



(10) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 90939 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07K007/40 A A61K037/26 B

C12N015/00 B C07K007/40 C

C07K099:26 C

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1989.06.22

(30) *Prioridade:* 1988.06.23 DE 3831159

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.12.29

(45) *Data e BPI da concessão:*
05/94 1994.05.19

(73) *Titular(es):*

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
BRUNINGSTRASSE, 64 D-6230 FRANKFURT/MAIN 80
DE

(72) *Inventor(es):*

PAUL HABERMANN DE
EUGEN UHLMANN DE
MICHAEL DORSCHUG DE
GERHARD SEIPKE DE

(74) *Mandatário(s):*

JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA
RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MINI-PROINSULINA

(57) *Resumo:*

[Fig.]



Descrição referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Michael Dörschug, Dr. Paul Habermann, Dr. Gerhard Seipke e Dr. Eugen Uhlmann, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MINI-PROINSULINA".

DESCRIÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de uma nova "mini-proinsulina" na qual a cadeia B não encurtada se encontra ligada à cadeia A através de um resíduo de arginina. A partir desta mini-proinsulina é possível obter a insulina humana sem ser necessário proceder a reacções químicas complicadas.

São conhecidas mini-proinsulinas com uma cadeia C encurtada. Por exemplo R. Wetzel et al., Gene 16 (1981), 63 - 71, descreveu uma proinsulina com uma cadeia C encurtada em 6 ácidos aminados. A partir do pedido de Patente Europeia com o número de publicação (EP-A) 0 055 945 são conhecidas proinsulinas com a cadeia C encurtada num máximo de seis ácidos aminados.

A partir da EP-A 0 163 529 são conhecidos precursores da insulina com uma cadeia B encurtada cu-

ja cadeia C está completamente ausente ou está presente mas encurtada num máximo de um ácido aminado. Estes precursores são transformados em insulina humana madura por transpeptidação com um éster de α -treonina catalisada por tripsina.

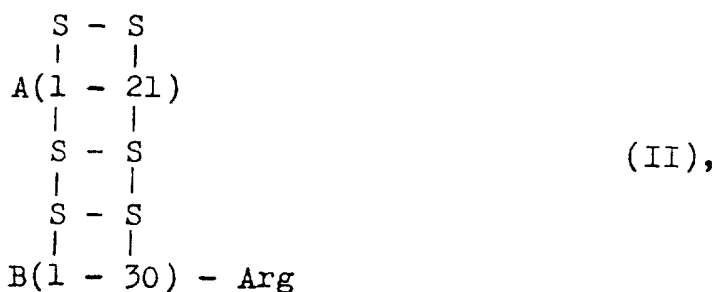
Em oposição às formas descritas, a presente invenção refere-se a des-(32-65)-proinsulina humana ou a mini-proinsulina da fórmula I



na qual B(1-30) e A(1-21) significam as cadeias B e A, respectivamente, da insulina humana. Este composto pode ser utilizado não apenas como produto intermediário para a preparação de insulina-humana-Arg^{B31}-OH, em seguida denominada por "mono-Arg-insulina", a qual é conhecida das publicações de Patente Europeia (EP-B) 0 132 769 e 0 132 770, mas também como insulina humana, uma vez que ele próprio apresenta uma indiscutível actividade de insulina.

A presente invenção refere-se por conseguinte também a um processo para a preparação de uma composição farmacéutica útil para o tratamento de Diabetes mellitus por incorporação de um composto da fórmula I eventualmente em conjunto com uma substância veicular farmacologicamente aceitável.

Para além disso a presente invenção refere-se a um processo para a preparação do composto da fórmula II



na qual A(1-21) e B(1-30) possuem os significados anteriormente definidos e as pontes -S-S- estão dispostas como na insulina e de insulina humana caracterizado por se cindir um composto da fórmula I por via enzimática. É especialmente vantajosa a

transformação imediata do composto da fórmula I em insulina numa reacção realizada sem mudança de reactor.

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação do composto da fórmula I caracterizado por se exprimir numa célula hospedeira, de preferência numa bactéria como E. coli ou numa levedura, especialmente em Saccharomyces cerevisiae, uma estrutura génica que codifica para este composto e, no caso de a estrutura génica codificar para uma proteína de fusão, se libertar o composto da fórmula I a partir da proteína de fusão. A presente invenção refere-se além disso a sequência de ADN que codificam para o composto da fórmula I, a estruturas génicas ou a plasmídeos que contém estes ADN's, bem como a células hospedeiras, especialmente bactérias como E. coli ou células de leveduras, principalmente leveduras da espécie Saccharomyces cerevisiae, que contém estas estruturas génicas ou estes plasmídeos. A presente invenção refere-se ainda a proteínas de fusão que contém um composto da fórmula I, de preferência proteínas de fusão nas quais o composto da fórmula I se encontra ligado na "fracção de balastro" da proteína de fusão através de uma cadeia da fórmula

- Met - Ile - Glu - Gly - Arg -.

Em seguida elucidam-se mais em pormenor outras formas preferidas de concretização da presente invenção.

As figura destinam-se a elucidar os Exemplos, apresentando a Figura 1 (e a sua continuação nas Figuras 1a e 1b) a construção dos vectores de expressão de E. coli pIK10 e pSW3 e a Figura 2 (e a sua continuação nas Figuras 2a e 2b) a construção dos vectores de expressão de leveduras p α fB102 e p α B104. Estes vectores codificam para a mini-proinsulina.

Verificou-se agora que a mini-proinsulina apresenta o modo correcto de dobragem de tal modo que após cisão com tripsina se obtém mono-Arg-insulina de modo quase quantitativo. Estabeleceu-se também um processo surpreendentemente simples para a preparação de mono-Arg-insulina. A partir desta é possível preparar insulina humana por um método conhe-



cido em si. Para além disso, a mono-Arg-insulina pode servir de substância activa em medicamentos (EP-B O 132 769).

Na EP-A O 229 998 descreveu-se o vector de expressão pk50. A mini-proinsulina pode ser preparada sob a forma de uma proteína de fusão correspondente a esta construção numa bactéria como E. coli.

A proteína de fusão dificilmente solúvel pode ser concentrada por lavagem com soluções tampão neutras. Por cisão com um halogeneto de cianogénio (E. Gross e B. Wittkop, J. Am. Chem. Soc. 82 (1961) 1510-1517) liberta-se a mini-proinsulina. Esta não se apresenta ainda sob a forma biologicamente activa; pelo contrário a mini-proinsulina é constituída por uma mistura não uniforme com diferentes pontes de dissulfureto inter e intramoleculares, eventualmente também com outros fragmentos proteicos. Como entidade química relativamente estável prepara-se o derivado sob a forma de S-sulfonato de molécula (P. G. Katsoyannis et al., Biochemistry 6 (1967) 2635 - 2641). Este derivado pode ser purificado facilmente por cromatografia de permuta iónica e é uma matéria prima apropriada para a dobragem na estrutura espacial nativa com estabelecimento das pontes de dissulfureto correctas (Y. C. Du et al., Sci. Sin. 15 (1965) 229 - 236; H. P. Gattner et al., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 362 (1981) 1943-1049; B. H. Frank et al. em "Peptides: Synthesis-Structure-Function", D. H. Rich e E. Gross, Hrsg., (1981) 1043 - 1049). A efectivação desta dobragem é verificada por meio de análise de HPLC dos fragmentos após cisão com protease V8 de S. aureus (U. Grau, Diabetes 34 (1985) 1174 - 1180).

A libertação da mono-Arg-insulina ou da insulina por acção da tripsina ou da carboxipeptidase B ou por meio de enzimas com actividade semelhante (W. Kemmler et al., J. Biol. Chem. 246 (1971) 2780 - 2795) decorre sem qualquer complicação, sendo para tal especialmente vantajoso que o número de possíveis locais de cisão seja reduzido em comparação com a proinsulina normal. Deste modo a cisão torna-se consideravelmente facilitada (em relação à formação de produtos secundários como na preparação de des-B30-insulina ou de desocta-B23-B30-insulina). Tanto a mono-Arg-insulina como também

a insulina podem ser isolados numa forma muito pura de modo conhecido em si por cromatografia de permuta iónica. A formação da insulina e do derivado mono-Arg, o decurso da purificação e a qualidade do produto final são verificados por processos de HPLC de fase invertida habituais (G. Seipke et al., *Angew. Chem.* 98 (1986) 530 - 548).

De modo surpreendente na cisão da mini-proinsulina, ao contrário do que acontece com a proinsulina natural, a formação de insulina-des-B₃₀ ocorre em grau muito reduzido. Uma vez que este produto é muito difícil de separar da insulina, torna-se preferível na obtenção da insulina a partir de proinsulina natural o processo da "reação em dois reactores", isto é, o produto principal da cisão triptica, insulina-Arg^{B₃₁}-Arg^{B₃₂} e a mono-Arg-insulina são em primeiro lugar separados da insulina-des-B₃₀ por permuta iónica de um modo conhecido em si e em seguida cindidos por meio de carboxipeptidase B para dar a insulina humana (EP-B O 195 691). Pelo contrário a mini-proinsulina pode ser transformada em insulina humana de modo ideal numa "reação num único reactor" por utilização simultânea de tripsina e de carboxipeptidase B ou por meio de enzimas de actividade equivalente.

