

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

| | |
|--|--|
| (22) Data de pedido: 2007.07.05 | (73) Titular(es): SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH BRÜNINGSTRASSE 50 65929 FRANKFURT AM MAIN DE |
| (30) Prioridade(s): 2006.07.11 DE 102006031955 | |
| (43) Data de publicação do pedido: 2009.04.01 | (72) Inventor(es): FRANK ZOCHER DE PAUL HABERMANN DE |
| (45) Data e BPI da concessão: 2013.05.01 135/2013 | (74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT |

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANÁLOGOS DE INSULINA COM EXTREMIDADE DE CADEIA B DIBÁSICA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA INSULINA, EM QUE SE PREPARA POR ENGENHARIA GENÉTICA BIOTECNOLOGICAMENTE UM PRECURSOR DESTA E EM SEGUIDA CONVERTE-SE ESTA A INSULINA, NUMA REACÇÃO DE LIGAÇÃO CATALISADA ENZIMATICAMENTE COM LISINAMIDA OU ARGININAMIDA, OU ATRAVÉS DE LISINA OU ARGININA MODIFICADA POR GRUPOS DE PROTECÇÃO E, OPCIONALMENTE, HIDRÓLISE SUBSEQUENTE.

RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANÁLOGOS DE INSULINA COM EXTREMIDADE DE CADEIA B DIBÁSICA"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de uma insulina, em que se prepara por engenharia genética biotecnologicamente um precursor desta e em seguida converte-se esta a insulina, numa reacção de ligação catalisada enzimaticamente com lisinamida ou argininamida, ou através de lisina ou arginina modificada por grupos de protecção e, opcionalmente, hidrólise subsequente.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANÁLOGOS DE INSULINA COM EXTREMIDADE DE CADEIA B DIBÁSICA"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de uma insulina com extremidade de cadeia dibásica, em que se prepara biotecnologicamente um precursor desta e em seguida converte-se esta a insulina, numa reacção de ligação catalisada enzimaticamente com lisinamida ou argininamida, ou através de lisina ou arginina modificada por grupos de protecção e, opcionalmente, hidrólise subsequente.

Em todo o mundo, cerca de 177 milhões de pessoas padecem de Diabetes mellitus. Nestes incluem-se cerca de 17 milhões de diabéticos de tipo I, para quem a substituição da secreção endócrina de insulina ausente representa a única terapia possível à data. Os afectados são dependentes de injeções de insulina toda a vida, em regra várias vezes por dia. Em oposição à diabetes de tipo I, a diabetes de tipo II não consiste no essencial numa deficiência de insulina, no entanto, numa multiplicidade de casos, sobretudo em estádios avançados, o tratamento com insulina, eventualmente em combinação com um antidiabético oral, é considerado como a forma de terapia mais favorável.

Em pessoas saudáveis, a libertação de insulina está estritamente ligada à concentração de glucose no sangue. Níveis elevados de glucose no sangue, como aqueles que ocorrem após as refeições, são rapidamente compensados por um aumento

correspondente da secreção de insulina. No estado de jejum, o nível de insulina no plasma cai para um valor basal, que é suficiente para assegurar um fornecimento contínuo de glucose a órgãos e tecidos sensíveis à insulina e para manter a produção de glucose hepática baixa durante a noite. A substituição da secreção de insulina endógena por exógena, na maioria dos casos por aplicação subcutânea, em regra não se aproxima da qualidade da regulação fisiológica da glucose no sangue descrita acima. Frequentemente ocorrem rearranjos no nível de glucose no sangue, para cima ou para baixo que, na sua forma mais severa, podem ser ameaçadoras da vida. No entanto, a par disso, níveis de glucose no sangue elevados durante anos, sem sintomas iniciais, também representam um risco elevado para a saúde. O estudo de grande escala do DCCT nos EUA (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) *N. Engl. J. Med.* 329, 977-986) indicou inequivocamente que níveis de glucose no sangue cronicamente elevados são substancialmente responsáveis pelo desenvolvimento de complicações tardias da diabetes. As complicações tardias da diabetes são lesões micro e macrovasculares que, em algumas circunstâncias, se manifestam como retinopatia, nefropatia ou neuropatia e conduzem à cegueira, falência renal, bem como à perda das extremidades, e além disso estão associadas com um risco aumentado para doenças cardiovasculares. Daqui pode deduzir-se que uma terapia melhorada da diabetes deve visar em primeiro lugar manter a glucose no sangue o mais próximo possível da gama fisiológica. De acordo com o conceito da terapia intensiva de insulina, isto deve ser alcançado através de injeções, várias vezes ao dia, de preparações de insulina de actuação rápida e de actuação lenta. As formulações de actuação rápida são dadas às refeições, para compensar o aumento pós-prandial de glucose no sangue. As insulinas basais de actuação lenta devem assegurar o

