



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

(21) **PI 0823004-8 A2**



(22) Data de Depósito: 19/09/2008
(43) Data da Publicação: 29/05/2012
(RPI 2160)

(51) *Int.Cl.:*
C07K 1/12
C07K 14/62
C12P 21/06

(54) **Título:** PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA

(30) **Prioridade Unionista:** 07/08/2008 IN 01904/CHE/2008

(73) **Titular(es):** Biocon Limited

(72) **Inventor(es):** Hazra, Partha, Iyer, HArish, Sastry, Kedarnath, Nanjund, Sathyanarayana, Srikanth, Golarahosahalli, Shivarudraiah, Manjunath, Hadavanahalli, Sreenivas, Suma

(74) **Procurador(es):** Guerra Propriedade Industrial

(86) **Pedido Internacional:** PCT IN2008000598 de 19/09/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2010/016069de
11/02/2010

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA. A presente invenção se relaciona à preparação de compostos de insulina incluindo seus análogos ou derivados de suas formas precursoras correspondentes por uma reação enzimática de uma etapa envolvendo o uso combinatório e concorrente de quantidades ótimas de tripsina e carboxipeptidase B que trabalham de forma sinérgica direcionando a reação de forma controlada para evitar a produção de subprodutos aleatórios indesejáveis. Particularmente, as reações de conversão enzimática da invenção oferecem vantagens de redução no número de etapas operacionais, maior rendimento e pureza dos produtos finais desejados.

PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA

ÁREA DA INVENÇÃO

A presente invenção se relaciona à preparação de compostos de insulina incluindo seus análogos ou derivados de suas formas precursoras correspondentes por uma reação enzimática de uma etapa envolvendo o uso combinatório e concorrente de quantidades ótimas de tripsina e carboxipeptidase B que trabalham de forma sinérgica direcionando a reação de forma controlada para evitar a produção de subprodutos aleatórios indesejáveis. Particularmente, as reações de conversão enzimática da invenção oferecem vantagens de redução no número de etapas operacionais, maior rendimento e pureza dos produtos finais desejados.

ANTECEDENTES E MODELOS ANTERIORMENTE CONHECIDOS DA INVENÇÃO

Os métodos de engenharia genética estão cada vez mais permitindo que formas precursoras de insulina se expressem em microorganismos (EP-A-347 781, EP-A-367 163). As sequências pró e pré são normalmente clivadas química e/ou enzimaticamente (DE-P-3 440 988, EP-A-0264250). Os métodos conhecidos de conversão enzimática se baseiam em clivagem com tripsina e carboxipeptidase B (Kemmler W. et al. J. Biol. Chem., 246 (1971) 6786-6791; EP-A-195 691; EP-B-89007). No processo típico de conversão da molécula precursora de insulina para a molécula correspondente, o peptídeo ligador entre as cadeias A e B é removido. A reação enzimática com tripsina é uma reação enzimática e complexa que cliva não apenas as ligações de peptídeo cuja clivagem produz insulina humana ou os produtos finais desejados mas também, em uma reação concorrente, a clivagem em outros locais suscetíveis produz uma diversidade de subprodutos indesejáveis.

Métodos de modelos anteriormente conhecidos incluem o uso de tripsina e uma segunda enzima carboxipeptidase de tal maneira que a segunda enzima

carboxipeptidase é acrescentada quando o intermediário necessário será formado na reação. A desvantagem desses métodos é a formação de grandes quantidades de subprodutos de impurezas que só podem ser removidos da solução de reação com dificuldade. No caso particular da conversão da forma precursora humana em 5 insulina humana (insulina humana, HI), há a formação de grandes quantidades de des-Thr-(B30)-insulina humana (des-Thr(B30)-HI).

Pelo que se viu acima, fica evidente que seria vantajoso seguir um processo de reação enzimática mais simples para a clivagem de compostos de insulina precursores, seus análogos e derivados de insulina através de uma etapa muito 10 mais simples que remova as possíveis formações de impurezas poliméricas da forma mais completa possível e, ao mesmo tempo, aumente a concentração do produto final desejado de insulina o máximo possível. Uma condição adicional é a necessidade garantir um alto rendimento geral aumentando a facilidade de operação, qualidade bem como a quantidade do produto final desejado.

15 As desvantagens dos processos conhecidos foram solucionadas pelas reações enzimáticas realizadas nesta invenção, e resultou que o aumento no rendimento sem subprodutos desejados é relativo à concentração ótima de tripsina e carboxipeptidase usada sob condições de reação conducentes. Os inventores se esforçaram para desenvolver um processo aperfeiçoado de reação enzimática de 20 uma etapa envolvendo o uso combinatório e concorrente de quantidades ótimas de tripsina e carboxipeptidase B que trabalham sinergicamente para fornecer os produtos finais desejados, aumentando a facilidade de operação, pureza e rendimento dos produtos finais.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

25 O principal objetivo da presente invenção é obter um processo para

preparação de compostos de insulina e seus análogos ou derivados de seus precursores correspondentes com a mínima formação de subprodutos indesejados que seja habilitado por uma reação enzimática de uma etapa envolvendo o uso combinatório e concorrente de tripsina e carboxipeptidase B trabalhando
5 sinergicamente para fornecer os produtos finais desejados.

Outro principal objetivo da presente invenção é fornecer um precursor análogo de insulina como representado pelo SEQ IDs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e que possa ser usado como material iniciador. Tais precursores podem ser em forma de líquido ou de cristal.

10 Outro objetivo da presente invenção é fornecer um vetor de expressão para a expressão de pró-insulina e seus análogos ou derivados que inclua a sequência de DNA respectiva que codifique a molécula precursora.

Outro objetivo da presente invenção é fornecer um microorganismo/hospedeiro adequado que seja transformado com tal vetor de
15 expressão e posteriormente forneça um processo para preparar os compostos de insulina respectivos, que inclua a cultura de tal microorganismo transformado em um meio de fermentação e condições de fermentação adequadas para produzir as formas precursoras de insulina.

Outro objetivo da presente invenção inclui o método de converter as formas
20 precursoras de compostos de insulina para as suas respectivas formas ativas através de uma reação enzimática de uma etapa em que a tripsina e a carboxipeptidase são acrescentadas juntas em quantidades ótimas que permitam uma reação sinérgica e controlada minimizando a produção de produtos finais indesejáveis.

25 Outro objetivo da presente invenção é obter um processo para obter insulina

ou seus análogos ou derivados de seus respectivos correspondentes precursores incluindo a realização sucessiva das etapas em ordem sequencial.

Outro objetivo da presente invenção é obter uma molécula de insulina.

Outro objetivo da presente invenção é obter uma molécula de insulina selecionada do grupo contendo insulina, lispro, asparte, glulisina ou IN-105.

DECLARAÇÃO DA INVENÇÃO

Assim, a presente invenção se relaciona a um processo para preparação de compostos de insulina e seus análogos ou derivados de seus precursores correspondentes, o que inclui o tratamento de tal precursor com tripsina e carboxipeptidase usados de forma combinatória e concorrente, contanto que a proporção de concentração de tripsina em relação à carboxipeptidase seja de certa de 5:1 a cerca de 50:1; um processo para obter insulina ou seus análogos ou derivados de seus precursores correspondentes incluindo a realização sucessiva das seguintes etapas na seguinte ordem sequencial (a) dissolver a quantidade ótima do precursor de insulina ou derivado de insulina em uma solução tampão; (b) preparar várias alíquotas da solução precursora em faixas de pH de aproximadamente 7,0 a 9,0; (c) introduzir as enzimas tripsina e carboxipeptidase de forma concorrente às várias alíquotas preparadas na Etapa (b) e incubar a mistura por aproximadamente 4 a 10 horas; (d) precipitar o produto desejado de insulina pela adição de tampão de ácido cítrico e $ZnCl_2$; uma molécula de insulina preparada e uma molécula de insulina do grupo incluindo insulina, lispro, asparte, glulisina ou IN-105,

BREVE DESCRIÇÃO DAS LISTAS ACOMPANHANTES DE SEQUÊNCIA

SEQ ID 1: Sequência de aminoácidos da molécula precursora de Asparte.

SEQ ID 2: Sequência de aminoácidos da molécula precursora de Asparte.

SEQ ID 3: Sequência de aminoácidos da molécula precursora de Asparte.