A expressão do composto da fórmula I em leveduras seguida de secreção é especialmente vantajosa, uma vez que o derivado de proinsulina com a dobragem correcta é isolado directamente. Para sistema hospedeiro selecciona-se uma levedura, como por exemplo na EP-A O 248 227, nomeadamente por exemplo *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorphis*, *Schizosaccharomyces pombe* ou de preferência *Saccharomyces cerevisiae*.

Os vetores para a expressão em leveduras são conhecidos em grande número. A preparação do derivado de insulina de acordo com a presente invenção é descrita em seguida com respeito ao sistema do factor α de insulina, o que, no entanto, se deve entender apenas como exemplificativo, uma vez que também podem ser usados outros sistemas de expressão de modo conhecido em si.

A estrutura do gene da feromona de levedura MF α é conhecida a partir da publicação de Kurjan e Herskovitz, *Cell* 30 (1982) 933 - 943, onde também se discute a

possibilidade da expressão de outros genes e a secreção dos produtos génicos. A este respeito refira-se também Brake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 4642 - 4646.

Em alternativa pode usar-se um sistema de toxina destruidora ("killertoxin") de levedura ou pode aproveitar-se a secreção através do sistema da fosfatase ou da invertase.

Como vectores de leveduras utilizam-se com vantagem os vectores designados por lançadeiras ("shuttle"), os quais apresentam um plasmídeo bacteriano ou uma origem de replicação plasmídica de levedura bem como um gene ou genes para a selecção dos dois sistemas de hospedeiro. Para além disso estes vectores contêm a sequência do promotor necessária para a expressão de genes estranhos e eventualmente para melhorar o rendimento de uma sequência de terminador, de tal modo que o gene heterólogo - de preferência fundido ao sinal de secreção - se encontra situado entre o promotor e o terminador. Estes vectores são por exemplo descritos em US-A 4 766 073.

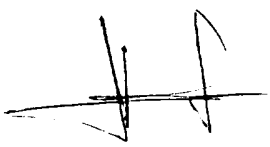
O código genético é, como se sabe, "degenerado", isto é, de tal modo que apenas dois ácidos aminados são codificados por uma única sequência nucleotídica, enquanto que os restantes 18 ácidos aminados codificáveis estão relacionados com dois a seis tripletos. Para a síntese do gene para a mini-proinsulina existe por conseguinte um grande número de combinações de codões que podem ser seleccionados. Verificou-se agora que a sequência I de ADN que codifica para a mini-proinsulina (que é reproduzido sob a forma dos dois fragmentos génicos IG I (Quadro 1) e IK II (Quadro 2)) é especialmente vantajosa, uma vez que esta sequência se encontra optimizada com respeito à utilização de codões tanto de leveduras como também de E. coli.

Na extremidade 5' da cadeia de codificação da sequência de ADN I situa-se uma sequência de ADN "saliente", que corresponde à endonuclease de restrição KpnI. Na extremidade 3' da cadeia de codificação está saliente pelo contrário a sequência de cadeia simples correspondente à en-

zima de restrição HindIII. Estas duas sequências de reconhecimento diferentes garantem a inserção da sequência de ADN I em plasmídeos na orientação pretendida. A seguir à sequência de codificação situam-se após o triplete N°. 65 para a asparagina dois códons de terminação de tradução ("stop codons"). Um local de corte interno singular para a enzima de restrição PstI (codão 41/42) possibilita a subclonagem dos dois fragmentos génicos, os quais podem ser incorporados em plasmídeos bem investigados, como o plasmídeo pUC18 ou derivados destes plasmídeos.

Adicionalmente incorpora-se no interior do gene estrutural uma série de outras sequências de rechecimento singulares, as quais por um lado conduzem a um aumento para sequências parciais da proinsulina e por outro lado possibilitam a realização de mutações:

Enzima de restrição	Fase após o nucleótido N°. (cadeia de codificação)
AccI	201
DraIII	46
FnuDII	107
HgaI	105
HindIII	213
HinfI	17
HpaI	22
HphI	76
MaeI	155
MaeIII	191
MboII	89
MluI	106
NcoI	207
NlaIII	208
PvuII	175
SalI	201
SpeI	154
StyI	207
TaqI	202



A sequência de EDN I foi modificada em relação à sequência natural em pontos essenciais. Deste modo foi possível a introdução de numerosos locais de corte singulares para enzimas de restrição.

A sequência de ADN I pode ser constituída a partir de um total de 6 oligonucleótidos com um comprimento de cadeia de 47 a 96 unidades nucleotídicas. Deste modo procede-se conforme se descreve em seguida.

O fragmento génico IK I (Quadro 1) pode ser constituído a partir de um total de 4 oligonucleótidos com um comprimento de cadeia de 47 a 74 unidades nucleotídicas, por síntese química destes, em primeiro lugar, seguida de ligação enzimática de 3 nucleótidos nas extremidades coesivas ("sticky ends"). As extremidades coesivas correspondem às da enzima de restrição DraIII, o que é vantajoso para uma modificação posterior.

O fragmento génico IK II (Quadro 2) é obtido a partir de dois oligonucleótidos preparados por síntese química com um comprimento de 88 e de 96 unidades nucleotídicas.

Exemplo 1

a) Síntese química de um oligonucleótido de cadeia simples

Com o exemplo do oligonucleótido N^o. 4 (Quadro 1) elucida-se a síntese das unidades constituintes de ADN. Para a síntese em fase sólida utiliza-se o nucleósido que se situa na extremidade 3', no caso vertente uma adenina (nucleótido N^o. 125) ligado a um suporte através da função 3'-hidroxi por meio de uma ligação covalente. O material de suporte é um vidro de poro controlado ("controlled Pore Glass" = CPG) funcionalizado por resíduos de aminoalquilo de cadeia longa.

Nas fases de síntese que se seguem utilizam-se os componentes das bases sob a forma do éster de -cianoetilo de dialquilamida do ácido 5'-O-dimetoxitritilnucleósido-3'-fosfórico, apresentando-se a adenina sob a forma do composto N⁶-benzoílo, a citosina sob a forma do composto N⁴-benzoílo, a guanina sob a forma do composto N²-isobutirilo e a timina sem grupo protector.

25 mg do suporte polimérico, que contém ligado 0,2 μ mol de 5'-O-dimetoxi-tritil-N⁴-benzoíl-2'-de-soxiadenosina, são tratados sucessivamente com os agentes seguintes:

- A) Acetonitrilo
- B) ácido tricloroacético a 3 % em diclorometano
- C) Acetonitrilo
- D) 5 μ mol do correspondente nucleósido-3'-O-fosfito e 25 μ mol de tetrazol em 0,15 ml de acetonitrilo anidro
- E) Acetonitrilo
- F) 20 % de anidrido acético em tetra-hidrofurano com 40 % de lutidina e 10 % de dimetilaminopiridina
- G) Acetonitrilo
- H) 3 % de iodo em lutidina/água/terta-hidrofurano numa proporção em volume de 5:4:1

Por "fosfito" entende-se na presente memória descritiva o éster mono- β -cianoetílico do ácido 2'-de-soxirribose-3'-monofosfórico, no qual a terceira valência se encontra saturada por um resíduo diisopropilamina. Os rendimentos de cada fase de síntese podem ser determinados em cada caso de acordo com a reacção de destritilação B) por via espectrofotométrica através da medida da absorção do catião dimetoxitritilo no comprimento de onda de 496 nm.

Após terminada a síntese segue-se a eliminação do grupo dimetoxitritilo conforme descrito em A) a C). Por meio de tratamento com amónia separa-se o ologonucleótido do suporte e simultaneamente eliminam-se os grupos β -cianoetilo. Por meio de um tratamento de 16 horas dos oligómeros com amónia concentrada a 50°C separam-se quantitativamente os grupos protectores de amina das bases. O produto bruto obtido deste modo é purificado por electroforese em gel de policarilamida.

De modo análogo preparam-se também os oligonucleótidos 1 a 3 (Quadro 1) e 5 e 6 (Quadro 2).

b) Acoplamento enzimático dos oligonucleótidos de cadeia simples

A fim de fosforilar os oligonucleóti-



dos na extremidade 5'-terminal tratam-se 1 μ mol de cada um dos oligonucleótidos 1 e 4 com 5 μ mol de trifosfato de adenosina com 4 unidades de quinase de polinucleótido T4 em 20 μ l de tampão de tris-HCl 10 mM (pH 7,6), cloreto de magnésio 10 mM e ditionotritol (DTT) 10 mM durante 30 minutos a 37°C. A enzima é desactivada por aquecimento durante 5 minutos a 95°C. Os oligonucleótidos 2 e 3, que formam as sequências de cadeia simples "salientes", não são fosforiladas. Deste modo evita-se na ligação que se segue a formação de fragmentos génicos maiores.