abastecimento básico da insulina, em particular durante a noite, sem conduzir a uma hipoglicemia.

A insulina é um polipéptido composto por 51 aminoácidos que se distribuem em 2 cadeias de aminoácidos: a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos. As cadeias estão ligadas entre si através de 2 pontes dissulfureto. As preparações de insulina têm sido empregues para a terapia da diabetes desde há muitos anos. Neste caso, não são utilizadas apenas insulinas de ocorrência natural mas, mais recentemente, também derivados e análogos de insulina.

Os análogos de insulina são análogos de insulinas de ocorrência natural, nomeadamente insulina humana ou insulinas animais, que diferem por substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido de ocorrência natural por outros resíduos de aminoácidos e/ou adição/eliminação de pelo menos um resíduo de aminoácido da insulina de ocorrência natural, de resto igual. O documento US 5.656.722 descreve, p. ex., os derivados de insulina Phe^(B1). No caso dos resíduos de aminoácidos adicionados e/ou substituídos podem também tratar-se daqueles que não são de ocorrência natural.

Os derivados de insulina são derivados de insulinas de ocorrência natural ou análogos de insulina em que um ou mais resíduos de aminoácidos e/ou os terminais N ou C da cadeia A e/ou B estão substituídos com grupos funcionais. Os grupos funcionais são seleccionados a partir de um grupo contendo resíduos amida, resíduos amina, resíduos carboxilo, resíduos alquilo, resíduos álcool e resíduos alcóxido.

Uma terapia de insulina eficaz faz uso das assim designadas insulinas basais. Por estas entendem-se formulações que possibilitam uma libertação lenta, contínua, de insulina aplicada exogenamente. Deste modo alcança-se uma concentração basal de insulina no corpo durante um tempo mais prolongado, que actua de forma vantajosa sobre o estado fisiológico da pessoa que sofre de diabetes.

O análogo de insulina recombinante Gly (A21), Arg(B31), Arg (B32) de insulina humana (insulina glargina) caracteriza-se, neste caso, pela necessidade de ter que ser fornecido ao corpo apenas a cada 24 horas - portanto apenas uma vez por dia - para atingir um efeito basal. A aplicação uma vez por dia conduz a uma qualidade de vida melhorada. A fisiologia melhorada conduz p. ex. a uma redução do valor de HbA_{1c} e pode esperar-se que, devido a esta melhoria, as sequelas tardias da diabetes, se aparecerem, aparecem apenas substancialmente mais tarde, facto pelo qual é possível prolongar a esperança de vida dos diabéticos afectados.

A procura por este análogo da insulina é, de modo correspondente, elevada. Uma vez que o número de diabéticos aumenta continuamente, é além disso de interesse económico minimizar os custos de produção para os análogos correspondentes. Na patente US 5.656.722 está descrita a preparação possível de análogos de insulina através de uma proteína de fusão preproinsulina, que consiste numa parte de fusão ("parte pré") e uma variante de proinsulina de macaco. Um dos análogos descritos contém glicina em vez de asparagina na posição A(21). A proteína de fusão correspondente é uma variante do precursor peptídico para a preparação de insulina glargina. O processo prevê que, a partir desta proteína de fusão, se elimine

