efeito, prolonga-se, a título de exemplo, a sequência genética descrita no documento EP-A-0324712 para Leu-hirudina com um codão para lisina e continua-se com o processo tal como descrito, a título de exemplo no documento de patente, para a preparação da hirudina prolongada com uma lisina. Alternativamente pode-se seguir também a via da secreção do precursor por bactérias. Para o efeito, pode utilizar-se, p. ex., a tecnologia descrita no pedido de patente EP-A 1216259.

Os exemplos seguintes servem para ilustrar a presente invenção e não devem, de modo algum, ser interpretados como limitativos em relação aos objectivos da presente invenção.

Exemplo 1: Síntese de uma sequência de ADN específica para *E. coli* codificante para AVE (1-43)

Em primeiro lugar preparou-se a sequência genética SEQ ID N°. 6 codificante para o péptido AVE (1-43) (SEQ ID N° 7):

SEQ ID N° 6:

```
TTTTTTAAGCTTGCACGGTGAAGGTACCTTCACCTCCGACCTGTCCAAACAGATG  
GAAGAAGAAGCTGTTTCGTCTGTTTCATCGAATGGCTGAAAAACGGTGGTCCGTCCT  
CCGGTGCTCCGCCTTCGAAAAAGAAGAAAAAGTGATAATAGCATGCACGTGCGG  
CCGCACCTGGTCGACGAATTCAA AAAA
```

SEQ ID N° 7:

```
HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNNGG PSSGAPPSKK KKK
```

A síntese da sequência genética efectuou-se por meio de tecnologia de PCR. Para o efeito prepararam-se os seguintes 5 iniciadores por meio de síntese química de ADN. Efectuou-se esta síntese por meio do sistema de síntese de ADN Expedite[™], firma Applied Biosystems).

a) O iniciador zp5u tem a sequência (SEQ ID N° 8):

5'- TTTTTTAAGCTTGCACGGTGAAG -3'

A SEQ ID N° 8 compreende a região 1-23 da cadeia sentido ("sense"). O triplete CAC codifica histidina como primeiro aminoácido da proteína alvo.

b) O iniciador zp3a tem a sequência (SEQ ID N° 9):

**5'-CTTCCATCTGTTTGGACAGGTCCGGAGGTGAAGGTACCTTCACCGTG
CAAG CTAAAAAA-3'**

A SEQ ID N° 9 compreende a região 1-59 da cadeia antissentido ("antisense").

- c) O iniciador zp3b tem a sequência (SEQ ID N° 10):

**5'-GGACGGACCACCGTTTTTCAGCCATTCGATGAACAGACGAACAGCT
TCTTCTTCCATCTGTTTGGACAG -3'**

A SEQ ID N° 10 compreende a região 40-108 da cadeia antissentido ("antisense").

- d) O iniciador zp3c tem a sequência (SEQ ID N° 11):

**5-CGTGCATGCTATTATCACTTTTTCTTCTTTTTCGAAGGCGGAGCACC
GGAGGACGGACCACCGTTTTTC-3'**

A SEQ ID N° 11 compreende a região 91-159 da cadeia antissentido ("antisense").

O tripleto antissentido CTT codifica o último aminoácido (AS43) da proteína alvo.

- e) O iniciador zp3d tem a sequência (SEQ ID N° 12):

**5'-TTTTTTGAATTCGTCGACCAGGTGCGGCCGCACGTGCATGCTATTA
TCACTT-3'**

A SEQ ID N° 12 compreende a região restante da cadeia antissentido (“antisense”).

Realizaram-se 4 reacções de PCR consecutivas com os iniciadores, sob condições padrão a 54 °C. Na reacção 1 empregaram-se, respectivamente, 100 ng dos iniciadores zp3a e zp5u. O número de ciclos da PCR foi de 5. Na segunda reacção transformou-se 1/40 da reacção com 100 ng dos iniciadores zp5u e zp3b, respectivamente, em 10 ciclos. Na reacção 3 transformou-se, em 10 ciclos adicionais, 1/40 do produto da reacção 2 com 100 ng dos iniciadores zp5u e zp3c, respectivamente. Para finalizar sintetizou-se o fragmento de ADN desejado, em 25 ciclos de PCR, com 1/40 do rendimento proveniente da reacção 3 e os iniciadores zp5u e zp3d, cujo comprimento foi controlado por electroforese em gel. Purificou-se o fragmento desejado de ADN e transformou-se com as enzimas de restrição EcoR1, e subsequentemente com Hind3, segundo as indicações do fabricante (New England Biolabs).