Os oligonucleótidos 1 a 4 são ligados como se segue: hibridam-se alíquotas de 1 μ mol de cada um dos oligonucleótidos 1 e 2 ou 3 e 4, aos pares, dissolvendo estes em volumes de 20 μ l de tampão de tris-HCl 50 mM (pH 7,6), cloreto de magnésio 10 mM e DTT 10 mM, aquecendo estas soluções durante 5 minutos a 95°C e arrefecendo até à temperatura ambiente no espaço de 2 horas. Nesta operação utilizam-se os oligonucleótidos 1 e 4 sob a forma dos seus 5'-fosfatos. Para acoplamento dos fragmentos de ADN bi-helicoidais formados reúnem-se as soluções dos mesmos, aquece-se durante 15 minutos a 60°C e arrefece-se à temperatura ambiente. Em seguida adiciona-se 2 μ l de DTT 0,1 M, 16 μ l de trifosfato de adenosina 2,5 mM (pH 7) bem como 1 μ l de ligase de ADN T4 (400 unidades) e incubam-se durante 16 horas a 22°C.

A purificação dos fragmentos génicos assim obtidos (Quadros 1 e 2) é levada a efeito por electroforese em gel sobre uma placa de gel de poliacrilamida a 10 % (sem adição de ureia, 40 x 20 x 0,1 cm), servindo de substância de marcação ADN de ϕ x174 (da firma BRL) cortado com HinfI ou pBR322 cortado com HaeIII.

Exemplo 2

a) Clonagem do fragmento de ADN sintetizado

Abre-se o plasmídeo comercial pUC19 com as enzimas de restrição KpnI e PstI e separa-se o fragmento maior (1) num gel "seaplaque" a 0,8 %. Faz-se reagir este fragmento com o ADN sintético (2) de acordo com o Quadro 1 com

ligase de ADN T4 e incuba-se a mistura de ligação com células competentes de E. coli 79/02. Inoculam-se placas de IPTG/Xgal que contém 20 mg/l de ampicilina com a mistura de transformação. A partir das colônias brancas obtidas isola-se o ADN plasmídico e caracteriza-se este por meio de análises de restrição e de sequência de ADN. Aos plasmídeos pretendidos atribui-se a designação de pIK1.

De modo idêntico liga-se o ADN (5) de acordo com o Quadro 2 em pUC19 previamente aberto com PstI e HindIII (4). Obtém-se o plasmídeo pIK2 (6).

b) Construção do gene da mini-proinsulina

A partir dos plasmídeos pIK1 (3) e pIK2 (6) isolam-se novamente as sequências de ADN (2) e (5) de acordo com os Quadros 1 e 2 e ligam-se com pUC19. Obtém-se deste modo o plasmídeo pIK3 (8) que codifica para uma sequência modificada da insulina humana.

Abre-se o plasmídeo pIK3 (8) com MluI e SpeI e isola-se o fragmento maior (9). Liga-se este com a sequência de ADN (10)

	B30		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	
	(Thr)(Arg)	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	(Thr)(Ser)			(10)
5'	CG	CGT	GGT	ATC	GTT	GAA	CAA	TGT	TGT	A		3'
3'		A	CCA	TAG	CAA	CTT	GTT	ACA	ACA	TGA	TC	5'
	(MluI)											(SpeI)

que completa o último codão da cadeia B (B30) num codão para a arginina, substitui os codões cortados para os 7 primeiros ácidos aminados da cadeia A e completa os codões para os ácidos aminados 8 e 9 desta cadeia.

Obtém-se deste modo o plasmídeo pIK4 (11) que codifica para a mini-proinsulina humana de acordo com a presente invenção.

c) Vectores de expressão para a mini-proinsulina

pIK I:

- Corta-se o plasmídeo pk50 (12) conhecido da EP-A 0 229 998
- (descrito neste pedido de Patente no Exemplo 3; Figura 3

(33)) com EcoRI e HindIII. Isolam-se os dois fragmentos (13) e (14). Corta-se novamente o fragmento menor (14) com a sequência parcial da IL-2 com MluI e isola-se a sequência parcial da IL-2 (15).

Corta-se o plasmídeo pIK4 (11) com EcoRI e HpaI e isola-se o fragmento maior (16). Em seguida liga-se este com a sequência parcial da IL-2 (15) e com o ADN sintético (17)

							B ¹	B ²		
			Met	Ile	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	
5'	CG	CGT	ATG	ATT	GAG	GGC	CGT	TTC	GTT	3' (17)
3'		A	TAC	TAA	CTC	CCG	GCA	AAG	CAA	5'
		(MluI)							(HpaI)	

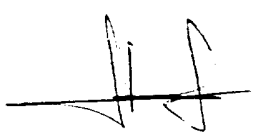
obtendo-se o plasmídeo pIK8 (18). Este codifica para uma proteína de fusão na qual aos primeiros 38 ácidos aminados da IL-2 se segue um elo da cadeia constituído por Met-Ile-Glu-Gly-Arg e a este a sequência de ácidos aminados da mini-proinsulina.

A partir do plasmídeo pIK8 (18) corta-se o fragmento EcoRI-HindIII (19) que codifica para a proteína de fusão referida. Este fragmento é ligado com o fragmento maior (13) que foi obtido por cisão do plasmídeo pK50. Obtém-se deste modo o vector de expressão pIK10 (20) que codifica para a proteína de fusão anteriormente referida.

pSW3:

Quando se retira do vector pIK10 (20) o segmento NdeI-BstEII que inclui o "bom site", obtém-se um vector que ocorre nas células em maior número de cópias e por causa de "bom site" em falta corresponde ao "bom site" e que não é mobilisável por meio de plasmídeos conjugativos.

Para este fim corta-se o vector pIK10 (20) com BstEII e NdeI, precipita-se o ADN com etanol, retoma-se com tampão de polimerase de ADN e submete-se a uma reacção com polimerase de Glenow. Os fragmentos de ADN com extremidades alinhadas deste modo obtidos são separados por eletroforese em gel e isola-se o fragmento maior (21). Por liga-



ção obtém-se o vector pSW3 (22). Após transformação de células competentes de E. coli Mc1061 e amplificação isola-se e caracteriza-se o plasmídeo pSW3 (22).

Exemplo 3: Expressão na estirpe E. coli W3110

Dilui-se numa proporção de cerca de 1:100 uma cultura obtida por crescimento de um dia para o outro de células de E. coli que contém o plasmídeo pIK10 (20) ou pSW3 (22) com meio LB (J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972), que contém 50 µg/ml de ampicilina e segue-se o crescimento por medida da DO. A uma DO = 0,5 ajusta-se a concentração da cultura em IPTG a 1 mM e separam-se as bactérias após 150 a 180 minutos por centrifugação. Aquecem-se as bactérias durante 5 minutos numa mistura tampão (ureia 7 M, 0,1 % de SDS, fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0) e depositam-se amostras sobre uma placa de electroforese em gel de SDS. Após a análise por electroforese em gel observa-se uma banda adicional do domínio de cerca de 10 kD que corresponde à proteína de fusão esperada. Esta banda reage na experiência da mancha de Western (Western blot") com anticorpos contra insulina.

Por rotura das células sob pressão e centrifugação do resíduo obtém-se a proteína de fusão no sedimento juntamente com outros componentes celulares insolúveis.

As condições de indução dadas são válidas para culturas agitadas em balões em agitadores orbitais; para fermentações em escala maior é vantajoso seleccionar outros meios e outras condições, por exemplo a utilização de valores da D.O. diferentes.

Exemplo 4:

a) Preparação de mono-Arg-insulina

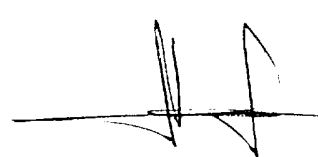
Dissolvem-se 40 g da proteína de fusão concentrada por centrifugação e lavagem com tampão de fosfato (pH 7) e com água (conteúdo em substância seca cerca de 25 %) em 75 ml de ácido fosfórico a 98 a 100% e trata-se com 5 g de BrCN. Após 6 horas de reacção à temperatura ambiente trata-se a

mistura com 2 l de água e liofiliza-se.

Dissolve-se a mistura dos fragmentos (10 g) em 1 l da solução tampão (ureia 8 M, tris-HCl 0,2 M (pH 8,5)), aquece-se a 30°C e trata-se com 10 g de sulfito de sódio e 2,5 g de tetrationato de sódio. Após 90 minutos a 30°C adicionam-se 3 l de água fria e ajusta-se o valor do pH a 7,0. Separa-se por centrifugação o sedimento resultante. Precipita-se o hexa-S-sulfonato de mini-proinsulina a partir do sobrenadante por ajuste do pH a 3,5. Após 15 horas de incubação a +4°C centrifuga-se. Lava-se o precipitado com água e liofiliza-se. Obtêm-se 4,8 g de uma mistura de substâncias na qual se determina uma fracção de 900 mg de mini-proinsulina por HPLC de fase invertida. A obtenção do S-sulfonato é levada a efeito em 2 fases:

1. Cromatografia de permutação aniônica através de uma coluna de 50 x 60 cm com ^(R)Fractogel TSK DEAE-650 M em ureia 3 M; tris-HCl 0,05 M (pH 8,3). A eluição é levada a efeito com um gradiente de NaCl de 0,05 a 0,5 M (cada 6 l). Após análise do eluído por focagem isoeléctrica precipita-se o produto a partir das fracções reunidas por diluição até uma concentração de ureia 1 M e ajuste do pH a 3,5.
2. Eliminação de impurezas de alto e baixo peso molecular por filtração em gel através de ^(R)Sephacryl S200 em ureia 3 M; tris-HCl 0,05 M; NaCl 0,05 M (pH 8,3). Levam-se a efeito análises das fracções e o isolamento do produto como na fase anterior. Lava-se o precipitado com 20 ml de água e liofiliza-se. Obtém-se 1,10 g do produto concentrado até um grau de pureza de 69%.