a parte pré e o péptido C por reacção com tripsina. O documento EP-A 0668292 descreve uma proteína de fusão que segue o mesmo princípio mas que permite um processo melhorado para a preparação de insulina glargina face à patente US 5.656.722. Neste caso é claro para o especialista da técnica que é possível uma clivagem parcial, em particular no limite da cadeia B e da cadeia C da insulina, que é definida pela estrutura dibásica Arg-Arg, que conduz a um análogo da insulina humana mono-Arg B31. Este produto defeituoso tem que ser separado do próprio composto de interesse. Isto conduz a um prejuízo claro do rendimento. O problema pode ser ultrapassado pela preparação recombinante de proinsulinas e fazendo estas reagirem com uma endoprotease específica, como p. ex. lisil-endopeptidase, e o (análogo) de insulina humana B30 resultante é feito reagir com o tripéptido Thr-Arg-Arg numa preparação de semisíntese da química de péptidos. Os documentos EP-A 0132769 e WO 2003/044210 descrevem que os grupos reactivos do tripéptido têm que estar protegidos durante a reacção. A seguir à reacção, os grupos de protecção são clivados. Esta via está associada a custos que resultam da preparação do tripéptido por síntese química e a introdução de grupos de protecção. Por conseguinte seria desejável um processo que permitisse a preparação de análogos de insulina Arg(B31), Arg(B32) a partir do precursor de insulina humana Arg(B31).

O pedido de patente alemão N°. 102005046113.1 (não publicado) descreve um processo que compreende a ligação, catalisada por tripsina, de aminoácidos que são amidados no terminal C, a péptidos cujo aminoácido C terminal consiste em lisina ou arginina. Os rendimentos que são observados neste caso são surpreendentemente elevados e além disso a reacção de acoplamento pode ser realizada sem mascarar com grupos de

protecção. A reacção ocorre em meio não aquoso. Foi agora verificado de um modo surpreendente que o acoplamento de arginina - amida ou lisina amida a análogos de insulina B31 é possível com rendimentos elevados. Neste caso, pode controlar-se a reacção, de um modo surpreendente, de forma a que se produzam de um modo preferido análogos de insulina da forma insulinamida humana Arg(B31), Arg(B32) ou da forma insulinamida humana Arg(B31), Lys(B32). Neste caso o rendimento é superior a 60%. No final da reacção, o grupo amida pode ser clivado por hidrólise ácida. Foi igualmente verificado de um modo surpreendente, que na reacção, em alternativa a lisinamida ou argininamida, pode utilizar-se arginina ou lisina, que pode comportar um grupo de protecção. Como exemplo para grupos de protecção são mencionados t-butiloxicarbonilo (Boc) ou dimetoxifenilpropiloxicarbonilo (DZZ). Uma vez que está descrito na literatura que em particular derivados de arginina protegidos podem ser instáveis em diferentes solventes, é claro para o especialista da técnica que na química dos péptidos sejam continuamente desenvolvidos novos grupos de protecção que consigam uma estabilidade melhorada. No que respeita aos grupos de protecção ou grupo amida, o rendimento pode ser positivamente influenciado por variação das condições de reacção. Isto é familiar para o especialista da técnica e também é objecto da invenção. Com isso, na preparação de insulina glargina ou de análogos de insulina Arg(B31), Arg(B32) comparáveis a partir de precursores de preproinsulina (patente US 5.656.722), torna-se disponível o produto de clivagem parcial insulina humana B(31) para a preparação do produto de valor. Neste caso, as proteínas de fusão correspondentes não têm que ser preparadas intracelularmente. É claro para o especialista da técnica que os análogos de proinsulina também podem ser preparados por expressão bacteriana com excreção subsequente para o periplasma e/ou para o

sobrenadante da cultura. O pedido de patente europeia EP-A 1364029 descreve isto a título de exemplo. Também é objecto da invenção a utilização de precursores de insulina humana Arg(B31), que se formam directamente após expressão a partir de processos bacterianos deste tipo.