Paralelamente transformou-se ADN do plasmídeo pUC19 (New England Biolabs) com as enzimas EcoR1 e Hind3. Separaram-se os fragmentos das misturas de dissociação sobre um gel de agarose a 1,2% e isolou-se subsequentemente o fragmento restante do vector de pUC19 e o produto desejado proveniente da reacção 4. Ligaram-se, entre si, os fragmentos purificados numa reacção com T4 ligase, durante a noite a 16 °C. Subsequentemente transformaram-se células *E. coli* competentes (Stratagene, estirpe *E. coli* XL10 Gold), com a mistura de ligação e plaqueou-se sobre placas de agar contendo 25 mg/L de ampicilina. Isolou-se o ADN plasmídico a partir dos clones individuais e caracterizou-se por meio de análise de sequências de ADN.

O ADN plasmídico do fragmento desejado obteve a designação de pSCHPUCZP1-43 e serviu como material de partida para a preparação de vectores de expressão para a síntese dos compostos da fórmula I em células K12 de *E.coli*.

Exemplo 2: Construção de um vector de expressão para AVE (1-43)

O documento US5496924, cujo conteúdo é com isto expressamente incluído, por referência, no presente pedido, propõe um sistema de expressão que permite, por princípio, a preparação de proteínas de fusão cortadas à medida. A vantagem do sistema reside no facto de permitir preparar proteínas de fusão com uma pequena proporção de lastro. O sistema de expressão é utilizado, a título de exemplo, no pedido. Ao fundir-se os segmentos da sequência A-B por via da sequência de reconhecimento da enterocinase DDDDK com AVE (1-43), obtém-se uma proteína de fusão, com a seguinte sequência de gene e de aminoácido (SEQ ID N° 13 e N° 14):

SEQ ID N° 13:

**5'-GGAAACAGAATTCATGGCGCCGACCTCTTCTTCTACCAAAAAGCTCAACTG
CAACTGGAACACCTGCTGCTGGACCTGCAGATGATCCTGAACGGTATCAACA
ACAAAACCCGAAACTGACGCGTATCGACGATGACGATAAACACGGTGAAGGTAC
CTTCACCTCCGACCTGTCCAAACAGATGGAAGAAGAAGCTGTTTCGTCTGTTTCATC
GAATGGCTGAAAAACGGTGGTCCGTCCTCCGGTGCTCCGCCTTCGAAAAAGAAG
AAAAAGTGATAATAGCATGCACGTGCGGCCGCAAGCTTAAAAA-3'**

Os codões ATG e AAG marcam o primeiro e o último aminoácido do péptido de fusão.

SEQ ID N° 14:

**MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRI DDDDKHGEGT
FTSDLSKQME EEAVRLFIEW LKNGGPSSGA PPSKKKKK**

A preparação da sequência genética codificante efectuou-se por meio de tecnologia de PCR. Para o efeito sintetizaram-se os seguintes iniciadores:

1) iniciador psw3_zpcolf (SEQ ID N° 15):

5'-CGTATCGACGATGACGATAAACACGGTGAAGGTACCTTC-3'

A sequência do iniciador cobre, neste caso, o local de reconhecimento da enterocinase e o início da sequência codificante AVE 1-43.

2) iniciador psw3_zpcolrev (SEQ ID N° 16):

5'-GTGTTTATCGTCATCGTCGATACGCGTCAGTTTCGG-3'

A sequência corresponde, neste caso, a uma sequência sintética derivada de interleucina 2 que, de acordo com a tabela I do documento US5496924, cobre os aminoácidos 34-38, bem como 2/3 do codão para o aminoácido metionina. O resto da sequência do iniciador sobrepõe-se com o iniciador psw3_zpcolf.

3) pBprimef1 (SEQ ID N° 17):

5'-TGAGCGGATAACAATTTACAC-3'

O iniciador hibrida a montante com o local de corte da EcoRI que está contido no plasmídeo pK50 (comparar a Fig. 33 do documento US5496924).