Para a dobragem e a formação das pontes de dissulfureto dissolve-se o S-sulfonato em 50 ml de ureia 8 M e tris-HCl 0,02 M a pH 8,6. Após adição de algumas gotas de octanol fez-se passar durante 15 minutos azoto puro. Por adição de 1,1 ml (16 mmol) de 2-mercaptoetanol leva-se a efeito no decurso de 1 hora à temperatura ambiente a redução completa. Faz-se passar a solução através de uma coluna de ^(R)Sephadex G25 (5 x 60 cm) e elui-se com glicina/NaOH 0,05 M (pH 10,6). A fracção proteica é conservada durante 2 dias a 4°C após veri-



ficação e eventual correcção do valor do pH (10,6). Em seguida ajusta-se o valor do pH a 6,8 e incuba-se a solução com 1 mg (3,5 U) de tripsina (Merck, tratada com L-1-p-tosilamino-2-feniletil-clorometilcetona (TPCK)) à temperatura ambiente durante 4 horas. Em seguida ajusta-se o valor do pH a 3,5, trata-se a solução com 1 mg de um inibidor de tripsina de soja (Sigma) e 3 ml de ZnCl_2 a 10% e ajusta-se novamente a pH 6,8. Separa-se por centrifugação o precipitado resultante. Este precipitado contém predominantemente mono-Arg-insulina, a qual é purificada por cromatografia de permuta iónica em S-Sepharose^(R) (2,5 x 40 cm) num tampão de ácido láctico 50 mM e 30% de isopropanol (pH 3,5). A eluição é levada a efeito por meio de um gradiente de NaCl de 0,05 a 0,5 M (cada 1 l). Analisa-se o eluído por HPLC; a partir das fracções que contém o produto precipita-se a mono-Arg-insulina após diluição 1:1 com H_2O por adição de 10 ml de ZnCl_2 a 10% para 1 l e ajuste do pH a 6,8. Cristaliza-se o precipitado separado por centrifugação a partir de um tampão de 1 g/l de fenol, 10,5 g/l de ácido cítrico e 200 mg/l de ZnCl_2 a pH 6. Após liofilização dos cristais lavados com um pouco de água obtêm-se 390 mg de mono-Arg-insulina num grau de pureza superior a 90%.

Exemplo 5:

Preparação da insulina

Dissolvem-se 200 mg de mono-Arg-insulina (ver Exemplo 4) em 100 ml de tris-HCl 0,05 M (pH 8,5). Em seguida adiciona-se 1 U (cerca de 4 μg) de carboxipeptidase B e agita-se lentamente a solução à temperatura ambiente. Após 3 horas cristaliza-se a insulina humana por acidificação a pH 3,5 e adição de 1 ml de ZnCl_2 a 10% a pH 5,5. Obtêm-se 200 mg de insulina cristalina com uma pureza superior a 85%. Este material é submetido a uma purificação por cromatografia em permutador iónico numa coluna com Fractogel TSK-DEAE-650 M (2,5 x 40 cm) em ^(R)Lutensol DN 100 a 0,1% (BASF AG; oxetilato de um álcool gordo linear saturado, maioritariamente com 12 átomos de carbono); tris-HCl 0,05 M (pH 8,3), efectuando-se a eluição com um gradiente de NaCl de 0 a 0,4 M (cada 1 l). A partir das fracções que contém o produto identificadas por HPLC crista-



liza-se a insulina por adição de 10 ml de ZnCl_2 a 10% e 1 ml de ácido cítrico a 10% a pH 5,5. Após agitação lenta de um dia para o outro, centrifuga-se e recristaliza-se o sedimento obtido a partir de 20 ml de um tampão de 5 g/l de ácido cítrico, 125 ml/l de acetona e 200 mg/l de ZnCl_2 a pH 5,5. Obtêm-se 160 mg de insulina com um grau de pureza superior a 95%.

Exemplo 6

Preparação de insulina a partir de mono-Arg-insulina por acção combinada de tripsina e de carboxipeptidase B

Dissolvem-se 5 mg de mono-Arg-insulina em 20 ml de tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) e aquece-se a 30°C. Adicionam-se simultaneamente 2,5 μl de solução de tripsina (1 U/ml) e 150 μl de solução de carboxipeptidase B (1 U/ml). Após 3 horas ajusta-se o pH da solução a 3,5 e adicionam-se 2,5 μl de solução de inibidor de tripsina (1 U/ml) bem como 200 μl de solução de ZnCl_2 a 10%. Precipita-se a insulina humana por ajuste do pH a 6,8, separa-se por centrifugação e cristaliza-se como no Exemplo 5. A insulina cristalizada tem um grau de pureza > 95%.

Exemplo 7: Construção de um vector de expressão em levedura

Em primeiro lugar sintetiza-se a sequência de ADN (23) (Quadro 3) de acordo com o processo do fosfato. Esta sequência de ADN (23) codifica para os ácidos amino dos 49 a 80 da proteína precursora M_{H} e corresponde essencialmente à sequência de ADN natural.

Utiliza-se em primeiro lugar a sequência de ADN (23) como sonda para o isolamento do gene para o factor α e marca-se para este efeito com ^{32}P . Com o auxílio desta sonda isola-se a partir de um banco de genes de levedura $\lambda\text{gt}11$ genómico (que pode ser obtido inclusivamente de uma origem comercial como por exemplo de Clontech Laboratories Inc., 4055 Fabian Way, Palo Alto, CA94303). Para este fim identificam-se fagos $\lambda\text{gt}11$ que possuem o gene do factor α num ensaio de hibridação em placa. Isolam-se os fagos de todas as placas identificadas como positivas, ampliam-se e isola-se o ADN.



Cinde-se este com EcoRI e analisa-se num gel de agarose a 0,8%. Após um ensaio de transferência de Southern híbrida-se a membrana contra a sequência de ADN (23) marcada por 32p que apresenta um fragmento de cerca de 1,75 kb (24), o qual híbrida contra a sequência de ADN (23), cinde-se novamente com a enzima e isola-se o fragmento pretendido (24). Abre-se o vector pUC 19 com EcoRI (25) e faz-se reagir com o fragmento de 1,75 kb (25) com ligase T4. Obtém-se o vector de clonagem (26).

Transforma-se a estirpe de E. coli 79/02 com a mistura de ligação. Isolam-se colónias brancas a partir das quais se obtém o ADN plasmídico e se identifica o plasmídeo que contém o fragmento EcoRI de 1,75 kb.

A sequência de ADN natural da proteína precursora para MF α contém no domínio dos ácidos aminados 8 a 10 um local de corte PstI e no domínio dos ácidos aminados 48/49 um local de corte TaqI. A partir do ADN plasmídico isolado (26) isola-se em seguida por reacção com PstI e TaqI o fragmento (27), o qual codifica para os ácidos aminados 9 a 48 da sequência precursora MF α . Abre-se o vector pUC18 com PstI e KpnI (28) e faz-se reagir com o fragmento PstI-TaqI (27) bem como com a sequência de ADN sintética (23) com o auxílio de ligase T4. Com a mistura de ligação transforma-se E. coli 79/02. Deposita-se a mistura de transformação sobre placas de IPTG-Xgal-Ap. Isolam-se colónias brancas e caracteriza-se o ADN plasmídico destes clones por análise de restrição. Obtém-se deste modo o vector de clonagem (29), o qual codifica para os ácidos aminados 8 a 80 da sequência precursora MF α .

A partir do vector de clonagem (29) corta-se a sequência de codificação referida (30) por reacção com PstI e KpnI e integra-se na ligação descrita seguidamente. Para este fim faz-se reagir o vector de clonagem (26) com EcoRI e parcialmente com PstI e isola-se o fragmento (31) que abrange a sequência de codificação para os primeiros 8 ácidos aminados da sequência do precursor MF α . Para além disso abre-se o vector pUC19 com EcoRI e KpnI (32) e liga-se com os dois fragmentos descritos (30) e (31), obtendo-se deste modo o vector de clonagem (33). Este vector de clonagem codifica para a sequência precursora integral de MF α até ao ácido aminado 80.

Abre-se o vector de clonagem (33) com KpnI e HindIII e isola-se o fragmento maior (34). Liga-se este fragmento com o fragmento KpnI-HindIII (35) do plasmídeo (11), o qual codifica para mini-proinsulina. Obtém-se deste modo o plasmídeo pIK20 (36), cuja estrutura é confirmada por análise de restrição.

Abre-se o plasmídeo Yepl3 (Broach et al., Gene 8 (1979) 121) com BamHI e preenchem-se as extremidades reentrantes com polimerase de Klenow (38). Precipita-se o ADN com etanol e trata-se com fosfatase alcalina de bovino.

A partir do vector de clonagem (36) corta-se com HindIII e EcoRI o fragmento que codifica para o derivado de insulina e para a sequência precursora de ~~MF~~ e preenchem-se as extremidades reentrantes conforme descrito (37).