SEQ ID 4: Sequência de aminoácidos da molécula precursora de Lispro.

SEQ ID 5: Sequência de aminoácidos da molécula precursora de Lispro.

SEQ ID 6: Sequência de aminoácidos da molécula precursora de Lispro.

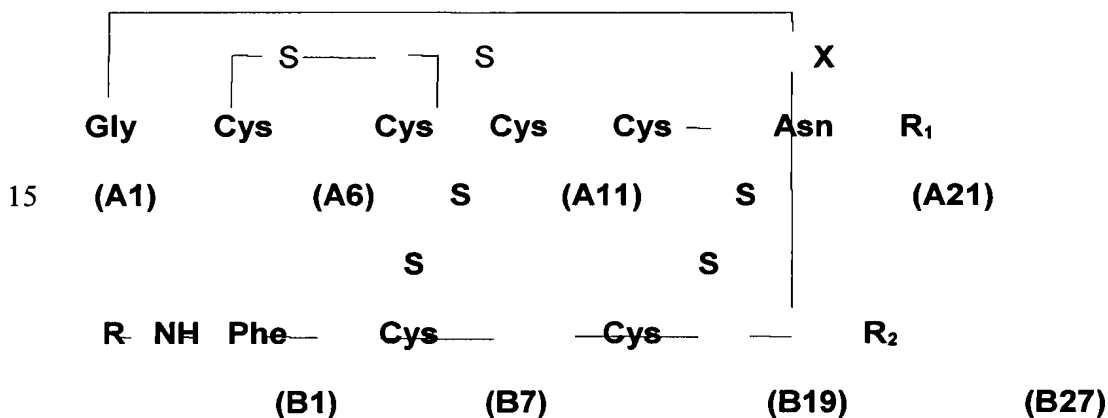
5 **SEQ ID 7:** Sequência de aminoácidos da molécula precursora de Glulisina.

SEQ ID 8: Sequência de aminoácidos da molécula precursora de Glulisina.

SEQ ID 9: Sequência de aminoácidos da molécula precursora de Glulisina.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se relaciona a um processo de preparação de
10 compostos de insulina e seus análogos ou derivados de seus precursores
correspondentes representado pela fórmula:



onde,

20 **R** é hidrogênio ou um resíduo de aminoácido química ou enzimaticamente
clivável ou um peptídeo química ou enzimaticamente clivável incluindo pelo menos
dois resíduos de aminoácido.

R₁ é OH ou um resíduo de aminoácido, ou Y₁-Y₂ no qual Y é um resíduo de
aminoácido.

25 As metades A1 a A21 correspondem à cadeia de insulina e as metades B1 a

B27 correspondem à cadeia de insulina B incluindo substituição, exclusão e/ou adições de aminoácido.

R_2 é Z_1-Z_2 onde Z_1 é selecionado de Pro, Lys, Asp e Z_2 é selecionado de Lys ou Pro ou Glu ou $Z_1-Z_2-Z_3$ onde Z_1 é selecionado de Pro, Lys, Asp e Z_2 é selecionado de Lys ou Pro ou Glu e Z_3 é treonina ou uma metade de peptídeo de pelo menos três resíduos de aminoácido com a condição de que o aminoácido correspondente a B30 is treonina.

X é um polipeptídeo que conecta a cadeia A à cadeia B, que pode ser clivado enzimaticamente sem perturbar a cadeia A ou a cadeia B contendo pelo menos dois aminoácidos onde o primeiro e o último aminoácido é lisina ou arginina.

O que inclui o tratamento de tal precursor com tripsina e carboxipeptidase usados de forma combinatória e concorrente, contanto que a proporção de concentração de tripsina em relação à carboxipeptidase seja de cerca de 5:1 a 50:1.

Em outra configuração da presente invenção, a respectiva molécula precursora inclui uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85% homóloga à sequência de aminoácidos como especificada em SEQ IDs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

Em outra configuração da presente invenção a quantidade relativa de tripsina em relação à do precursor de insulina fica na faixa de 1:10 a 1:500 aproximadamente.

Em outra configuração da presente invenção a quantidade relativa de tripsina em relação à do precursor de insulina é de cerca de 1:100.

Em outra configuração da presente invenção a quantidade relativa de carboxipeptidase em relação à do precursor de insulina é de cerca de 1:500.

Em outra configuração da presente invenção a proporção da concentração de tripsina em relação à de carboxipeptidase é de 5:1 a 50:1 aproximadamente.

Em outra configuração da presente invenção a proporção da concentração de tripsina em relação à de carboxipeptidase é de 5:1 aproximadamente.

Em outra configuração da presente invenção a concentração de tripsina usada para a reação de conversão é de pelo menos 0,01mg/ml

5 Em outra configuração da presente invenção a concentração de carboxipeptidase usada para a reação de conversão é de pelo menos 0,001mg/ml

Em outra configuração da presente invenção o precursor está em forma de líquido ou de cristal.

Em outra configuração da presente invenção a reação de conversão é
10 realizada a um pH de 6,5 a 10.

Em outra configuração da presente invenção a reação de conversão é realizada a um pH de 7 a 9.

Em outra configuração da presente invenção a reação de conversão é realizada a uma faixa de temperatura de 2°C a 40°C.

15 Em outra configuração da presente invenção a reação de conversão a duração da reação de conversão enzimática é de 2 a 24 horas.

Em outra configuração da presente invenção o meio de reação contém pelo menos 30% de água ou solvente miscível em água.

Em outra configuração da presente invenção o solvente miscível em água é
20 selecionado do grupo incluindo metanol, etanol, acetona ou N,N-dimetilformamida.

Em outra configuração da presente invenção o meio de reação inclui ainda um sal que age como agente tamponador.

Em outra configuração da presente invenção o sal é selecionado do grupo incluindo TRIS, etilenodiamina, trietanolamina, glicina, HEPES (N-2-hidróxi-
25 etilpiperazina-N'-2-ácido etanossulfônico).

Em outra configuração da presente invenção a concentração de sal usado no meio de reação é de 10mM a 1M aproximadamente.

Em outra configuração da presente invenção a concentração de sal usado no meio de reação é de cerca de 0,6M.

5 A presente invenção se relaciona a um processo para obter insulina ou seus análogos ou derivados de seus respectivos correspondentes precursores incluindo a realização sucessiva das seguintes etapas na seguinte ordem sequencial

(a) Dissolver uma quantidade ótima do precursor de insulina ou derivado de insulina em uma solução tampão.

10 (b) Preparar várias alíquotas da solução precursora em faixas de pH de aproximadamente 7,0 a 9,0.

(c) introduzir as enzimas tripsina e carboxipeptidase de forma concorrente às várias alíquotas preparadas na Etapa (b) e incubar a mistura por aproximadamente 4 a 10 horas.

15 (d) Precipitar o produto desejado de insulina pela adição de tampão de ácido cítrico e ZnCl₂.

A presente invenção se relaciona a uma molécula de insulina preparada de acordo com qualquer das reivindicações anteriores.

20 A presente invenção se relaciona a uma molécula de insulina preparada de acordo com qualquer das reivindicações anteriores selecionada do grupo contendo insulina, lispro, asparte, glulisina ou IN-105.

Agora será feita referência detalhada às configurações atualmente preferidas da invenção, as quais, juntamente com o exemplo a seguir, servem para explicar os princípios da invenção.

25 Ao descrever e reivindicar a presente invenção será usada a seguinte

terminologia de acordo com as definições aqui especificadas.