4) psw3_ave_1-43_rev com local de corte Hind3 (SEQ ID N° 18):

5'-TTTTTTAAGCTTGCGGCCGCACGTGCATGCTATTATCACTT

Realizaram-se duas PCR paralelamente. Uma foi realizada sobre o ADN do plasmídeo pK50 com o par de iniciadores pBprimef1 e psw3_zpcolrev a 50 °C e a outra reacção com o par de iniciadores psw3_zpcolf e psw3_ave_1-43_rev, a 54 °C, sobre o ADN do plasmídeo pSCHPUCZP1-43. Purificaram-se os rendimentos da PCR após fraccionamento por electroforese em gel, misturou-se respectivamente uma alíquota na relação 1:1 e subsequentemente transformou-se numa terceira PCR com o par de iniciadores pBprimef1 e psw3_ave_1-43_rev. Transformou-se o rendimento da PCR com as enzimas EcoR1 e Hind3 e, numa reacção com a ligase T4, introduziu-se no plasmídeo pK50 aberto em paralelo com estas enzimas. Transformam-se células *E. coli* BL21 competentes com a mistura de ligação e plaqueiam-se sobre agar selectivo, que continha 25 mg/L de ampicilina. Reisolou-se plasmídeo ADN de alguns clones e analisou-se por meio de PCR e subsequente análise de sequências de ADN. Os plasmídeos correctos obtêm o nome pBZP43. Testam-se os clones de *E. coli* BL21:pBZP43 quanto à expressão da proteína de fusão. Isto é feito de modo análogo ao exemplo 14 da patente US5496924. Analisaram-se os produtos de

expressão por espectrometria de massa e por via de SDS-PAGE e determinou-se a extremidade N-terminal por meio de análise de sequências de proteínas. Selecionou-se um clone adequado para a fermentação de maiores quantidades de material.

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

O plasmídeo pBZP43 serve como molde para a reacção de PCR, que é realizada com os iniciadores pBprimef1 (Ex.2) e psw3_ave_39rev. Transforma-se o produto da PCR com as enzimas de restrição EcoRI e NotI de acordo com as indicações do fabricante de enzimas e, numa reacção com a T4 ligase, insere-se no plasmídeo pBZP43 aberto com EcorI/NotI. Isto origina o plasmídeo pBZP39 com o qual se continua o processo tal como descrito no exemplo 2.

psw3_ave_39rev (SEQ ID N° 19):

5'-TTTTTTGCGGCCGCACGTGCATGCTATTATCATTTCGAAGGCGGAGCACCC-3'

O tripleteo TTT codifica lisina na posição 39.

Exemplo 4: Construção de um vector de expressão para AVE (1-38-Arg)

O plasmídeo pBZP43 serve como molde para a reacção de PCR, que é realizada com os iniciadores pBprimef1 (Ex. 2) e psw3_ave38_argrev. Transforma-se o produto da PCR com as enzimas de restrição EcoRI e NotI de acordo com as indicações do

fabricante de enzimas e insere-se, numa reacção com a T4 ligase, no plasmídeo pBZP43 aberto com EcoRI/NotI. Isto origina o plasmídeo pBZP38arg com o qual se continua o processo tal como descrito no exemplo 2.

Iniciador: psw3_ave38_argrev (SEQ ID N° 20):

**5'-TTTTTTGCGGCCGCACGTGCATGCTATTATCATACGCGAAGGCGGAGC
ACCG-3'**

O triplete AGG codifica arginina na posição 39.

Exemplo 5: Fermentação das estirpes construídas no exemplo 2-4

A fermentação efectuou-se com pequenas diferenças relativamente ao descrito no pedido de patente alemão DE 102004058306.4, Ex. 3. Num fermentador, cultivaram-se células *E. coli* BL21, transformadas com diversos vectores plasmídicos codificantes para derivados (proteína de fusão) do péptido alvo, em meio de sal mineral ou meio complexo (ver exemplo 1) a 30 °C ou 37 °C e um valor de pH de 7,0. O ajuste do pH efectuou-se com uma solução de NH₄ (26% em água). O arejamento da cultura foi garantido através de uma estratégia de regulação que manteve o oxigénio constante a 30%, dissolvido no caldo de cultura. Para processos de alimentação em lotes em meio de sal mineral, terminada a fase do lote, forneceu-se uma solução de glucose (60% p/v) (8 g/L/h a 26 g/L/h). A indução da expressão de proteínas efectuou-se mediante a adição de IPTG (conc. final (c.f.) 1-4 mM). A duração da indução perfez 6-8 h. Detectou-se a

expressão das proteínas alvo por electroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).