Ligam-se entre si as duas sequências de ADN de extremidades alinhadas (37) e (38), obtendo-se os plasmídeos p α fBl02 (39) e p α fBl04 (40). Estes dois plasmídeos diferenciam-se entre si apenas pela orientação do fragmento inserido.

Conforme descrito em EP-A O 171 024, é possível integrar um terminador depois da sequência inserida (Figuras 4 a 6 da EP-A O 171 024). Para esse fim são adequados os locais de corte NcoI e/ou BamHI.

Após amplificação do ADN plasmídico em E. coli MM294, utiliza-se o plasmídeo p α fBl02 para transformação das estirpes de levedura deficientes em leucina Y79 (Δ , trp1-1, leu2-1) (Cantrell et al., Proc. Acad. Natl. Sci. USA 82 (1985) 6250) e DM6-6 (α/α leu2-3,112::ura3⁺/leu2::lys2⁺, trp1⁻/trp1⁻, his3-11, 15/his3-11, 15, ura3⁻/ura3⁻, lys2⁻/lys2⁻, arg4-17/arg4⁺, adel⁻/adel⁺) (Maya Hanna, Dept. Mol. Biol. Massachusetts General Hospital, Boston, EUA) de acordo com o método do lítio de Ito, H. et al., J. Bacteriol., 153 (1983) 163. Isolam-se as colónias que podem crescer no meio selectivo sem adição de leucina. Inocula-se meio mínimo de levedura com as colónias isoladas e incuba-se durante 24 horas a 28°C. Separam-se as células por centrifugação e verifica-se a actividade de insulina no sobrenadante por meio de um ensaio de RIA. A partir de clones de levedura cujo sobrenadante apresenta ac-

tividade de insulina isola-se novamente e caracteriza-se por meio de análise de restrição o ADN plasmídico. Utilizam-se as estirpes de levedura transformadas para a expressão que tem lugar em seguida.

Exemplo 8: Expressão em levedura

Inoculam-se 10 ml de meio integral de levedura com as células que foram isoladas a partir de uma cultura fresca efectuada de um dia para o outro de uma estirpe obtida de acordo com o Exemplo 7 em meio selectivo, de modo a atingir uma densidade óptica de $DO_{600} = 0,1$. Agita-se a cultura num agitador orbital durante 8 horas a $28^{\circ}C$, adicionando-se 90 ml de meio fresco. Em seguida agita-se a cultura durante mais 20 horas. Separam-se as células por centrifugação e determina-se a concentração de insulina no sobrenadante. As condições são modificadas para fermentações em maior escala, nas quais, por exemplo, é possível adicionar meio fresco de modo contínuo.

Exemplo 9: Purificação de mono-Arg-insulina a partir de sobrenadante de levedura

Faz-se passar o sobrenadante da fermentação através de uma coluna com uma resina adsorvente porosa constituída por um copolímero de estireno e divinilbenzeno (^(R)Diaion HP20). Previamente a coluna tinha sido equilibrada com um tampão de acetato de 20 a 50 mM (pH 5). Após lavagem com tampão de tris (pH 8), fazem-se passar 10 vezes o volume da coluna com um gradiente de isopropanol (0 a 50%). Ajusta-se a 6 o pH das fracções que contêm a insulina, tratam-se com (^(R)MATREX CELLUFINE AM (da firma Amicon), agita-se, separa-se por filtração e lava-se com tampão de acetato 50 mM (pH 6). Reunem-se a fracção de lavagem e a fracção principal, ajusta-se a pH 3,5 com ácido láctico e faz-se passar através de uma coluna de S-SEPHAROSE previamente equilibrada com ácido láctico 50 mM (pH 5)/isopropanol a 30%.

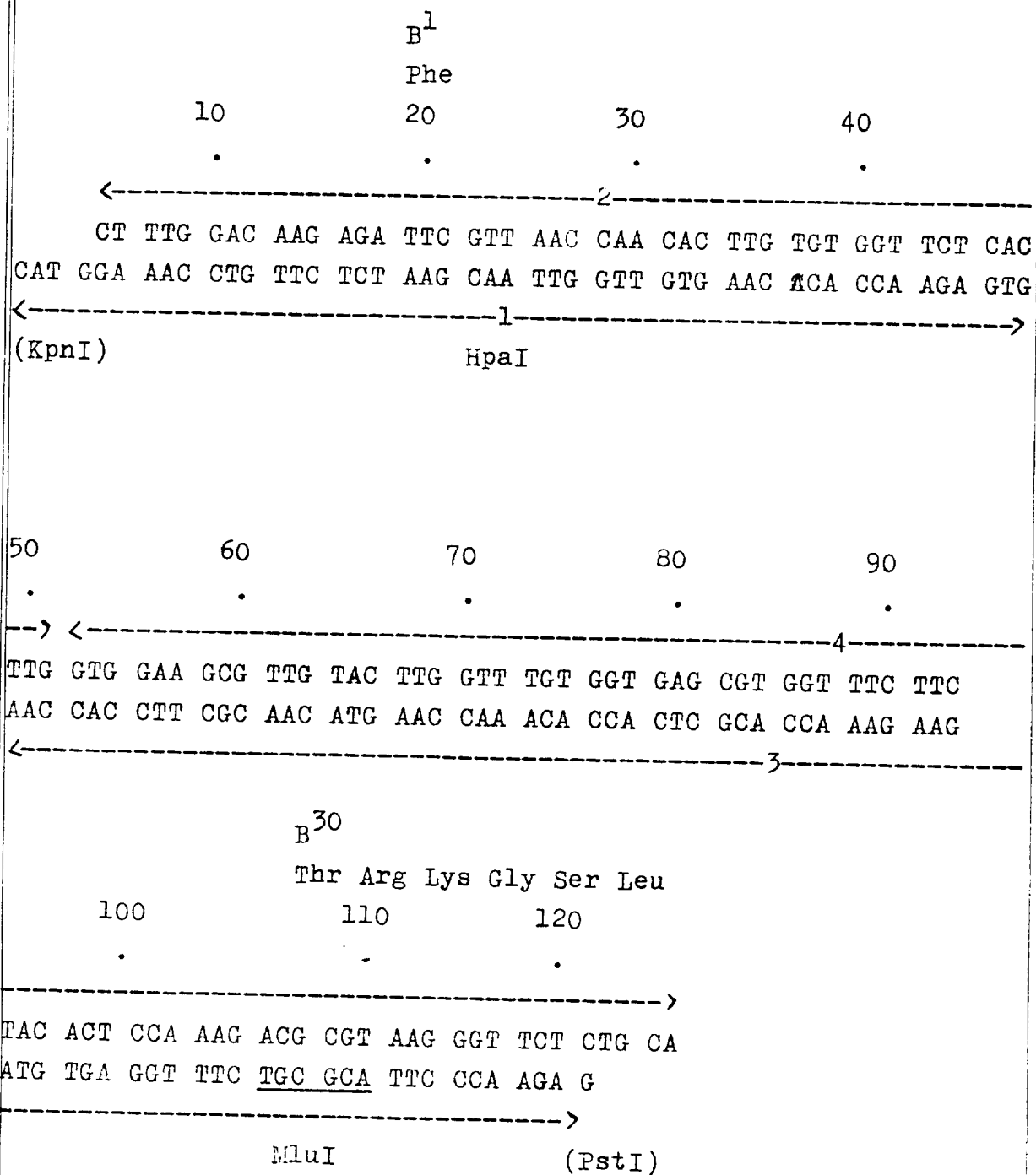
A eluição é levada a efeito por meio de um gradiente de NaCl de 0 a 0,6 M. A mini-proinsulina é eluída no domínio de 0,25 a 0,3 M.

As fracções que contêm a proinsulina são concentradas até 1/4 do seu volume e feitas passar através de uma coluna com Biogel-P10 (Bio-Rad) equilibrada em ácido acético a 6% (pH 2). O eluído que contém a insulina é liofilizado e purificado por meio de cromatografia preparativa de HPLC de fase invertida (material RPL8, TFA 0,1%, gradiente de acetonitrilo de 20 a 40%). Após nova liofilização, dissolve-se em tampão de tris (pH 6,8) e incuba-se com 4 unidades de tripsina por grama de mono-Arg-insulina à temperatura ambiente durante 3 a 5 horas. O decurso da reacção é seguido por meio de análise de fase invertida. Verifica-se que se obtém mono-Arg-insulina de forma quase quantitativa. No fim da reacção ajusta-se o pH a um valor de 3,5 e faz-se parar a reacção por adição de uma quantidade equivalente de inibidor de tripsina. Em seguida ajusta-se a concentração de cloreto de zinco a 0,21 g/l e o valor do pH a 6,8. Obtém-se um precipitado floculento que se dissolve em tampão de ácido láctico. Os componentes são separados entre si por cromatografia em S-SEPHAROSE. Purificam-se as fracções que contêm a mono-Arg-insulina e mistura-se com água numa proporção de 1:1. Em seguida trata-se a solução com 10 ml de $ZnCl_2$ a 10% para 1 l. A mono-Arg-insulina precipita a pH 6,8 e em seguida é recristalizada de modo conhecido (para a insulina).