Existe um outro aspecto técnico do processo, que é igualmente objecto da invenção. O pedido de patente europeia EP-A 0347781, ou os pedidos de patentes europeias EP-A 1364030 e EP-A 1364032 descrevem processos baseados em leveduras para a preparação de miniproinsulinas com rendimentos elevados. Quando se alarga um processo deste tipo ou semelhante à preparação de miniproinsulinas que na posição A21 comportam os resíduos de aminoácidos descritos na patente US 5.656.722, portanto Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp ou Glu, então essas miniproinsulinas podem ser convertidas nos análogos de insulina Arg(B31), Arg(B32) directamente após clivagem na insulina de duas cadeias.

Caso, como descrito no documento EP-A 1364032, a expressão ocorra através de uma proteína de fusão, então é vantajoso não clivar a parte pré com tripsina ou endoproteases semelhantes. Em vez disso, introduz-se um local de clivagem que é reconhecido por uma endoprotease específica que não cliva o derivado de insulina, para, de uma forma correspondente, clivar a parte pré ou a parte de fusão. A título de exemplo são mencionadas a enterocinase (DDDDK) ou factor Xa (IEGR). Também isto é objecto da invenção. Neste caso é claro para o especialista da técnica que ambas as reacções de clivagem podem decorrer numa reacção num só reactor. Uma possibilidade adicional resulta quando se cliva a parte de fusão apenas num passo seguinte. Como parte da proteína de fusão podem seleccionar-se neste caso derivados de

uma multiplicidade de proteínas boas secretoras. Para bactérias são mencionadas a título de exemplo DHFR (di-hidrofolato redutase), glutathione S-transferase e hirudina. Para secreção em leveduras podem utilizar-se p. ex. albumina ou derivados desta, superóxido dismutase ou derivados, interleucina 2 ou derivados e hirudina ou derivados. No presente pedido é utilizado como parte de fusão, a título de exemplo, um derivado de hirudina, tanto para a expressão bacteriana como também para a expressão em leveduras. Neste caso foi verificado de um modo surpreendente que a sequência de hirudina pode ser adicionalmente modificada através da introdução de uma sequência peptídica de histidinas em série e/ou uma sequência peptídica de DDDDK, que representa o local de reconhecimento para enterocinase, sem comprometer o enrolamento da parte de miniproinsulina. Com isso são tornados disponíveis métodos da cromatografia de afinidade. Também isto é objecto da invenção.

O especialista da técnica está, além disso, familiarizado com o facto de os sistemas de expressão descritos a título de exemplo representarem apenas um pequeno segmento dos sistemas hospedeiro/vector desenvolvidos para a preparação recombinante de proteínas. Os sistemas hospedeiro/vector que permitem a preparação dos péptidos alvo são assim também parte integrante da invenção.

Por conseguinte, o objecto da invenção é a preparação de análogos de insulina que são caracterizados pela presença dos resíduos de aminoácidos Arg(B31), Arg(B32) ou Arg(B31), Lys(B32), a partir de análogos dos precursores de insulina humana Arg(B31) através da ligação com arginina ou lisina catalisada por tripsina. Neste caso, é claro para o especialista da técnica que, por causa da surpreendente selectividade da

reacção, a reacção de ligação também pode ser repetida durante vários ciclos de reacção, de modo que são tornados disponíveis análogos de insulina que além das posições B31 e B32 comportam os aminoácidos básicos adicionais lisina ou arginina. Isto é conseguido pela realização de uma reacção de acoplamento, que desamina ou desprotege o aminoácido terminal, e o produto é novamente utilizado num ciclo de reacção subsequente correspondente. Os produtos deste tipo podem igualmente ser obtidos empregando um análogo que já comporte Arg(B31), Arg(B32) ou Arg(B31), Lys(B32) como precursor. Também podem preparar-se análogos que compreendem quaisquer aminoácidos codificáveis geneticamente na posição B31 e subsequentes, que não têm que ser arginina ou lisina em série, cuja extremidade C terminal é no entanto caracterizada pela sequência dibásica Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Lys ou Lys-Arg.