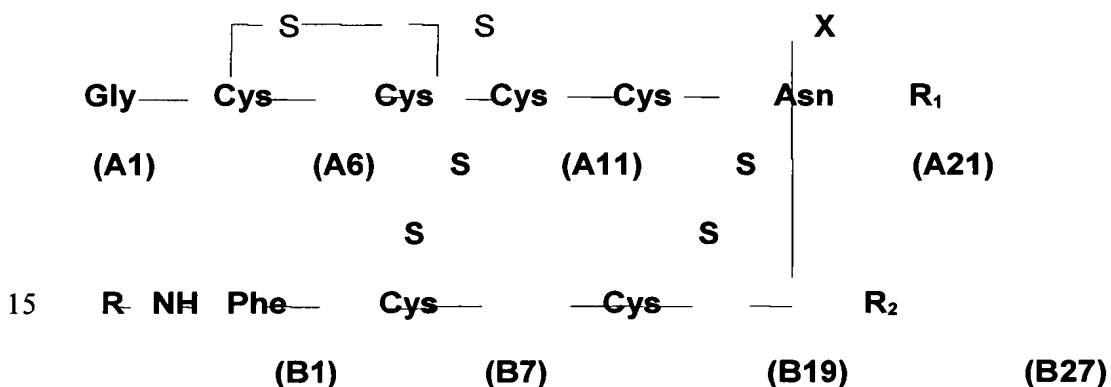
A menos que aqui definido de outra forma, termos científicos e técnicos usados em ligação com a presente invenção terão os significados comumente entendidos pelas pessoas de conhecimento normal do ofício. Além disso, a menos
5 que exigido de outra forma pelo contexto, expressões no singular incluem o plural e expressões no plural incluem o singular. Os métodos e técnicas da presente invenção são normalmente realizados de acordo com os métodos convencionais bem conhecidos no ofício. Em geral, as nomenclaturas vinculadas e técnicas aqui descritas são as bem conhecidas e comumente utilizadas no ofício. Os métodos e
10 técnicas da presente invenção são normalmente realizados de acordo com os métodos convencionais bem conhecidos no ofício.

Da forma usada aqui, "**aminoácido**" se refere a sequências de peptídios ou proteínas ou partes delas. Os termos "proteína", "peptídio" e "polipeptídio" são usados de forma intercambiável.

15 O termo "**insulina**" aqui abrange a insulina de qualquer espécie, como insulina suína, bovina e humana e complexos destas, tais como complexos de zinco incluindo dímeros e oligômeros, por exemplo, hexâmeros destes. Além disso, o termo "**insulina**" aqui também inclui os chamados "**análogos de insulina**". Um análogo de insulina é uma molécula de insulina contendo uma ou mais mutações,
20 substituições, exclusões e/ou adições das cadeias de aminoácido A e/ou B em relação à molécula de insulina humana nativa. Mais especificamente um ou mais dos resíduos de aminoácido podem ter sido trocados com outro resíduo de aminoácido e/ou um ou mais resíduos de aminoácido podem ter sido excluídos e/ou um ou dois resíduos de aminoácido podem ter sido acrescentados, com a condição
25 deque tal análogo de insulina tenha uma atividade de insulina suficiente. Os

análogos de insulina são, de preferência, aqueles em que um ou mais dos resíduos de aminoácido de ocorrência natural, de preferência um, dois ou três, tenham sido substituídos por um resíduo de aminoácido codificável. Exemplos de análogos de insulina são descritos nas seguintes patentes e equivalentes. US 5,618,913, EP 254,516, EP 280,534, US 5,750,497 e US 6,011,007. Exemplos de análogos específicos de insulina são a insulina asparte (isto é, insulina humana AspB28) e a insulina lispro (isto é, insulina humana LysB28, ProB29) e a "insulina glulisina" (insulina humana Lys B(3), Glu B(29)).

Um aspecto da invenção se relaciona aos compostos precursores de insulina representados pela seguinte fórmula:



onde,

R é hidrogênio ou um resíduo de aminoácido química ou enzimaticamente clivável ou um peptídeo química ou enzimaticamente clivável incluindo pelo menos dois resíduos de aminoácido.

R₁ é OH ou um resíduo de aminoácido, ou Y₁-Y₂ no qual Y é um resíduo de aminoácido.

As metades A1 a A21 correspondem à cadeia de insulina e as metades B1 a B27 correspondem à cadeia de insulina B incluindo substituição, exclusão e/ou adições de aminoácido.

R2 é Z1-Z2 onde Z1 é selecionado de Pro, Lys, Asp e Z2 é selecionado de Lys ou Pro ou Glu ou Z1-Z2-Z3 onde Z1 é selecionado de Pro, Lys, Asp e Z2 é selecionado de Lys ou Pro ou Glu e Z3 é treonina ou uma metade de peptídeo de pelo menos três resíduos de aminoácido com a condição de que o aminoácido correspondente a B30 is treonina.

X é um polipeptídeo que conecta a cadeia A à cadeia B, que pode ser clivado enzimaticamente sem perturbar a cadeia A ou a cadeia B contendo pelo menos dois aminoácidos onde o primeiro e o último aminoácido é lisina ou arginina.

Um aspecto da presente invenção se relaciona especificamente com a molécula IN-105. IN-105 é uma molécula de insulina conjugada no aminoácido épsilon Lisina na posição B29 da cadeia B de insulina com um oligômero anfifílico de fórmula estrutural $\text{CH}_3\text{O}-(\text{C}_4\text{H}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$. A molécula pode ser monoconjugada em A1, B1 e B29, diconjugada em várias combinações de A1, B1 e B29 ou triconjugadas em várias combinações de A1, B1 e B29.

Em um aspecto, a molécula precursora de insulina isolada que inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 88% de identidade de

sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de ácido nucleico e alternativamente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de ácido nucleico para uma molécula de polipeptídeo como representada pela SEQ IDs 1, 2, 3, 4, 5 e 6;

15 **Tripsina** é uma típica protease de serina e hidrolisa uma proteína ou um peptídeo no terminal de carboxila de um resíduo de arginina ou lisina (Enzymes, pp 261-262(1979), ed. Dixon, M. & Webb, E. C., Longman Group Ltd., Londres). Em particular, a hidrólise fácil ocorre em um local bibásico onde existem dois resíduos sucessivos de arginina ou lisina, e é sabido que a hidrólise ocorre mais rapidamente nos casos em que o local bibásico se localiza dentro ou próximo a uma estrutura β -volta (Rholam, M., et al. FEBS Lett., 207, 1-6(1986).The Enzyme Vol. II, 3ª Edição, Editor Boyer, Acad. Press NY. Pp. 249-275). Em particular a tripsina cliva as ligações de peptídeo nos resíduos de arginina (Arg) ou lisina (Lys) do terminal C. A clivagem triptica das moléculas precursoras de insulina pode ocorrer
20
25 simultaneamente em diferentes locais de clivagem. Em razão dos muitos lados de

clivagem dentro de uma molécula precursora de insulina específica, muitos produtos colaterais indesejáveis podem se formar durante a reação de clivagem trípica.

A tripsina pancreática suína recombinante tem um peso molecular de cerca de 23.000 dáltons e uma atividade enzimática ótima a um pH 8.0. A tripsina é usada no processo industrial de produção de insulina e análogos de insulina. A produção dessas biomoléculas é descrita na literatura e foram escolhidas várias abordagens.

A carboxipeptidase B preferencialmente hidrolisa os aminoácidos básicos lisina, arginina e ornitina da posição terminal C de polipeptídios. A carboxipeptidase B é uma exopeptidase que catalisa uma liberação hidrolítica dos resíduos de aminoácido básicos de terminal C de arginina e lisina de peptídios e proteínas.

A expressão "**peptídio C**" ou "**peptídio ligador**" da forma aqui utilizada inclui todas as formas de peptídio C de insulina, incluindo peptídios nativos ou sintéticos. Tais peptídios C de insulina podem ser peptídios humanos, ou podem ser de espécies e gêneros animais, de preferência mamíferos. Assim, as variantes e modificações do peptídio C de insulina nativo são incluídas contanto que retenham a atividade de peptídio C de insulina. Sabe-se no ofício como modificar as sequências de proteínas ou peptídios retendo sua atividade útil, e isso pode ser obtido usando-se técnicas que são padrão no ofício e amplamente descritas na literatura, por exemplo, mutagênese aleatória ou direcionada ao local, clivagem e ligação de ácidos nucleicos, etc. Assim, variantes funcionalmente equivalentes ou derivados de sequências de peptídio C de insulina nativa podem ser prontamente preparadas de acordo com as técnicas bem conhecidas no ofício e incluem sequências de peptídio com atividade funcional, por exemplo, biológica de um peptídio C de insulina nativa. Todos esses análogos, variantes, derivados ou fragmentos de peptídio C de insulina são especialmente incluídos no escopo desta invenção e são agrupados na

expressão "peptídio C de insulina".