Exemplo 10: Preparação da insulina Humana

A mono-Arg-insulina obtida de acordo com o Exemplo 9 serve de matéria prima para a cisão por carboxipeptidase B. Para este fim, dissolve-se o derivado de insulina em tampão de tris (pH 8,5) e trata-se com 5 unidades de carboxipeptidase B por grama de mono-Arg-insulina. A reacção é levada a efeito durante 3 horas com agitação lenta à temperatura ambiente. Em seguida precipita-se com $ZnCl_2$ conforme descrito no Exemplo 9. A insulina humana é então purificada de modo conhecido (DE-B 2 629 568).

Quadro 1: Fragmento génico IK I (2)



130 140 150 160

(Pst I)

SpeI

(HindIII)

Quadro 3: Sequência de ADN (23)

50 55
5' C GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTC TCC
3' TA CAA CGA CAA AAC GGT AAG AGG
(TaqI)

60 65
AAC AGT ACT AAT AAC GGT TTA TTG TTC
TTG TCA TGA TTA TTG CCA AAT AAC AAG

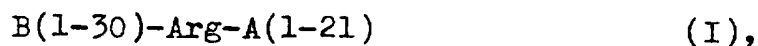
70
ATT AAT ACT ACT ATT GCT AGC ATT GCT
TAA TTA TGA TGA TAA CGA TCG TAA CGA

75 80
GCT AAA GAA GAA GGG GTA C 3'
CGA TTT CTT CTT CCC 5'
(KpnI)

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de um composto da fórmula I



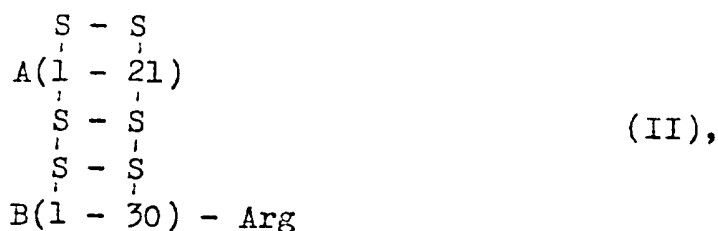
na qual B(1-30) e A(1-21) significam as cadeias B e A, respectivamente, da insulina humana, caracterizado por se exprimir numa célula hospedeira, de preferência numa bactéria ou numa levedura, uma estrutura génica que codifica para este composto e, no caso de a estrutura génica codificar para uma proteína de fusão, se libertar o composto da fórmula I a partir da proteína de fusão.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se cindir por via enzimática uma proteína de fusão obtida de acordo com a reivindicação 1 e se isolar a proteína da fórmula I.

- 3ª -

Processo para a preparação do composto da fórmula II



na qual A(1-21) e B(1-30) possuem os significados anterior

mente definidos e as pontes -S-S- estão dispostas como na insulina, caracterizado por si cindir a proteína obtida de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2 por via enzimática, de preferência com tripsina.

- 4ª -

Processo para a preparação de insulina humana caracterizado por se cindir numa reacção sem mudança de recipiente uma proteína obtida de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2 com tripsina ou com uma enzima de actividade equivalente e com carboxipeptidase B ou com uma enzima de actividade equivalente.

- 5ª -

Processo para a preparação de insulina humana caracterizado por se preparar uma proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, se cindir esta proteína de fusão, isolar-se a proteína da fórmula I, preparar-se a partir desta o composto da fórmula II e cindir-se a arginina C-terminal após se isolar o intermediário ou, de preferência, sem isolamento.

- 6ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2 caracterizado por na proteína de fusão a proteína da fórmula I se encontrar ligada na fracção de balastro através de uma cadeia da fórmula

-Met-Ile-Glu-Gly-Arg-.

A requerente reivindica a prioridade
do pedido alemão apresentado em 23 de Junho de 1988, sob o nº.
P 38 31 159.9.

Lisboa, 22 de Junho de 1989
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a horizontal line, positioned below the typed name of the official.



RESUMO

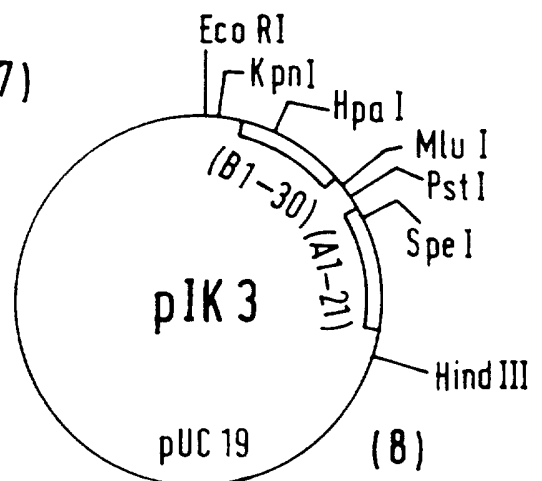
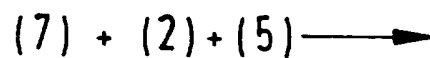
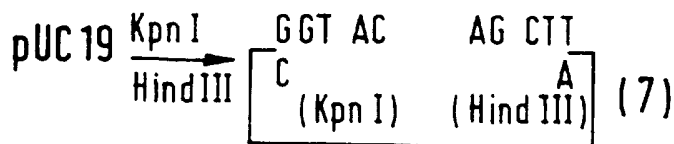
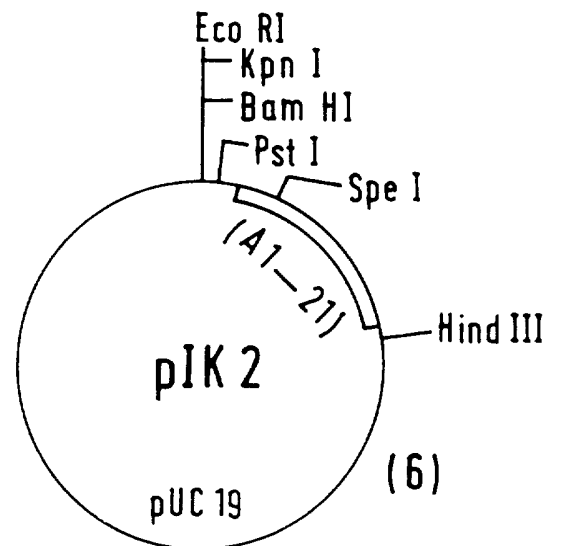
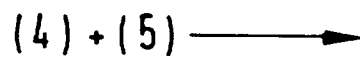
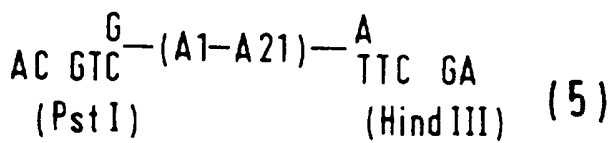
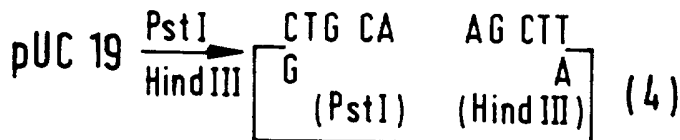
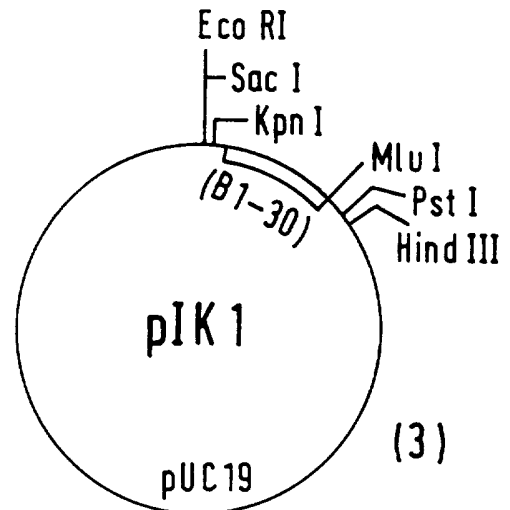
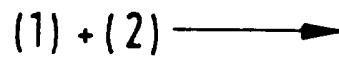
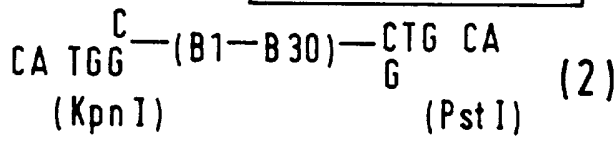
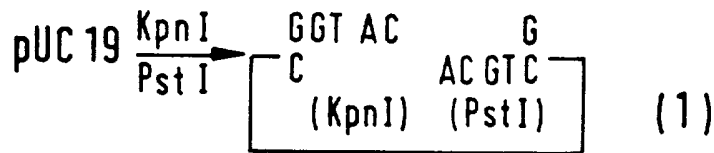
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MINI-PROINSULINA"