Neste caso a reacção não está limitada à utilização de tripsina como catalisador. É conhecido do especialista da técnica que, a par das tripsinas comercialmente disponíveis de rato, bovinos, suínos ou humanos, ou outras isoenzimas ou os seus derivados ou variantes, também podem ser utilizadas as seguintes enzimas: catepsina, tripsina de *Fusarium oxysporum* e de *Streptomyces* (*S. griseus*, *S. exfoliatus*, *S. erythraeus*, *S. fradiae*, *S. albidoflavus*), triptase, mastina, acrosina, calicreína, hepsina, prostasina I, lisil endopeptidase (lisina-C) e endoproteínase-Arg-C (clostripaína).

O objectivo da invenção é, por conseguinte, um processo para a preparação de um análogo de insulina ou de um derivado deste, em que

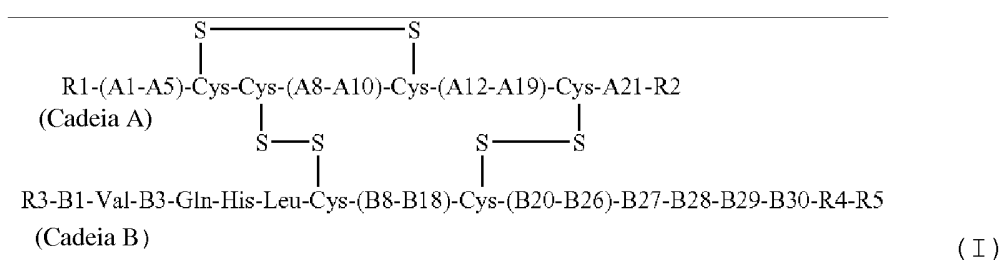
a um análogo de insulina de partida ou um derivado deste, cujo aminoácido no terminal C da cadeia A e/ou B é seleccionado de um grupo contendo aminoácidos básicos de ocorrência natural, ou os seus análogos ou derivados, num dos aminoácidos C terminais indicados,

na presença de uma enzima com a actividade biológica de tripsina,

é adicionado um aminoácido básico, de ocorrência natural, amidado ou protegido no terminal C com um grupo de protecção seleccionado do grupo contendo Lys e Arg,

e o análogo de insulina modificada obtido é purificado e, opcionalmente, o grupo amida ou grupo de protecção no terminal C é clivado do aminoácido adicionado ou do péptido adicionado,

em que o análogo da insulina é caracterizado pela fórmula geral I



em que significam

(A1 - A5) os resíduos de aminoácidos nas posições A1 até A5 da cadeia A de insulina humana ou insulina animal,

- (A12 - A19) os resíduos de aminoácidos nas posições A12 até A19 da cadeia A de insulina humana ou insulina animal,
- A21 um resíduo de aminoácido de ocorrência natural,
- (B8 - B18) os resíduos de aminoácidos nas posições B8 até B18 da cadeia B de insulina humana ou insulina animal,
- (B20 - B26) os resíduos de aminoácidos nas posições B20 até B26 da cadeia B de insulina humana ou insulina animal,
- (A8 - A10) os resíduos de aminoácidos nas posições A8 até A10 da cadeia A de insulina humana ou insulina animal,
- B30 uma ligação química ou um resíduo de aminoácido de ocorrência natural,
- B1 uma ligação química ou um resíduo de aminoácido de ocorrência natural,
- B3 um resíduo de aminoácido de ocorrência natural,
- B27, B28
e B29 um resíduo de aminoácido de ocorrência natural,
- R1 um grupo amino ou um até três resíduos de aminoácidos de ocorrência natural,
- R2 um grupo carboxilo ou um até três resíduos de aminoácidos de ocorrência natural,