Os principais requisitos de um peptídio C é que deve ser de extensão suficiente para permitir uma formação de ligação dissulfeto entre as cadeias A e B e que possa ser clivável desde o precursor de insulina até a formação de insulina. Um dipeptídio típico usado como peptídio C é -Arg-Arg-. Peptídios C podem ser de qualquer extensão que comece com Arg ou Lys e termine com Arg ou Lys.

A invenção fornece vetores incluindo DNA que codifica qualquer dos genes aqui descritos. Também é fornecida uma célula hospedeira incluindo qualquer desses vetores. Como exemplo, as células hospedeiras podem ser bacterianas, fúngicas ou mamíferas.

A invenção emprega uma célula hospedeira recombinante na qual é produzida pelo menos uma parte da sequência de ácido nucleico que expressa o precursor do composto de insulina. Um sistema de expressão recombinante é selecionado de hospedeiros procarióticos e eucarióticos. Os hospedeiros eucarióticos incluem células de levedura (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*), células mamíferas ou células vegetais. Células bacterianas eucarióticas estão disponíveis em diferentes fontes, incluindo fontes comerciais para os experientes no ofício, por exemplo, a Coleção de Cultura de Tipo Americano (ATCC; Rockville, Md.). As fontes comerciais das células usadas para expressão de proteína recombinante também fornecem instruções para o uso das células. A escolha do sistema de expressão depende dos recursos desejados para o polipeptídio expressado.

Mais preferencialmente relacionadas aos aspectos da presente invenção, as células hospedeiras mais preferidas são a leveduras metilotróficas. Cepas de levedura metilotrófica que podem ser modificadas usando a presente invenção

incluem, entre outras, cepas de levedura capazes de crescer no metanol, tais como leveduras do gênero *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* ou *Torulopsis*. As leveduras metilotróficas preferidas são do gênero *Pichia*. As cepas de levedura metilotrófica que podem ser modificadas usando os presentes métodos também incluem as

5 cepas de levedura metilotrófica que foram projetadas para expressar uma ou mais proteínas heterólogas de interesse. A célula hospedeira de maior preferência de acordo com a presente invenção é *Pichia pastiris*, é GS115.

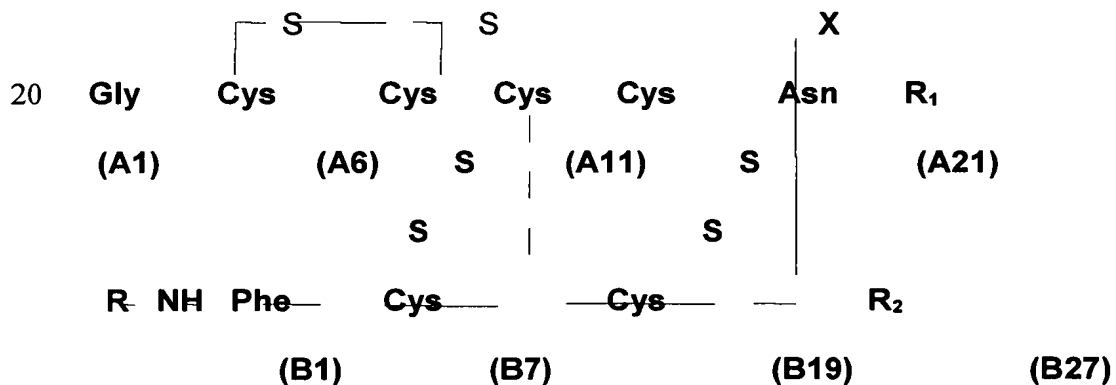
A célula hospedeira ou organismo pode ser projetada para expressar a proteína recombinante ou peptídeo usando técnicas padrão. Por exemplo, a proteína

10 recombinante pode ser expressa de um vetor ou de um gene exógeno inserido no genoma do hospedeiro.

Os vetores que podem ser usados para expressar proteínas exógenas são bem conhecidos no ofício e são descritos abaixo. Os vetores preferidos da presente invenção que carregam genes da molécula precursora de insulina incluem, entre

15 outros, pPIC9K.

O aspecto mais significativo da presente invenção se relaciona a um processo para conversão de compostos de insulina e seus análogos ou derivados de seus precursores correspondentes representado pela fórmula



25 onde,

R é hidrogênio ou um resíduo de aminoácido química ou enzimaticamente clivável ou um peptídeo química ou enzimaticamente clivável incluindo pelo menos dois resíduos de aminoácido.

R1 é OH ou um resíduo de aminoácido, ou Y1-Y2 no qual Y é um resíduo de aminoácido.

As metades A1 a A21 correspondem à cadeia de insulina e as metades B1 a B27 correspondem à cadeia de insulina B incluindo substituição, exclusão e/ou adições de aminoácido.

R2 é Z1-Z2 onde Z1 é selecionado de Pro, Lys, Asp e Z2 é selecionado de Lys ou Pro ou Glu ou Z1-Z2-Z3 onde Z1 é selecionado de Pro, Lys, Asp e Z2 é selecionado de Lys ou Pro ou Glu e Z3 é treonina ou uma metade de peptídeo de pelo menos três resíduos de aminoácido com a condição de que o aminoácido correspondente a B30 is treonina.

X é um polipeptídeo que conecta a cadeia A à cadeia B, que pode ser clivado enzimaticamente sem perturbar a cadeia A ou a cadeia B contendo pelo menos dois aminoácidos onde o primeiro e o último aminoácido é Lisina ou Arginina.

O que inclui o tratamento de tal precursor com tripsina e carboxipeptidase usados de forma combinatória e concorrente, contanto que a proporção de concentração de tripsina em relação à carboxipeptidase seja de cerca de 5:1 a 50:1.

A molécula precursora pode ser em forma de líquido ou de cristal.

O processo de conversão da molécula precursora de insulina à sua molécula de insulina correspondente é realizado em meio aquoso composto de pelo menos cerca de 40% de água; no entanto, ele não impede a presença de pelo menos cerca de 30%, ou cerca de 50%, ou cerca de 60% ou cerca de 70% ou cerca de 80% de água e também a presença de solventes miscíveis em água tais como metanol,

etanol, acetona, N,N-dimetilformamida e similares.

O meio de reação também pode incluir qualquer sal com propriedades tamponadoras. De preferência, o meio de reação inclui Tris como sal na concentração na faixa de 10mM a 1M. De forma mais preferível, a concentração de
5 Tris usado no meio de reação é de 0,6M.

A conversão é realizada em qualquer das temperaturas em uma faixa ampla, geralmente de cerca de 0°C a 40°C. De preferência a reação é conduzida a uma temperatura de cerca de 10°C a cerca de 30°C e de forma mais preferível de cerca de 15°C até cerca de 25°C.

10 O pH da mistura da reação pode estar num ponto qualquer entre cerca de 2 e cerca de 12. No entanto, são obtidos melhores resultados com um cuidadoso controle de pH de forma que a reação progrida em uma faixa de pH de cerca de 6,5 a 10. De preferência a reação ocorre a uma faixa de pH de 7 a 9,5, De preferência de cerca de 8 a 9, e quando controlada com precisão a um pH de 8,5.

15 O controle de pH é efetuado por uso de um agente tamponador. Qualquer um na ampla faixa de tampões adequados usados inclui TRIS, etilenadamina, trietanolamina, glicina, HEPES (N-2-hidróxi-etilpiperazina-N'-2-ácido etanossulfônico) e similares.

A quantidade de tripsina e carboxipeptidase B que geralmente é usada e
20 relacionada tanto entre as duas enzimas quanto à quantidade da molécula precursora de insulina. As enzimas podem ser incorporadas nas misturas da reação seja na solução ou usando técnicas reconhecidas como imobilização em um suporte adequado e assim disponibilizadas no meio de reação.