A expressão de precursores de proteína de fusão AVE em *E. coli* BL21/pBZP43 foi realizada tal como descrito em seguida:

Retiraram-se 100 µL de suspensão de células da cultura contínua de células *E. coli* BL21 armazenada a -80 °C e incubou-se durante 10-16 h, em agitação, em 0,5 L de meio de pré-cultura a 37 °C. Inoculou-se a cultura principal no fermentador com a quantidade correspondente de pré-cultura até 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 extracto de levedura
5 g/L de NaCl

Meio de cultura principal:

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

Consumida a glucose existente inicialmente no meio da cultura principal, forneceu-se uma solução de glucose. Induziu-se a expressão de proteínas mediante a adição de IPTG (1 mM f.c.) e observou-se a expressão máxima da proteína de fusão após a indução. Recorrendo-se, p. ex., ao sistema de análise por SDS-PAGE da firma Novex (NuPage[®] Novex 12% sistema de gel, Invitrogen™) analisaram-se, na fermentação, de acordo com as

indicações do fabricante, respectivamente 0,02 OD_{600nm} de suspensão de células que foram removidos do fermentador em diferentes momentos de cultivo.

Exemplo 6: Purificação das proteínas de fusão preparadas no exemplo 5

Ressuspenderam-se 1000 g da biomassa de uma estirpe recombinante de *E. coli* em 1000 mL de tampão Tris (Tris/HCl 50 mM, pH 7,4). A lise celular efectuou-se por dupla homogeneização sob alta pressão (homogeneizador de alta pressão Rannie, 1000 bar). A digestão do ADN genómico efectuou-se durante 1,5 horas mediante adição de benzonase (1000 U/L) e cloreto de magnésio (10 mM). A purificação da proteína de fusão realizou-se através de cromatografia de leito expandido. Para o efeito diluiu-se o homogeneizado celular até aos 10 litros com tampão (Tris/HCl 50 mM, pH 7,4) e aplicou-se directamente sobre uma coluna de cromatografia (Streamline SP XL, GE Healthcare) equilibrada previamente com tampão (Tris/HCl 50 mM pH 7,4). Após a aplicação da amostra, efectuou-se um passo de lavagem com tampão de equilíbrio (6 volumes de coluna), seguido de um passo de lavagem adicional com 7% de tampão com alta salinidade (Tris/HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 1M). A eluição efectuou-se por enxaguamento com 10 volumes de coluna de 20% de tampão com alta salinidade. A verificação do agrupado de eluição efectuou-se por via de electroforese em gel com SDS (NuPage® Novex 12% sistema de gel, Invitrogen) e HPLC. Após diafiltração em tampão de enterocinase (Tris/HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM) empregou-se o agrupado de proteína de fusão para a reacção de dissociação de proteases. A dissociação das proteínas de fusão efectuou-se por meio de enterocinase (Invitrogen) em tampão de

enterocinase (Tris/HCl 20 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM pH 7,4) segundo indicações do fabricante.

Exemplo 7: Separação dos produtos de dissociação a partir da reacção de dissociação com enterocinase

A separação dos produtos de dissociação efectua-se de acordo com o exemplo 6 do pedido de patente alemão DE102004058306.4. Após a dissociação das proteínas de fusão por meio de enterocinase, separam-se os produtos de dissociação, uns dos outros, por cromatografia de permuta iónica (Source 30S, Amersham Biosciences). Diluiu-se a solução com H₂O até uma força iónica de cerca de 7 mS/cm. Após a aplicação da solução de proteína sobre a coluna previamente equilibrada (Tris/HCl 20 mM, pH 7,4; ajustou-se a uma condutibilidade de cerca de 7 mS/cm com NaCl), removeu-se o material não ligado por lavagem com 15% de tampão B (Tris/HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 500 mM). Efectuou-se a eluição dos precursores peptídicos de AVE mediante a aplicação de um gradiente ao longo de 10 volumes de coluna até 100% de tampão B. A identificação de fracções contendo precursores de AVE efectuou-se por electroforese em gel com SDS, HPLC e espectrometria de massa. As fracções correspondentes foram reunidas dessalinizadas e liofilizadas após eliminação de solvente orgânico.