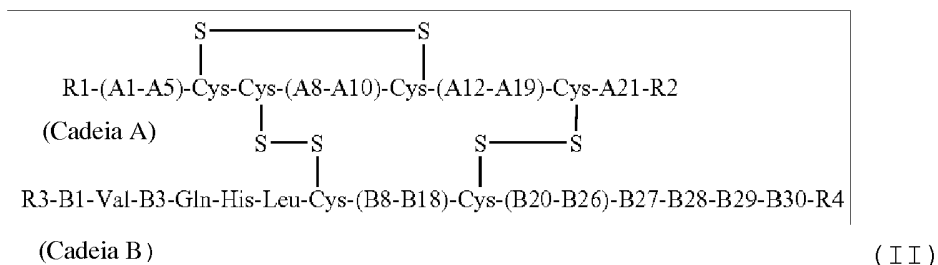
R3 um grupo amino ou um até três resíduos de aminoácidos de ocorrência natural,

R4 representa um aminoácido básico,

R5 um resíduo de aminoácido básico, cujo terminal C está presente quer livre, ou amidado,

em que aquele resíduo de aminoácido em cujo terminal C está ligado o terminal N de R5 é seleccionado de um grupo contendo Arg e Lys; e

em que o análogo de insulina de partida é caracterizado pela fórmula geral II



em que R1, (A1-A5), (A8-A10), (A12-A19), A21, R2, R3, B1, B3, (B8-B18), (B20-B26), B27, B28, B29, B30 e R4 são definidos como na reivindicação 1, e o resíduo de aminoácido no terminal C da cadeia B é seleccionado de um grupo contendo Arg e Lys.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que o aminoácido básico de ocorrência natural, amidado ou protegido no terminal C com um grupo de protecção, é

arginina C terminal protegida com um grupo de protecção Boc no terminal C.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que o análogo de insulina humana modificada é insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32), cuja extremidade C terminal da cadeia B é amidada, em que o análogo de insulina de partida é, em particular, insulina humana Gly(A21), Arg(B31).

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que o análogo de insulina de partida é preparado por expressão recombinante de uma proteína precursora contendo a cadeia A e a cadeia B do análogo de insulina de partida, em particular um processo do tipo em que é expresso um gene, que é parte de um replicão.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que é utilizada uma bactéria ou uma levedura como célula hospedeira.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que a proteína precursora é segregada após a expressão, em particular no caso em que a proteína precursora é isolada a partir do sobrenadante celular de bactérias ou leveduras.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que a proteína precursora é isolada do periplasma de uma bactéria.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que a proteína precursora obtida de acordo com uma das

reivindicações mencionadas é sujeita a um processo de enrolamento e clivagem enzimática.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que o análogo de insulina de partida é preparado por expressão recombinante directa.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que a enzima com a actividade biológica de tripsina é seleccionada de um grupo contendo tripsina humana, tripsina porcina, tripsina bovina e uma variante de tripsina humana, tripsina porcina e tripsina bovina.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que a extremidade C terminal da cadeia B do análogo de insulina modificada é subsequentemente desprotegida numa reacção de hidrólise.

Um objecto adicional da invenção é um processo como descrito acima, em que o análogo de insulina obtido é insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32).

A invenção é explicada a seguir com mais detalhe com base em alguns exemplos de realização. Estes exemplos de realização não devem ter um efeito restritivo.

Exemplo 1: Preparação de insulina Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão após enrolamento *in vitro*

A patente US 5.663.291 descreve no seu exemplo 1 a obtenção de uma proteína de fusão de insulina correctamente enrolada com

a estrutura:

MATTSTGNSA RFVNQHLCGS HLVEALYLVC GERGFFYTPK TRREAEDPQV

GQVELGGGPG AGSLQPLALE GSLQKRGIVE QCCTSICSLY QLENYCG

(SEQ ID N°. : 1)

Em conformidade com o exemplo V da patente US 5.227.293, este material é convertido em insulina de duas cadeias por reacção com tripsina, e isolam-se insulina Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) e insulina Arg(B31), Gly(A21).

Assim pode obter-se directamente o análogo de insulina Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21), enquanto o produto secundário Arg(B31), Gly(A21) pode ser empregue como precursor na ligação, catalisada por tripsina, com arginina ou lisina modificada.