25 Numa relação peso:peso, a tripsina geralmente estará presente em uma quantidade relativa à do precursor de insulina numa faixa de cerca de 1:10 a cerca

de 1:500, de preferência, de cerca de 1:10 a cerca de 1:200, de forma ainda mais preferencial, de cerca de 1:10 a cerca de 1:100 ou de 1:10 a cerca de 1:50 ou de cerca de 1:10 a cerca de 1:25. A concentração mais preferível de tripsina em relação à concentração de insulina utilizada é de 1:100. A concentração de tripsina usada para a reação de conversão é de pelo menos 0,01mg/ml

5 Numa relação peso:peso, a carboxipeptidase B geralmente estará presente em uma quantidade relativa à do precursor de insulina numa faixa de cerca de 1:500 ou cerca de 3:500. A concentração mais preferível de carboxipeptidase em relação à concentração de insulina utilizada é de 1:500. A concentração de carboxipeptidase usada para a reação de conversão é de pelo menos 0,001mg/ml

Outro parâmetro significativo da presente invenção é a proporção de tripsina em relação à carboxipeptidase B na mistura da reação. Em geral, em termos de peso, a proporção de tripsina em relação à carboxipeptidase B está na faixa de 5:1 a 50:1. De preferência, em termos de peso, a proporção de tripsina em relação à carboxipeptidase B é de cerca de 50:3 a cerca de 5:3. A proporção mais preferível de tripsina em relação à carboxipeptidase B é de cerca de 5:1.

A duração da reação pode ir de 2 a 48 horas. De preferência a duração da reação é de cerca de 2 a 24 horas.

Assim também, presente invenção relacionada a um processo para obter insulina ou seus análogos ou derivados de seus respectivos correspondentes precursores inclui a realização sucessiva das seguintes etapas em ordem sequencial com disposto abaixo:

- (a) Dissolver uma quantidade ótima do precursor de insulina ou derivado de insulina em uma solução tampão.
- 25 (b) Preparar várias alíquotas da solução precursora em faixas de pH de

aproximadamente 7,0 a 9,0.

(c) introduzir as enzimas tripsina e carboxipeptidase de forma concorrente às várias alíquotas preparadas na Etapa (b) e incubar a mistura por aproximadamente 4 a 10 horas.

- 5 (d) Precipitar o produto desejado de insulina pela adição de tampão de ácido cítrico e $ZnCl_2$.

A configuração preferida da invenção é descrita abaixo nos Desenhos e Descrição das Configurações Preferidas. Enquanto essas descrições descrevem diretamente as configurações acima, fica entendido que as pessoas com habilidade
10 no ofício podem conceber modificações e/ou variações às configurações específicas aqui demonstradas e descritas. Qualquer dessas modificações ou variações que cair no escopo desta descrição se destina a ser nela incluída também. A menos que especificamente observado, é a intenção do inventor que as palavras e frases na e especificação e reivindicações tenham os significados comuns e costumeiros às
15 pessoas de conhecimento normal do(s) ofício(s) aplicável(is). A descrição de uma configuração preferida e melhor forma conhecida da invenção pelo solicitante no momento de encaminhar a solicitação foi apresentada e se destina somente a ilustração e descrição. Não se pretende esgotar ou limitar a invenção à forma
precisa divulgada, e muitas modificações e variações são possíveis à luz dos
20 ensinamentos acima. A configuração foi escolhida e descrita para explicar da melhor forma os princípios da invenção e sua aplicação prática e para permitir a outros com habilidade no ofício a utilizar da melhor forma a invenção Em diversas configurações e com várias modificações como seja adequado ao uso particular contemplado.

A invenção é ainda detalhada com a ajuda dos seguintes exemplos. No
25 entanto, esses exemplos não devem ser interpretados como limitando o escopo da

invenção.

EXEMPLO 1A:

Precursor de Asparte (Seq ID 1, 2 e 3)

Precursor de asparte da Fórmula X- [Cadeia B de Asparte (B1-B30)]-Y-
5 [cadeia A de Asparte (A1-A21)], onde X é uma sequência de peptídeo líder, a cadeia
B é a sequência da cadeia B de Asparte de B1-B30, Y é uma sequência de peptídeo
ligadora entre a cadeia B e a cadeia A, a cadeia A é a cadeia A de Asparte. A
sequência pode ser desprovida de líder ou outro peptídeo líder (por exemplo,
EEAEAEAEPR ou GAVR). O peptídeo ligador Y pode ser qualquer um do exemplo R,
10 e RDADDR.

(Comentário: o "RR" no peptídeo ligador foi removido, favor remover em outros
locais, se eu tiver esquecido).

A sequência precursora é representada por SEQ IDs 1 e 2. O precursor pode
ser produzido por qualquer sistema de expressão adequado como *Escherichia coli*,
15 *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, células CHO, etc.

O precursor de asparte foi clonado no quadro com o peptídeo de sinal Mat-alfa
no vetor de expressão *Pichia*, pPIC9K. A cepa hospedeira *Pichia pastoris* GS115 foi
transformada com o plasmídeo recombinante para obter um clone expressando o
precursor de asparte.

20 O precursor de asparte é secretado por *Pichia pastoris* no meio de cultura. O
caldo é centrifugado e as células são separadas do sobrenadante. Existem múltiplas
opções disponíveis para a captura do precursor incluindo cromatografia de troca de
íons e cromatografia hidrofóbica. Para esta invenção, foi usada a cromatografia de
troca de cátions e HIC para capturar o precursor específico.

25 **EXEMPLO 1B:**

Precursor de Lispro (Seq ID 3, 4 e 5)

Precursor de asparte da Fórmula X- [Cadeia B de Lispro (B1-B30)]-Y-[cadeia A de Lispro (A1-A21)], onde X é uma sequência de peptídeo líder, a cadeia B é a sequência da cadeia B de Lispro de B1-B30, Y é uma sequência de peptídeo ligadora
5 entre a cadeia B e a cadeia A, a cadeia A é a cadeia A de Lispro. A sequência pode ser desprovida de líder ou outro peptídeo líder. O peptídeo ligador Y pode ser qualquer um do exemplo R, ou RDADDR. A sequência precursora é representada por SEQ IDs 3 e 4. O precursor pode ser produzido por qualquer sistema de expressão adequado como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces*
10 *cerevisiae*, células CHO, etc.

O precursor de Lispro foi clonado no quadro com o peptídeo de sinal Mat-alfa no vetor de expressão *Pichia*, pPIC9K. A cepa hospedeira *Pichia pastoris* GS115 foi transformada com o plasmídeo recombinante para obter um clone expressando o precursor de Lispro.

15 O precursor de Lispro é secretado por *Pichia pastoris* no meio de cultura. O caldo é centrifugado e as células são separadas do sobrenadante. Existem múltiplas opções disponíveis para a captura do precursor incluindo cromatografia de troca de íons e cromatografia hidrofóbica. Para esta invenção, foi usada a cromatografia de troca de cátions e HIC para capturar o precursor específico.

20 EXEMPLO 1C:**Precursor de Glulisina (Seq ID 5, 6 e 7)**

Precursor de asparte da Fórmula X-[Cadeia B de Glulisina (B1-B30)]-Y-[cadeia A de Glulisina (A1-A21)], onde X é uma sequência de peptídeo líder, a cadeia B é a sequência da cadeia B de Glulisina de B1-B30, Y é uma sequência de peptídeo
25 ligadora entre a cadeia B e a cadeia A, a cadeia A é a cadeia A de Glulisina. A

sequência pode ser desprovida de líder ou outro peptídeo líder. O peptídeo ligador Y pode ser qualquer um do exemplo R, ou RDADDR. A sequência precursora é representada por SEQ IDs 5 e 6. O precursor pode ser produzido por qualquer sistema de expressão adequado como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*,
5 *Saccharomyces cerevisiae*, células CHO, etc. O precursor de Glulisina foi clonado no quadro com o peptídeo de sinal Mat-alfa no vetor de expressão *Pichia*, pPIC9K. A cepa hospedeira *Pichia pastoris* GS115 foi transformada com o plasmídeo recombinante para obter um clone expressando o precursor de Glulisina.

O precursor de Glulisina é secretado por *Pichia pastoris* no meio de cultura. O
10 caldo é centrifugado e as células são separadas do sobrenadante. Existem múltiplas opções disponíveis para a captura do precursor incluindo cromatografia de troca de íons e cromatografia hidrofóbica. Para esta invenção, foi usada a cromatografia de troca de cátions e HIC para capturar o precursor específico.