Exemplo 8: Acoplamento peptídico de AVE (1-39) com H-Lys(Boc)-NH₂

Pesa-se 0,2 mg de AVE (1-39) (MW 4218; 0,047 µmole; concentração final de 1 g/L) num recipiente de reacção de 1,5 mL

em polipropileno. Adicionam-se 11 μL de tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6, 60 μL de uma solução de 129 g/L de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl em tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6 (contém 7,75 mg de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl = 27,5 μmole = 585 moles H-Lys(Boc)-NH₂.HCl por cada mole de AVE (1-39)) e 119 μL de DMF. Leva-se a solução límpida a uma temperatura de 12 °C. Inicia-se a reacção mediante a adição de 10 μL de uma solução de 2 g/L de tripsina em água (contém 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por cada g de AVE (1-39)). Incuba-se a solução reaccional a 12 °C sob agitação a 1000 min⁻¹. Recolhem-se regularmente amostras para controlo do processo e trava-se mediante diluição com 9 volumes de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrilo e 64% de ácido trifluoroacético. Acompanha-se o progresso da reacção por LC-MS. Alcançado o máximo de rendimento, acidifica-se a reacção mediante adição de ácido trifluoroacético até um valor de pH abaixo de 2,5 e purifica-se por cromatografia.

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

Pesam-se 3,85 mg de AVE (1-43) (MW 4731; 0,814 μmole ; concentração final de 20 g/L) num recipiente de reacção de 1,5 mL em polipropileno. Adicionam-se 41 μL de uma solução de 620 g/L de H-Lys-NH₂.2HCl em tampão de acetato de sódio 0,1 M pH 5,8 (contém 25,6 mg de H-Lys-NH₂.2HCl = 117,5 μmole = 144 moles de H-Lys-NH₂.2HCl por cada mole de AVE (1-43)), 116 μL de DMF e 32 μL de tampão de acetato de sódio 0,1 M pH 5,8. Leva-se a solução límpida a uma temperatura de 12 °C. Inicia-se a reacção mediante a adição de 2,9 μL de uma solução de 20 g/L de tripsina em água (contém 0,06 mg de tripsina = 0,015 g de tripsina por cada g de AVE (1-43)). Incuba-se a solução reaccional a 12 °C

sob agitação a 900 min^{-1} . Recolhem-se regularmente amostras para controlo do processo e trava-se mediante diluição com 9 volumes de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrilo e 64% de ácido trifluoroacético. Acompanha-se o progresso da reacção por LC-MS. Alcançado o máximo de rendimento, acidifica-se a reacção mediante adição de ácido trifluoroacético até um valor de pH abaixo de 2,5 e purifica-se por cromatografia.

Exemplo 10: Acoplamento peptídico de AVE (1-39) com H-Lys-NH₂

Pesam-se 0,2 mg de AVE (1-39) (MW 4218; 0,047 μmole ; concentração final de 1 g/L) num recipiente de reacção de 1,5 mL em polipropileno. Adicionam-se 11 μL de tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6, 60 μL de uma solução de 100 g/L de H-Lys-NH₂.2HCl em tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6 (contém 6,0 mg de H-Lys-NH₂.2HCl = 27,5 μmole = 585 moles de H-Lys-NH₂.2HCl por cada mole de AVE (1-39)) e 119 μL de DMF. Leva-se a solução límpida a uma temperatura de 12 °C. Inicia-se a reacção mediante a adição de 10 μL de uma solução de 2 g/L de tripsina em água (contém 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por cada g de AVE (1-39)). Incuba-se a solução reaccional a 12 °C sob agitação a 1000 min^{-1} . Recolhem-se regularmente amostras para controlo do processo e trava-se mediante diluição com 9 volumes de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrilo e 64% de ácido trifluoroacético. Acompanha-se o progresso da reacção por LC-MS. Alcançado o máximo de rendimento, acidifica-se a reacção mediante adição de ácido trifluoroacético até um valor de pH abaixo de 2,5 e purifica-se por cromatografia.

Exemplo 11: Acoplamento peptídico de AVE (1-39) com H-Arg-NH₂

Pesam-se 0,2 mg de AVE (1-39) (MW 4218; 0,047 μ mole; concentração final de 1 g/L) num recipiente de reacção de 1,5 mL em polipropileno. Adicionam-se 11 μ L de tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6, 60 μ L de uma solução de 113 g/L de H-Arg-NH₂.2HCl em tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6 (contém 6,77 mg de H-Arg-NH₂.2HCl = 27,5 μ mole = 585 mole de H-Arg-NH₂.2HCl por cada mole de AVE (1-39)) e 119 μ L de DMF. Leva-se a solução límpida a uma temperatura de 12 °C. Inicia-se a reacção mediante a adição de 10 μ L de uma solução de 2 g/L de tripsina em água (contém 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por cada g de AVE (1-39)). Incuba-se a solução reaccional a 12 °C sob agitação a 1000 min⁻¹. Recolhem-se regularmente amostras para controlo do processo e trava-se mediante diluição com 9 volumes de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrilo e 64% de ácido trifluoroacético. Acompanha-se o progresso da reacção por LC-MS. Alcançado o máximo de rendimento, acidifica-se a reacção mediante adição de ácido trifluoroacético até um valor de pH abaixo de 2,5 e purifica-se por cromatografia.