Exemplo 2: Preparação de insulina Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão obtida por secreção, que contém a proinsulina correctamente enrolada

Em alternativa ao exemplo 1, as proteínas de fusão também podem ser preparadas por secreção em sistemas bacterianos. Neste caso, a estrutura de proinsulina é correctamente enrolada como parte da proteína de fusão, e pode ser dispensado o passo de enrolamento "in vitro". O pedido de patente WO 02/068660 propõe um sistema deste tipo. Quando, p. ex., no plasmídeo pBpfuHir_Ins descrito no exemplo 1 deste pedido de patente internacional, o codão para Asn(A21) é substituído com um codão para Gly(A21)

obtém-se uma proteína de fusão a partir da qual se pode obter, a título de exemplo, a insulina glargina, e neste caso pode isolar-se insulina humana Arg (B31), Gly(A21) como subproduto, como descrito no exemplo 1.

Para a preparação da sequência é necessário um novo iniciador insu_a21_gly_rev com a seguinte estrutura:

5' - TTTTAAAGCTTGTCGACTCATTAGCCGCAGTAGTTCTCCAGCTG -3'
(SEQ ID N°. 2)

Este iniciador é empregue numa PCR em analogia com o pedido de patente WO 02/068660 com o iniciador pful para ADN do plasmídeo pBpfuHir_Ins. A partir do produto de PCR é possível isolar um fragmento BamH1/Hind3 que pode ser clonado de forma correspondente ao exemplo do pedido de patente WO 02/068660. Após expressão, é isolada uma proteína de fusão que é subsequentemente tratada de forma correspondente ao exemplo 1 do presente pedido.

É claro para o especialista da técnica que também o precursor insulina humana Arg(B31), Gly (A21) pode ser obtido directamente por secreção bacteriana de uma proteína de fusão. Também isto é objecto da invenção.

Exemplo 3: Preparação de insulina Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) a partir de um precursor Arg(B31), Gly (A21) por acoplamento com argininamida

Dissolvem-se 100 mg de L-Arg-insulina 21A-Gly-30B em 0,95 mL de solução de argininamida (446 g/L) e adicionam-se

0,13 mL de tampão acetato de Na M (pH 5,8) e 2 mL de DMF. A mistura de reacção é arrefecida para 12 °C e é iniciada por adição de 0,094 mL de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics).

Após 8 h, a reacção é parada por adição de TFA até pH 2,5, e é analisada por HPLC. Forma-se > 60% de insulina humana Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21). Após adição de solução inibidora de tripsina segue-se a purificação do análogo amidado em analogia com o documento US 5.656.722. O análogo de insulina amidado é em seguida hidrolisado na presença de ácido durante várias horas para dar insulina humana Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21).

Exemplo 4: Preparação de insulina humana Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) a partir de um precursor de insulina humana Arg(B31), Gly (A21) por acoplamento com lisinamida

Dissolvem-se 100 mg de L-Arg-insulina 21A-Gly-30B em 0,93 mL de solução de lisinamida (400 g/L) e adicionam-se 0,13 mL de tampão acetato de Na M (pH 5,8) e 2 mL de DMF. A mistura de reacção é arrefecida para 12 °C e é iniciada por adição de 0,094 mL de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics).

Após 8 h, a reacção é parada por adição de TFA até pH 2,5, e é analisada por HPLC. Forma-se insulina humana Arg(B31), Lys(B32)-NH₂, Gly(A21) que, após adição de solução inibidora de tripsina, é purificada em analogia com o documento US 5.656.722. O análogo de insulina amidado é em seguida hidrolisado na presença de ácido durante várias horas para dar insulina humana Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21).

Exemplo 5: Preparação de insulina Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) a partir de um precursor Arg(B31), Gly(A21) por acoplamento com H-Arg(Boc)2-OH

Misturam-se 0,25 mg de insulina humana Arg(B31), Gly(A21) num recipiente Eppendorf com 11 µL de piridina 0,1 M em tampão de acetato (pH 5,6), 60 µL de uma solução a 130 g/L de H-Arg(Boc)2-OH x HCl em piridina 0,1 M em tampão acetato (pH 5,6) e 119 µL de DMF e incubam-se com tripsina (Roche Diagnostics) a 12 °C durante algumas horas.