Cristalização de Precursor

15 O precursor diferente de composto de insulina capturado do caldo de fermentação usando a etapa de cromatografia de troca de cátions foi cristalizado com o objetivo de remoção de cor e armazenamento. A cristalização foi feita de forma tal que a concentração de precursor no começo da cristalização era de cerca
-- de 2 1 20 g/L, de preferência 8 a 14 g/L. A cristalização foi feita acrescentando-se
-- ZnCl₂ e fenol e depois ajustando o pH entre 3,0 e 8,0, de preferência entre 3,5 e 5,5.
20 O fenol pode ser acrescentado de 0,1 a 0,5% do volume de poço de eluição de CIEX. Uma solução de 4% de ZnCl₂ pode ser acrescentada de 3 a 15% do volume de poço de eluição de CIEX. O pH pode ser ajustado usando qualquer álcali, de preferência NaOH ou TRIS. O processo de cristalização pode ser feito a uma
25 temperatura entre 2 e 30°C e a pasta é armazenada por algum tempo para que os

cristais se formem completamente. Os cristais precursores podem ser separados do sobrenadante por centrifugação ou decantação.

EXEMPLO 2A:

Exemplo de cristalização de Lispro Precursor

5 463 ml do poço de eluição (concentração de precursor 13,8 g/L) foram retirados e 2,315 ml de fenol (0,5% do volume do poço de eluição) foram acrescentados após o descongelamento apropriado. A isso se seguiu a adição de 57,875 ml de 4% de solução de ZnCl₂ (12,5% do volume do poço de eluição). O pH era 4,08 neste estágio e foi ajustado para 4,8 acrescentando-se 420 ml de 2,5N NaOH. O líquido mãe foi mantido sob condições de baixa agitação por 15 minutos e depois transferido para a sala fria (2 a 8°C), onde foi mantido de um dia para o outro. Depois a mistura toda foi centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos em uma centrífuga Beckman Coulter Avanti J-26 XP. A perda no sobrenadante foi de 1,55%.

EXEMPLO 2B:

Exemplo de cristalização de Asparte Precursor

15 500 ml do poço de eluição (concentração de precursor 2,9 g/L) foram retirados e 0,625 ml de fenol (0,125% do volume do poço de eluição) foram acrescentados após o descongelamento apropriado. A isso se seguiu a adição de 15,625 ml de 4% de solução de ZnCl₂ (3,125% do volume do poço de eluição). O pH era 4,08 neste estágio e foi ajustado para 4,8 acrescentando-se 315 ml de 2,5N NaOH. O líquido mãe foi mantido sob condições de baixa agitação por 15 minutos e depois transferido para a sala fria (2 a 8°C), onde foi mantido por cinco horas. Depois o sobrenadante foi separado por centrifugação. A perda no sobrenadante foi de 4%.

25 Comentário: Podemos mudar a numeração (asparte como 2A e lispro como 2B)?

Nos demais locais estamos dando os exemplos mantendo a sequência de A: Asparte, B: Lispro e C: Glulisina.

EXEMPLO 2C:

Exemplo de cristalização de Glulisina Precursora

5 250 ml do poço de eluição do processamento de sefarose Sp da Glulisina Precursora (concentração de precursor 13,8 g/L) foram retirados e 0,31 ml de fenol (0,125% do volume do poço de eluição) foram acrescentados após o descongelamento apropriado. A isso se seguiu a adição de 7 ml de 4% de solução de ZnCl₂ (3% do volume do poço de eluição). O pH era 4,13 neste estágio e foi
10 ajustado para 4,9 acrescentando-se 2.5N NaOH. O líquido mãe foi mantido sob condições de baixa agitação por 30 minutos e depois transferido para a sala fria (2 a 8°C), onde foi mantido por cinco horas. Depois o sobrenadante foi separado por centrifugação. A perda no sobrenadante foi de 7%.

EXEMPLO 3A:

15 Reações enzimáticas

Diferentes compostos de insulina podem ser preparados de seu precursor correspondente através de uma conversão enzimática. A conversão direta do precursor ao produto final pode ser obtida pela presença de duas enzimas protease.
As reações enzimáticas foram realizadas de duas formas diferentes. Primeiro, o precursor tem que ser tratado com tripsina ou enzimas semelhantes de origem recombinate vegetal, animal ou microbiana. Quando a reação de tripsina tiver terminado, o intermediário nas mesmas misturas de reação foram tratados com a 2ª enzima de protease carboxipeptidase B ou enzima semelhante de origem recombinate vegetal, animal ou microbiana. A carboxipeptidase B pode atuar no
25 aminoácido básico e na extremidade de terminal C. Alternativamente, as enzimas

de tripsina e carboxipeptidase foram acrescentadas na mistura da reação como um coquetel (juntas) e permitiu-se que as reações continuassem até acontecer a formação do produto ótimo correspondente.

EXEMPLO 4A:

5 Quando somente tripsina foi acrescentada à mistura da reação precursora individual.

2gm de cristais precursores individuais de asparte, lispro e glulisina foram solubilizados com 5ml de 6M de solução TRIS. A concentração do produto da mistura da reação individual foi mantida em 3 a 5 mg/ml. O pH da mistura da reação
10 foi ajustado para 8,5. Foi acrescentada tripsina à mistura da reação individual a uma concentração de 50µg/ml. As reações foram realizadas a 4 ± 0.5 °C e a temperatura ambiente ($24 \pm 0,5$ °C). Foi observado que o perfil cromatográfico ao final da mistura da reação não muda em relação à temperatura de reação, mas o tempo de conclusão da reação diminui à medida que a temperatura aumenta. A temperatura
15 das reações foi mantida a 24 ± 0.5 °C. As reações foram continuadas por 8 horas e ao final das 8 horas as amostras foram analisadas.

De forma semelhante, o precursor individual de asparte, lispro e glulisina foi
.. solubilizado em solução Tris e 50% de solvente dimetilformamida a uma
.. concentração de 3 a 5mg/ml. O pH da mistura da reação foi ajustado para 8,5 e a
20 temperatura da mistura da reação foi mantida a $24 \pm 0,5$ °C. Foi acrescentada tripsina à mistura da reação individual a uma concentração de 50µg/ml.

Observação:

O precursor de asparte foi convertido para B-30 Des-treonina asparte e Des octapeptídio insulina A percentagem de Des treonina asparte foi de 45% e a de
25 desoctapeptídio insulina foi de 36%. A formação do intermediário necessário,

aspartate com resíduo extra de arginina na posição B31, é de cerca de 10 a 14%. Assim, mesmo a 2ª enzima carboxipeptidase B sendo acrescentada à mistura da reação, o rendimento geral para fazer o produto final seria de <10-15%.

Um perfil semelhante do produto foi encontrado quando a reação foi realizada com solvente 50%. Mas o índice de reação é muito lento na presença de solvente. Para se obter um tipo semelhante de perfil as reações têm que continuar por quase 18 horas.

Assim, não seria possível a geração de aspartate do precursor correspondente através da reação sucessiva de protease. Assim, ficou entendido que o B-29Lys do aspartate é o local mais potente para clivagem de tripsina e, à medida que a reação continua, o local B-22Arg também fica com tendência de clivagem de tripsina e, ao final da reação, obtemos uma população mista de B-30 Des treonina e Des-octapeptídeo em cada precursor individual. O produto de clivagem em B-31 arginina é muito baixo em todo o produto do precursor.

O precursor de lispro, sob condição semelhante, foi convertido para produto de lispro com resíduo extra de arginina na posição B31 juntamente com uma grande quantidade de Des-octapeptídeo insulina. Um tipo semelhante de observação foi encontrado quando o precursor de glulisina foi tratado com tripsina sob condições idênticas. Mas os perfis cromatográficos na mistura da reação não foram nem um pouco limpos no caso de precursor de lispro e glulisina. Isso sugere que mesmo o produto final possível, lispro e glulisina, podem ser feitos através da reação sucessiva com a 2ª carboxipeptidase B protease, mas o rendimento geral seria muito baixo.

A presença de 50% de dimetilformamida apenas retarda o índice de reação no caso do precursor de lispro bem como no de glulisina.

Para verificar o conceito, um tipo semelhante de reação de tripsina foi testado no resíduo precursor IN-105 B-29Lys quando o precursor foi bloqueado no precursor In-105 pela cadeia curta de molécula PEG bem como com a molécula precursora não conjugada. Foi observado que, no caso do precursor IN-105 conjugado, a tripsina se cliva mais preferivelmente no terminal c do resíduo de arginina do 31º aminoácido para gerar IN-105 com resíduo extra de arginina no terminal C da cadeia B. Juntamente com a arginina B031 IN-105, a Des Octa insulina também é gerada nesta mistura da reação. Mas quando o precursor IN-105 não conjugado foi tratado com tripsina, a protease se cliva preferivelmente no resíduo B-29 de lisina da extremidade do terminal C para gerar Des-treonina insulina. O perfil cromatográfico no final da reação é o mesmo tanto na presença quanto na ausência de qualquer solvente na mistura da reação. Foi observado que a presença de solvente retarda o índice de reação.