Exemplo 12: Acoplamento peptídico de AVE (1-43) com H-Arg-NH₂

Pesam-se 0,25 mg de AVE (1-43) (MW 4731; 0,047 μ mole; concentração final de 1,1 g/L) num recipiente de reacção de 1,5 mL em polipropileno. Adicionam-se 11 μ L de tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6, 60 μ L de uma solução de 113 g/L de

H-Arg-NH₂.2HCl em tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6 (contém 6,77 mg de H-Arg-NH₂.2HCl = 27,5 μmole = 585 mole de H-Arg-NH₂.2HCl por cada mole de AVE (1-43)) e 119 μL de DMF. Leva-se a solução límpida a uma temperatura de 12 °C. Inicia-se a reacção mediante a adição de 10 μL de uma solução de 2 g/L de tripsina em água (contém 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por cada g de AVE (1-43)). Incuba-se a solução reaccional a 12 °C sob agitação a 1000 min⁻¹. Recolhem-se regularmente amostras para controlo do processo e trava-se mediante diluição com 9 volumes de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrilo e 64% de ácido trifluoroacético. Acompanha-se o progresso da reacção por LC-MS. Alcançado o máximo de rendimento, acidifica-se a reacção mediante adição de ácido trifluoroacético até um valor de pH abaixo de 2,5 e purifica-se por cromatografia.

Exemplo 13: Acoplamento peptídico de AVE (1-38)-Arg com H-Lys-NH₂

Pesam-se 0,2 mg de AVE (1-38)-Arg (MW 4246; 0,047 μmole; concentração final de 1 g/L) num recipiente de reacção de 1,5 mL em polipropileno. Adicionam-se 11 μL de tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6, 60 μL de uma solução de 100 g/L de H-Lys-NH₂.2HCl em tampão de acetato de piridina 0,1 M pH 5,6 (contém 6,0 mg de H-Lys-NH₂.2HCl = 27,5 μmole = 585 mole de H-Lys-NH₂.2HCl por cada mole de AVE (1-38)-Arg) e 119 μL de DMF. Leva-se a solução límpida a uma temperatura de 12 °C. Inicia-se a reacção mediante a adição de 10 μL de uma solução de 2 g/L de tripsina em água (contém 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por cada g de AVE (1-38)-Arg). Incuba-se a solução reaccional a 12 °C sob agitação a 1000 min⁻¹. Recolhem-se

regularmente amostras para controlo do processo e trava-se mediante diluição com 9 volumes de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrilo e 64% de ácido trifluoroacético. Acompanha-se o progresso da reacção por LC-MS. Alcançado o máximo de rendimento, acidifica-se a reacção mediante adição de ácido trifluoroacético até um valor de pH abaixo de 2,5 e purifica-se por cromatografia.

Exemplo 14: Acoplamento peptídico de AVE (1-43) com H-Lys(Boc)-NH₂

Pesam-se 20 mg de AVE (1-43) (MW 4731; 1,058 μ mole; concentração final de 20 g/L) num recipiente de reacção de 2 mL em polipropileno. Adicionam-se 370 μ L de uma solução de 482 g/L de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl em tampão de citrato de sódio 0,1 M pH 5,5 (contém 155 mg de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl = 550 μ mole = 130 mole de H-Lys(Boc)-NH₂.HCl por cada mole de AVE (1-43)) e 600 μ L de DMF. Leva-se a solução límpida a uma temperatura de 12 °C. Inicia-se a reacção mediante a adição de 30 μ L de uma solução de 3,3 g/L de tripsina em água (contém 0,1 mg de tripsina = 5 mg de tripsina por cada g de AVE (1-43)). Incuba-se a solução reaccional a 12 °C sob agitação a 1000 min⁻¹. Recolhem-se regularmente amostras para controlo do processo e trava-se mediante diluição com 9 volumes de uma solução de 17% de água, 17% de acetonitrilo e 64% de ácido trifluoroacético. Acompanha-se o progresso da reacção por LC-MS. Alcançado o máximo de rendimento, acidifica-se a reacção mediante adição de ácido trifluoroacético até uma concentração final de 50% (v/v). Por este meio trava-se a reacção e remove-se simultaneamente quantitativamente o grupo de protecção Boc. Purifica-se o produto reaccional por cromatografia.