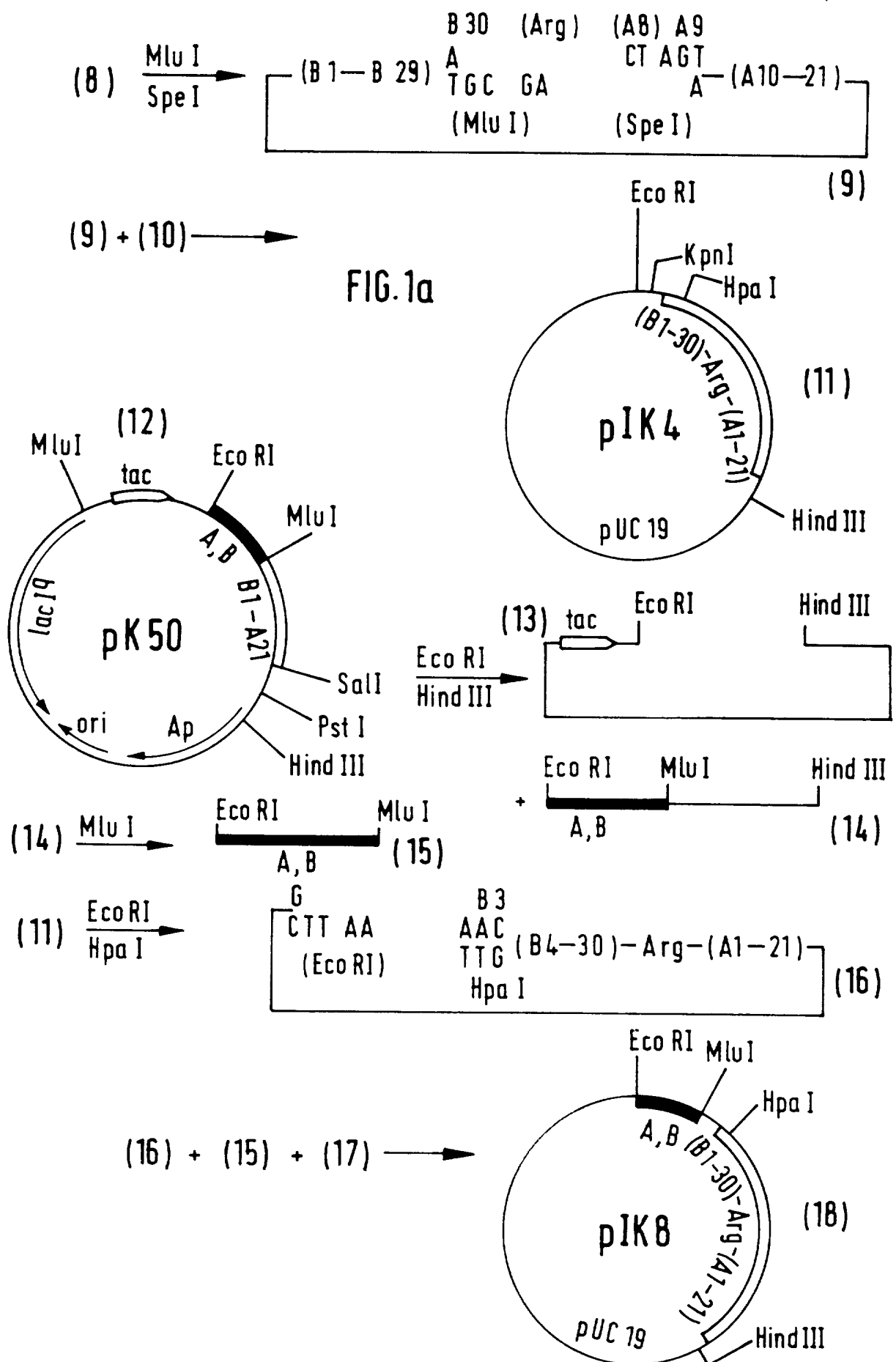
A invenção refere-se a um processo para a preparação de um composto da fórmula I



na qual B(1-30) e A(1-21) significam as cadeias B e A, respectivamente, da insulina humana, que compreende exprimir-se numa célula hospedeira, de preferência numa bactéria ou numa levedura uma estrutura génica que codifica para este composto, no caso de a estrutura génica codificar para uma proteína de fusão, se libertar o composto da fórmula I a partir da proteína de fusão.

FIG. 1





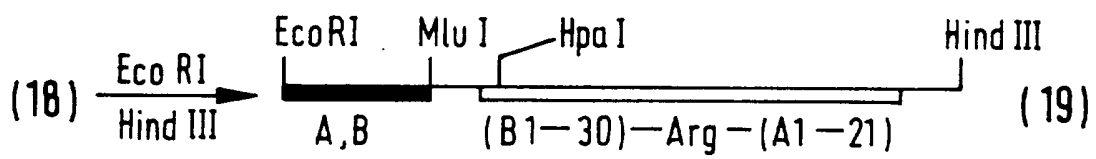
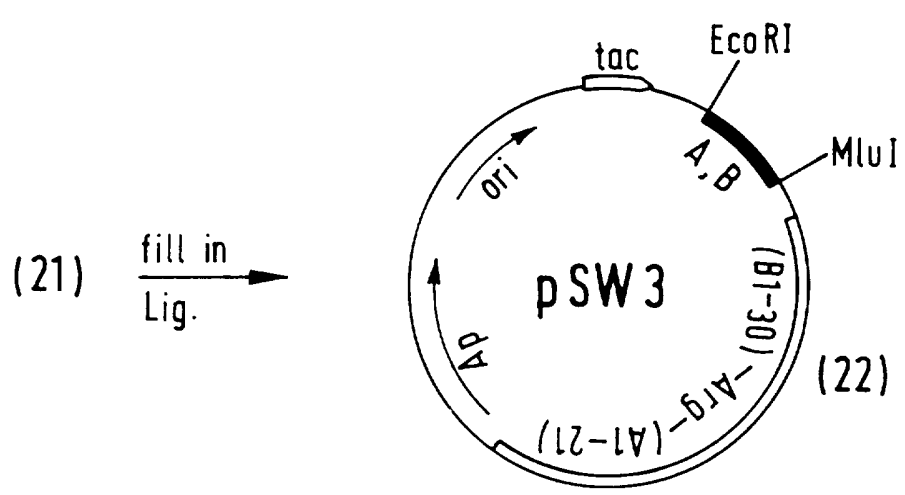
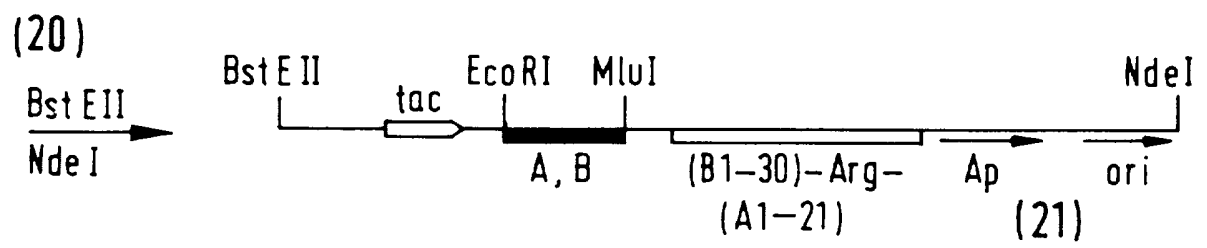
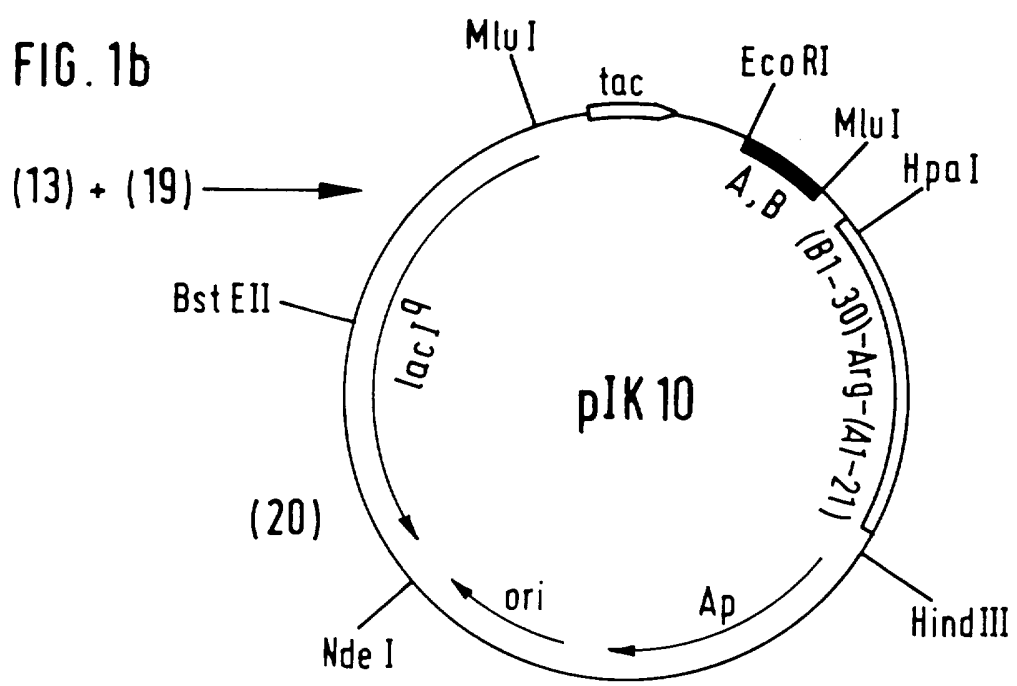