EXEMPLOS 4B:

Na próxima fase das condições experimentais, as reações foram realizadas acrescentando-se tripsina e carboxipeptidase B juntas em uma mistura da reação precursora individual.

A concentração do precursor foi em geral de cerca de 5 a 50 g/L. A reação foi realizada com pH de 5 a 12 aproximadamente, de preferência aproximadamente de 8 a 10. A temperatura da reação foi de 0 a 40°C aproximadamente, de preferência aproximadamente de 2 a 25°C. Foi usado tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) ou outros sistemas tamponadores em diferentes forças iônicas para manter o pH necessário. O tempo de reação foi variável e foi afetado por outras condições de reação. A reação foi continuada até que a pureza do produto começa a diminuir em razão da hidrólise do produto. Geralmente leva cerca de 30 minutos a 24 horas e na

maioria dos casos de 4 a 10 horas aproximadamente.

A concentração da enzima foi determinada dependendo da concentração de substratos e atividade enzimática. Por exemplo, a tripsina cristalina disponível no mercado foi usada de preferência em uma concentração de cerca de 10 a 100 mg/L.

5 **EXEMPLO: 4B (I)**

4gm do cristal precursor de asparte foi dissolvido em 20ml de solução de 1M de TRIS. A concentração do produto da solução foi mantida em 5mg/ml e a concentração de TRIS foi mantida a 0,6 M pelo acréscimo. Alíquotas de certas quantidades foram tiradas ajustando-se o pH da mistura da reação em 2,5N NaOH ou 2N de ácido acético glacial. Foram preparadas alíquotas da mistura da reação a um pH de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. 1 ml de cada uma dessa mistura da reação foi retirado em cada tubo como uma mistura da reação individual em diferentes condições. A reação foi realizada em todas as amostras acrescentando-se tripsina e carboxipeptidase B juntas em diferentes concentrações. Os parâmetros diferentes variáveis são tabulados.

Parâmetros Constantes:

- Concentração do produto 5g
- Concentração de tampão TRIS 0,6M

Parâmetros Variados:

- Concentração de tripsina: 25-500 mg/L
- Concentração de carboxipeptidase: 10-30mg/L
- pH: 7,0-9,0.

Concentração de precursor (g/L)	Concentração de tris (M)	Concentração de tripsina mg/L	Concentração de carboxipeptidase B (mg/L)	pH	Rendimento (%)

5	0.6	500	10	7,0	53
				8,0	66
				9,0	17,5
			30	7,0	54
				8,0	64
				9,0	16
		200	10	7,0	51
				8,0	59
				9,0	24
			30	7,0	28
				8,0	65
				9,0	64
		50	10	7,5	44
				8,0	68
				8,5	75
			30	7,5	45
				8,0	63
				8,5	66
		25	10	7,5	31
				8,0	49
8,5	61				
30	7,5		31		
	8,0		49		
	8,5		62		

Resultado:

Foi observado que, quando a tripsina e a carboxipeptidase foram acrescentadas juntas na mistura da reação, não foi observada a forma Des octapeptídio e des-treonina. Ao final da reação, o asparte é o principal produto. A pureza e o rendimento do asparte gerado variam em condições individuais de reação. O melhor rendimento de 75% de asparte foi observado sob concentração de tripsina de 50mg/L. concentração de carboxipeptidase de 10mg/L e a um pH de 8,5.

EXEMPLO 4B (II):

5gm do cristal precursor de lispro foi dissolvido em 25ml de solução de 1M de TRIS. A concentração do produto da solução foi mantida em 5mg/ml e a concentração de TRIS foi mantida a 0,6 M pelo acréscimo. Aliquotas de certas quantidades foram tiradas ajustando-se o pH da mistura da reação em 2,5N NaOH

ou 2N de ácido acético glacial. Foram preparadas alíquotas da mistura da reação a um pH de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. 1 ml de cada uma das misturas de reação foi colocado em cada tubo e rotulado como amostra A, B, C, etc. A reação foi realizada em todas as amostras acrescentando-se tripsina e carboxipeptidase B juntas em diferentes concentrações. As diferentes condições estão tabuladas.

Parâmetros Constantes:

- Concentração do produto 5g
- Concentração de tampão TRIS 0,6M

Parâmetros Variados:

- 10
- Concentração de tripsina: 25-200 mg/L
 - Concentração de carboxipeptidase: 10-30mg/L
 - PH: 7.0-9.0.

Concentração de precursor (g/L)	Concentração de tris (M)	Concentração de tripsina (mg/L)	Concentração de carboxipeptidase B (mg/L)	pH	Rendimento (%)		
5	0.6	200	10	7,0	33		
				7,5	49		
				8,0	62		
				8,5	65		
				9,0	29		
		200	30	7,0	52		
				7,5	55		
				8,0	61		
				8,5	64		
				9,0	26		
		100	10	10	7,0	11	
					7,5	34	
					8,0	55	
					8,5	59	
					9,0	31	
			100	30	10	7,0	24
						7,5	41
						8,0	54

50		8,5	66	
		9,0	34	
	10	7,0	21	
		7,5	46	
		8,0	66	
		8,5	78	
		9,0	62	
	30	7,0	38	
		7,5	55	
		8,0	64	
		8,5	71	
		9,0	65	
	25	10	7,0	13
			7,5	25
8,0			41	
8,5			44	
9,0			51	
30		7,0	22	
		7,5	25	
		8,0	33	
		8,5	46	
		9,0	55	

Resultados:

Foi observado que, quando a tripsina e a carboxipeptidase foram acrescentadas juntas na mistura da reação, não foi observada a forma Des octapeptídeo e des-treonina. O melhor rendimento de 78% de lispro foi observado sob concentração de tripsina de 50mg/L. concentração de carboxipeptidase de 10mg/L e a um pH de 8,5.

EXEMPLO 4B (III):

5gm do cristal precursor de glulicina foi dissolvido em 25ml de solução de 1M de TRIS. A concentração do produto da solução foi mantida em 5mg/ml e a concentração de TRIS foi mantida a 0,6 M pelo acréscimo. Alíquotas de certas quantidades foram tiradas ajustando-se o pH da mistura da reação em 2,5N NaOH ou 2N de ácido acético glacial. Foram preparadas alíquotas da mistura da reação a um pH de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. 1 ml de cada uma das misturas de reação foi colocado em cada tubo e rotulado como amostra A, B, C, etc. A reação foi realizada

em todas as amostras acrescentando-se tripsina e carboxipeptidase B juntas em diferentes concentrações. As diferentes condições estão tabuladas.

Parâmetros Constantes:

- Concentração do produto 5g
- 5 • Concentração de tampão TRIS 0,6M

Parâmetros Variados:

- Concentração de tripsina: 25-200 mg/L
- Concentração de carboxipeptidase: 10-30mg/L
- PH: 7.0-9.0.

Concentração de precursor (g/L)	Concentração de tris	Concentração de tripsina mg/L	Concentração de carboxipeptidase B (mg/L)	pH	% de rendimento
5	0.6	200	10	7,0	29
				7,5	56
				8,0	49
				8,5	61
				9,0	49
			30	7,0	44
				7,5	59
				8,0	42
				8,5	29
				9,0	21
		100	10	7,0	25
				7,5	33
				8,0	47
				8,5	61
				9,0	64
			30	7,0	41
				7,5	62
				8,0	65
				8,5	71
				9,0	49
50	10	7,0	28		
		7,5	46		
		8,0	68		
		8,5	78		

Exemplo 5:			30	9,0	70
				7,0	36
				7,5	44
				8,0	59
				8,5	69
				9,0	72
		25	10	7,0	14
				7,5	29
				8,0	35
				8,5	49
				9,0	51
		25	30	7,0	24
				7,5	35
				8,0	44
				8,5	64
				9,0	68

5 **Precipitação Final**

Resultados: O melhor rendimento de 78% de glulicina foi observado sob
 Foram realizadas as melhores condições explicadas acima para as reações
 concentração de tripsina de 50mg/L. concentração de carboxipeptidase de 10mg/L e
 de enzima para o precursor de lispro, asparte e glulicina.
 a um pH de 8,5.