Exemplo 15: Purificação dos derivados amidados de AVE

Separa-se subsequentemente a mistura reaccional das reacções de acoplamento por via de cromatografia de FR com Amberchrom CG300 XT 20 como material de suporte e isola-se subsequentemente o péptido alvo amidado a partir da fracção de eluato correspondente, por via de um passo de permuta iónica com Source 30S como suporte. Após a dessalinização através de colunas de Amberchrom, o produto está disponível para formulação como produto farmacêutico. A identidade da estrutura do produto foi demonstrada por meio de análise de MALDI-MS e RMN.

Exemplo 16: Preparação de Leu-hirudina 1-65 Lys-Arg-NH₂

O exemplo 1 do pedido de patente EP-A 1216259 descreve a preparação de um plasmídeo de expressão que permite a secreção de Leu-hirudina em sobrenadantes bacterianos. O ADN do plasmídeo é empregue como molde numa PCR padrão. O iniciador sentido utilizado na reacção é a sequência smompaf2 descrita no exemplo. O iniciador antissentido utilizado é um oligonucleótido hir_lys66_rev (SEQ ID N°: 21), que apresenta a seguinte sequência:

5'-TTTTTAAGC TTCTATTATTICTGAAGGTA TTCCTCAGGG - 3'

Hind3

Neste caso, o codão sublinhado codifica para lisina. Da posição 22 à posição 40 (fim) a sequência é complementar ao

segmento de sequência 178-195 da sequência representada na tabela 1 do pedido EP-A 1216259.

Tal como descrito no exemplo, realiza-se a PCR, digere-se o produto com as enzimas de restrição EcoR1 e Hind3 e insere-se no vector pJF118 correspondentemente aberto. Após a caracterização, transforma-se o ADN na *E. coli* K12, tal como no exemplo 11 do pedido de patente EP-A 1216259, e o produto intermédio é expresso e purificado. Em seguida efectua-se a transformação com argininamida para formar Leu-hirudina 1-65 Lys-Arg-NH₂, nas molaridades correspondentes, de acordo com o exemplo 13 do presente pedido. Quando se realiza a expressão directamente na estirpe MC1061 utilizada como estirpe hospedeira intermédia, o produto também se encontra no espaço periplasmático. Isto obriga a uma lise celular de acordo com métodos conhecidos como passo de processamento adicional para o isolamento do produto intermédio.

Exemplo 17: Análise de reacções de acoplamento peptídico em derivados de AVE

O acompanhamento analítico das reacções de acoplamento segundo os exemplos 8-14 efectua-se por HPLC-FR numa coluna Symmetry 300 150x4,6 mm, 5 µm da Waters. Os eluentes são 0,1% (v/v) de ácido fórmico (eluyente A) e acetonitrilo com 0,1% de ácido fórmico (eluyente B). A eluição é feita com um gradiente linear ao longo de 15 min de 20 para 50% de B a uma temperatura de coluna de 60 °C e uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A detecção efectua-se a 215 nm. Habitualmente injectam-se 5 µL de uma amostra de reacção diluída a 1:25. Os derivados de AVE

desprotegidos são detectados com tempos de retenção entre 7 e 10 min.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> Processo para a amidação de polipéptidos com aminoácidos básicos na extremidade C-terminal recorrendo a endoproteases específicas

<130> DE 2005/042

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<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
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

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<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

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<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
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

<211> 44

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial:

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 20 25 30 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Arg 35 40

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial:

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
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 Arg Lys
          35          40
```

<210> 6

<211> 192

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial:

Gene para a sequência ID N° 7

<400> 6