FIG. 1b



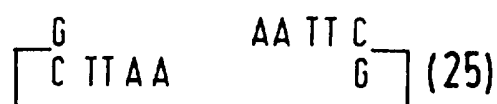
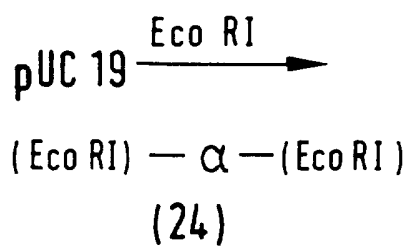
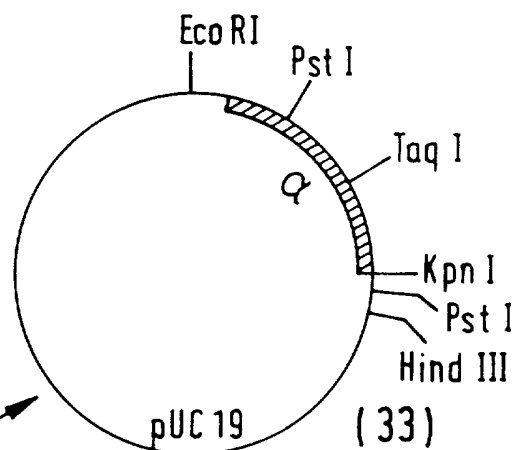
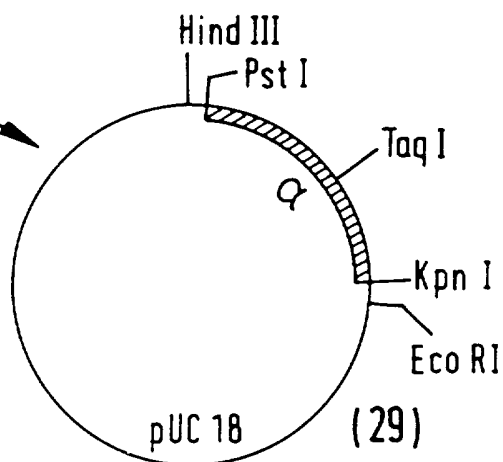
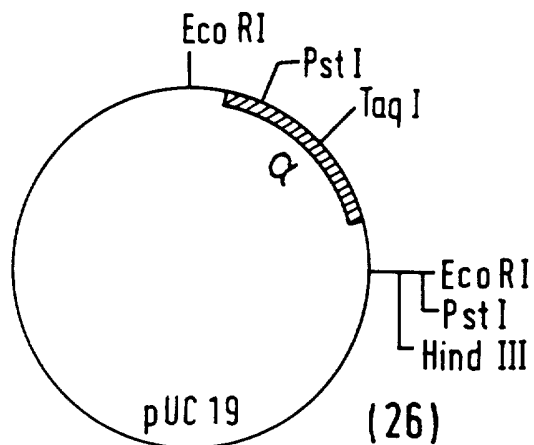
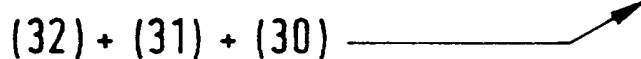
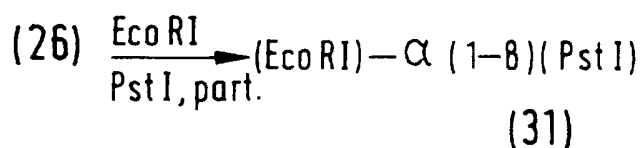
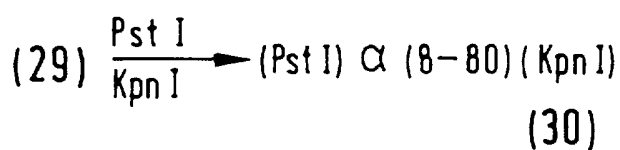
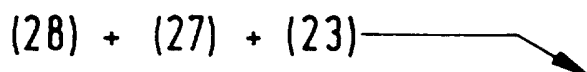
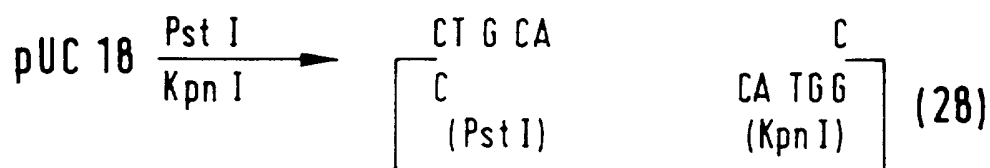
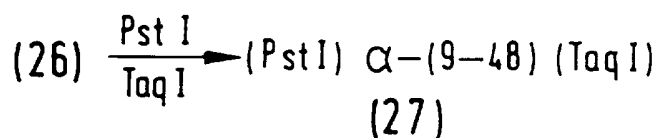
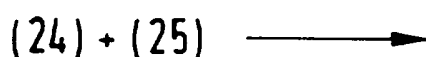
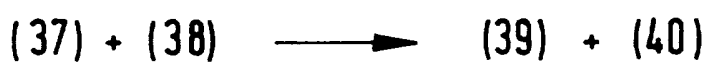
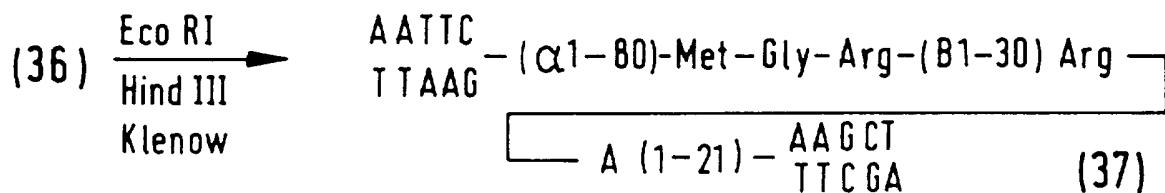
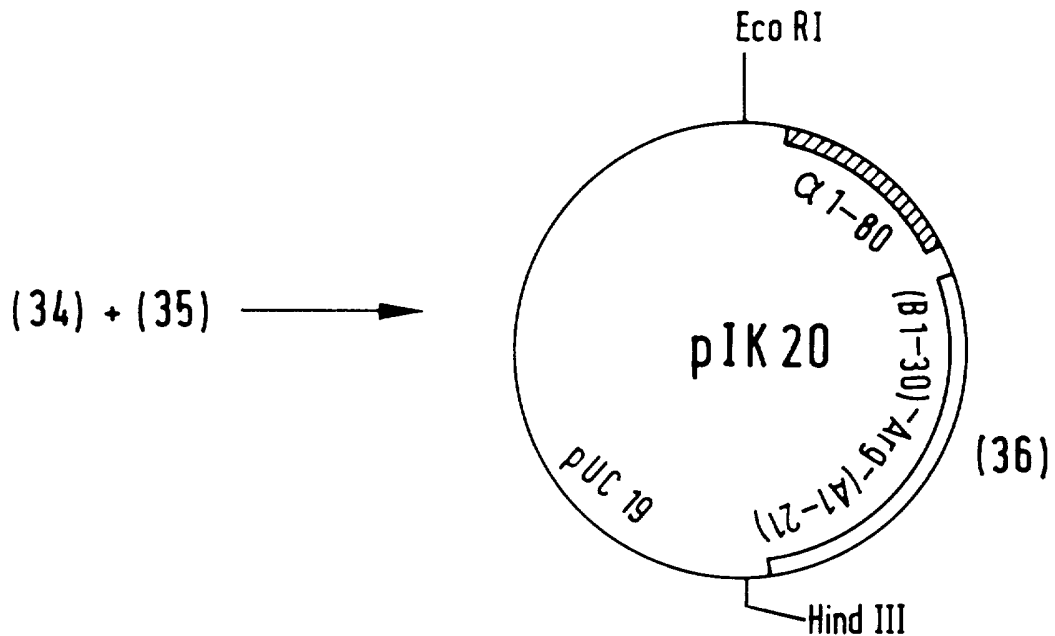
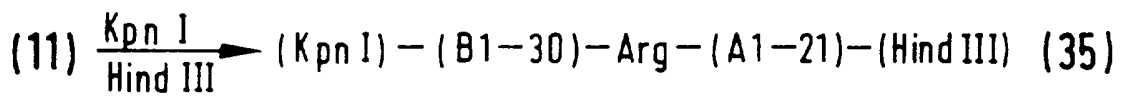
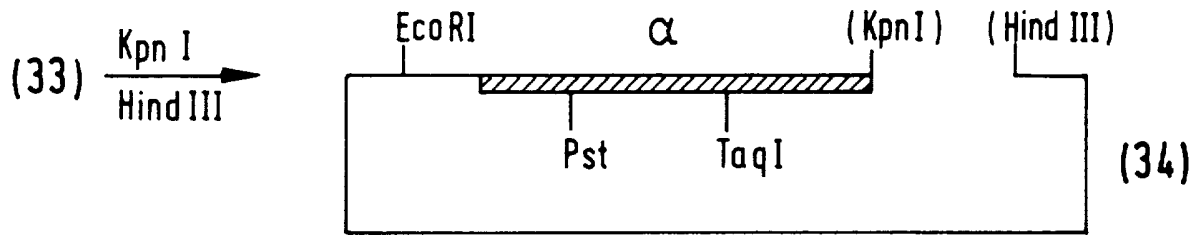


FIG. 2



Handwritten signature

FIG. 2a



Handwritten signature or initials.

FIG. 2b