A mistura da reação de enzima de extremidade individual foi precipitada
 acrescentando-se tampão de ácido cítrico e solução de $ZnCl_2$, e ajustando-se o pH.
 10 (O tampão de ácido cítrico inclui 15,4 g/L de ácido cítrico (anídrico), 90 g/L de
 tampão de di-sódio ortofosfato (anídrico), pH ajustado a $6,3 + 0,1 \times$ com ácido o-
 fosfórico). A precipitação foi feita a uma faixa de pH de 4,0 a 10,0, de preferência de
 6,0 a 8,0. A concentração do produto era de preferência de 1 a 10 g/L. Após a
 precipitação, o produto foi separado do sobrenadante limpo por centrifugação ou
 15 decantação do sobrenadante sem perturbar o precipitado assentado. O precipitado
 obtido foi lavado com água gelada para remover os íons não ligados presentes.

O rendimento do processo de precipitação é de 85 a 90%.

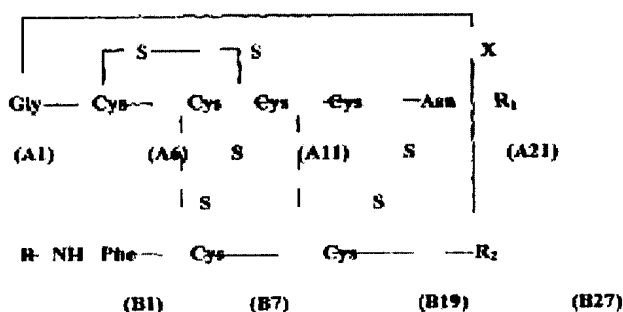
A descrição e os exemplos acima foram dados somente para facilidade de entendimento. Não se devem interpretar limitações desnecessárias desses exemplos, já que as modificações serão óbvias às pessoas hábeis no ofício que irão reconhecer que a invenção pode ser praticada com modificações e variações dentro do espírito das reivindicações anexas.

As instrumentalidades aqui relatadas superam os problemas que são explicados acima e fazem o ofício progredir pelo fornecimento de um método de reação que inibe a perda do produto e possui relativa facilidade de operação em relação a outros métodos conhecidos. Este sistema reduz custos usando as metodologias descritas para obter uma determinada eficiência de conversão melhorada em relação a qualquer processo conhecido, dessa forma superando conhecidas desvantagens neste domínio de ofício.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,

representado pela fórmula:



5 CARACTERIZADO por,

R ser hidrogênio ou um resíduo de aminoácido química ou enzimaticamente clivável ou um peptídeo química ou enzimaticamente clivável incluindo pelo menos dois resíduos de aminoácido;

R1 ser OH ou um resíduo de aminoácido, ou Y1-Y2 no qual Y é um resíduo de aminoácido;

As metades A1 a A21 corresponderem à cadeia de insulina e as metades B1 a B27 a correspondem à cadeia de insulina B incluindo substituição, exclusão e/ou adições de aminoácido;

R2 ser Z1-Z2 onde Z1 é selecionado de Pro, Lys, Asp e Z2 é selecionado de Lys ou Pro ou Glu ou Z1-Z2-Z3 onde Z1 é selecionado de Pro, Lys, Asp e é selecionado de Lys ou Pro ou Glu e Z3 é treonina ou uma metade de peptídeo de pelo menos três resíduos de aminoácido com a condição de que o aminoácido correspondente a B30 is treonina;

X ser um polipeptídeo que conecta a cadeia A à cadeia B, que pode ser clivado enzimaticamente sem perturbar a cadeia A ou a cadeia B contendo pelo menos dois

aminoácidos onde o primeiro e o último aminoácido é Lisina ou Arginina;

O que inclui o tratamento de tal precursor com tripsina e carboxipeptidase usados de forma combinatória e concorrente, contanto que a proporção de concentração de tripsina em relação à carboxipeptidase seja de cerca de 5:1 a 50: 1.

5 2. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,**

de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela respectiva molécula precursora incluir uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85% homóloga à sequência de aminoácidos como especificada em SEQ IDs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

10 3. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,**

de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela quantidade de tripsina em relação à do precursor de insulina ficar na faixa de cerca de 1:10 a cerca de 1:500.

15 4. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,**

de acordo com a reivindicação 3, **CHARACTERIZADO** pela quantidade de tripsina em relação à do precursor de insulina ser de cerca de 1:100.

20 5. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,**

de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela quantidade de carboxipeptidase em relação à do precursor de insulina ser de cerca de 1:500.

25 6. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,**

de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela proporção da concentração de tripsina em relação à de carboxipeptidase ser de cerca de 5:1 a

cerca de 50:1.

7. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pela proporção da
5 concentração de tripsina em relação à de carboxipeptidase ser de cerca de 5:1.

8. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela concentração de tripsina usada para a reação de conversão ser de pelo menos 0,01mg/ml.

10 9. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela concentração de carboxipeptidase usada para a reação de conversão ser de pelo menos 0,001 mg/ml.

15 10. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo precursor ser em forma
- de líquido ou de cristal.

11. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS**
17 **ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela reação de conversão ser
20 realizada a um pH de 6,5 a 10.

12. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,**
25 de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela reação de conversão ser

realizada a um pH de 7 a 9.

13. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela reação de conversão ser realizada a uma temperatura na faixa de 20C a 400C.

14. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pela duração da reação de conversão enzimática ser de cerca de 2 a 24 horas.

15. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo meio de reação conter pelo menos 30% de água ou um solvente miscível em água.

16. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo solvente miscível em água ser selecionado do grupo incluindo metanol, etanol, acetona ou N,N-dimetilformamida.

17. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo meio de reação incluir ainda um sal agindo como agente tamponador.

18. **PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,** de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pelo sal ser selecionado do

grupo incluindo TRIS, etilenodiamina, trietanolamina, glicina, HEPES (N-2-hidróxi-etilpiperazina-N'-2-ácido etanossulfônico).

19. PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,

5 de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pela concentração de sal usada no meio de reação ser de cerca de 10mM a 1M.

20. PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA E SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS PRECURSORES CORRESPONDENTES,

10 de acordo com a reivindicação 19, **CHARACTERIZADO** pela concentração de sal usada no meio de reação ser de cerca de 0,6M.

21. PROCESSO PARA OBTER INSULINA OU SEUS ANÁLOGOS OU DERIVADOS DE SEUS RESPECTIVOS CORRESPONDENTES PRECURSORES,

CHARACTERIZADO por incluir a realização sucessiva das seguintes etapas na seguinte ordem sequencial

15 (a) Dissolver uma quantidade ótima do precursor de insulina ou derivado de insulina em uma solução tampão;

(b) Preparar várias alíquotas da solução precursora em faixas de pH de aproximadamente 7,0 a 9,0;

(c) introduzir as enzimas tripsina e carboxipeptidase de forma concorrente às várias alíquotas preparadas na Etapa (b) e incubar a mistura por aproximadamente 4 a 10 horas;

(d) Precipitar o produto desejado de insulina pela adição de tampão de ácido cítrico e ZnCl₂.

22. MOLÉCULA DE INSULINA, CHARACTERIZADA por ser preparada de acordo

25 com qualquer das reivindicações anteriores.

23. **MOLÉCULA DE INSULINA, CARACTERIZADA** por ser preparada de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, selecionada do grupo contendo insulina, lispro, asparte, glulisina ou IN-105.

RESUMO

PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE INSULINA. A presente invenção se relaciona à preparação de compostos de insulina incluindo seus análogos ou derivados de suas formas precursoras correspondentes por uma reação enzimática de uma etapa envolvendo o uso combinatório e concorrente de quantidades ótimas de tripsina e carboxipeptidase B que trabalham de forma sinérgica direcionando a reação de forma controlada para evitar a produção de subprodutos aleatórios indesejáveis. Particularmente, as reações de conversão enzimática da invenção oferecem vantagens de redução no número de etapas operacionais, maior rendimento e pureza dos produtos finais desejados.