```
ttttttaagc ttgcacgggtg aaggtagcctt cacctccgac ctgtccaac agatggaaga 60
agaagctgtt cgtctgttca tcgaatggct gaaaaacggg ggtccgtcct ccggtgctcc 120
gccttcgaaa aagaagaaaa agtgataata gcatgcacgt gcggccgcac ctggtcgacg 180
aattcaaaaa aa 192
```

<210> 7

<211> 44

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência 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

<210> 8

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 8

ttttttaagc ttgcacggtg aag 23

<210> 9

<211> 59

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 9

cttccatctg tttggacagg tcggaggtga aggtaccttc accgtgcaag cttaaaaaa 59 |

<210> 10

<211> 69

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 10

ggacggacca ccgtttttca gccattcgat gaacagacga acagcttctt cttccatctg 60
tttggacag 69

<210> 11

<211> 69

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 11

cgtgcatgct attatcactt tttcttcttt ttcgaaggcg gagcaccgga ggacggacca 60
ccgtttttc 69

<210> 12

<211> 52

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 12

ttttttgaat tcgtcgacca ggtgcggccg cacgtgcatg ctattatcac tt 52

<210> 13

<211> 314

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial:

Gene para a sequência ID N°14

<400> 13

```
ggaacagaa ttcattggcgc cgacctcttc ttctaccaa aagctcaact gcaactggaa 60
cacctgctgc tggacctgca gatgatcctg aacgggatca acaactaca aaacccgaaa 120
ctgacgcgta tcgacgatga cgataaacac ggtgaaggta ccttcacctc cgacctgtcc 180
aaacagatgg aagaagaagc tgttcgtctg ttcattcgaat ggctgaaaaa cggtgggtccg 240
tcctccgggtg ctccgccttc gaaaaagaag aaaaagtgat aatagcatgc acgtgcggcc 300
gcaagcttaa aaaa 314
```

<210> 14

<211> 88

<212> PRT

<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		
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
65					70					75					80
Pro	Pro	Ser	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys								
				85											

<210> 15

<211> 39

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 15

cgtatcgacg atgacgataa acacggtgaa ggtaccttc 39

<210> 16

<211> 36

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 16

gtgtttatcg tcatcgtcga tacgcgtcag tttcgg 36

<210> 17

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 17

tgagcggata acaatttcac ac

22

<210> 18

<211> 41

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 18

tttttaagc ttgcggccgc acgtgcatgc tattatcact t

41

<210> 19

<211> 50

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 19

ttttttgcgg ccgcacgtgc atgctattat catttcgaag gcggagcacc

50

<210> 20

<211> 52

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 20

ttttttgcgg cgcacgtgc atgctattat catacgcgaa ggcggagcac cg 52

<210> 21

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 21

ttttttaagc ttctattatt tctgaaggta ttcctcaggg 40

Lisboa, 15 de Novembro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de péptidos di ou polibásicos amidados na extremidade C-terminal da fórmula geral I



em que

AS é um péptido caracterizado pela sequência

HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKK-NH₂

(SEQ ID N° 1)

ou

HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKR-NH₂

(SEQ ID N° 4)

e

X é lisina ou arginina;

em que um péptido caracterizado pela sequência

HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKK

(SEQ ID N° 7)

é transformado com H-Arg-NH₂ ou H-Lys-NH₂ na presença de uma enzima com a actividade biológica de tripsina, em que a enzima tem a capacidade de dissociar uma ligação peptídica C-terminal para formar aminoácidos básicos, e o composto

obtido da fórmula I é, eventualmente, purificado por química de proteínas.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que, no caso da preparação do péptido caracterizado pela sequência SEQ ID N° 1, a relação molar do péptido caracterizado pela sequência ID N° 7 e H-Lys-NH₂ perfaz 1:144 e, no caso da preparação do péptido caracterizado pela sequência ID N° 4, a relação molar do péptido caracterizado pela sequência ID N° 7 e H-Arg-NH₂ perfaz 1:585.
3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que
 - a) se expressa um péptido de fusão que contém um péptido caracterizado pela sequência ID N° 7;
 - b) o péptido caracterizado pela sequência ID N° 7 é libertado do dito péptido de fusão por meio de dissociação enzimática;
 - c) o produto intermédio do passo b) é transformado, eventualmente após purificação por química de proteínas, com H-Lys-NH₂ ou H-Arg-NH₂ na presença de uma enzima com a actividade biológica de tripsina; e
 - d) o composto obtido, caracterizado, em termos de péptidos, pelas sequências SEQ ID N° 1 ou 4 da fórmula I, é, eventualmente, purificado por química de proteínas e isolado.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que a dissociação da proteína de fusão ocorre por meio de enterocinase, factor Xa, genenase, trombina ou tripsina.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, em que a proteína de fusão é expressa num sistema de expressão seleccionado do grupo contendo *E. coli*, *S. carnosus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* e *S. cerevisiae*.

Lisboa, 15 de Novembro de 2011