A reacção é parada por adição de uma mistura de 25% de água, 25% de acetonitrilo e 50% de ácido trifluoroacético. A mistura é liofilizada e, para eliminar o grupo protector, é dissolvida em 1 mL de TFA e é deixada em repouso cerca de 3 horas à temperatura ambiente. A purificação da insulina humana Arg(B31), Arg(B32)-NH₂, Gly(A21) efectua-se, a título de exemplo, em analogia com o documento US 5.656.722.

Exemplo 6: Preparação de insulina Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) a partir de um precursor Arg(B31), Gly(A21) por acoplamento com H-Lys(Boc)-OtBu

Dissolvem-se 50 mg de insulina humana Arg(B31), -Gly(A21) em 0,62 mL de solução de H-Lys (Boc)-OtBu (0,5 g/mL, pH 5) e adiciona-se 1 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). A mistura é arrefecida para 12 °C e adicionam-se 2 mg de tripsina (Roche Diagnostics).

Após mais de 10 horas, a reacção é parada por adição de 2 mL de uma mistura a 50% de acetonitrilo / água e 1 mL de TFA (100%). A mistura é liofilizada e, para a clivagem do grupo de protecção Boc, é dissolvida em 1 mL de TFA e é deixada em repouso cerca de 3 horas à temperatura ambiente. A purificação da Arg(B31), Lys(B32), OH efectua-se, a título de exemplo, em analogia com o documento US 5.656.722.

Exemplo 7: Sequência do gene para secreção de uma proteína de fusão hirudina insulina Arg(B31), Gly(A21) através de levedura de padeiro

O pedido de patente EP-A 1364032 propõe a utilização de hirudina como parceiro de fusão para a expressão e secreção de outras proteínas de valor farmacêuticamente interessantes em leveduras.

O exemplo 1 do pedido de patente EP-A 1364032 descreve um sistema de vector e hospedeiro para a preparação de uma proteína de fusão, que consiste num derivado de hirudina e miniproinsulina. Este sistema pode ser utilizado, a título de exemplo, para a preparação de miniproinsulinas que na posição A21 do aminoácido asparagina por aminoácidos, como descrito no documento US 5.656.722.

A construção do vector de expressão pode efectuar-se em analogia com o exemplo do pedido de patente EP-A 1364032, quando o iniciador insncolrev é substituído e concebido de modo a alterar o codão na posição A21.

Para a preparação da sequência codificadora para a insulina humana Arg(B31), Gly A(21), é sintetizado, p. ex., o seguinte iniciador:

ins_gly_a21_rev

5'-TTTTTTCATGGGTCGACTATCAGCCACAGTAGTTTTCCAGCTGG -3' (SEQ ID N°. 3.)

Neste caso, o iniciador cobre completamente o segmento do gene que codifica para os aminoácidos A15 - A21 do análogo de insulina. Caso se combine este iniciador com o iniciador da SEQ ID N°. 4 do exemplo 1 do pedido e se utilize o plasmídeo pADH2Hir_ins como modelo, então pode gerar-se um fragmento de ADN por PCR que, após digestão com as enzimas de restrição KpnI e NcoI, é inserido no vector de expressão correspondentemente aberto e contém a proteína de fusão desejada.

O vector obtém a designação pADH2Hir_ins_glyA21. A proteína de fusão é expressa de forma correspondente ao pedido de patente EP-A 1364032 e é processada para dar miniproinsulina Gly(A21), que é convertida em insulina humana Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) de forma correspondente ao exemplo 2.

Exemplo 8: Sequência do gene para secreção directa do precursor Arg(B31), Gly(A21) através de levedura de padeiro

O ADN do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 descrito no exemplo 7 é utilizado para a preparação de uma construção de vector para a secreção directa de insulina humana Arg(B31), Gly(A21).

São sintetizados os seguintes iniciadores.

alfa_insf1

5'- TTTTTTGGATCCTTTGGAATAAAAGATTTGTTAACCAACACTTGTGTG-3'
(SEQ ID N°. : 4)

Ele cobre a sequência do terminal C do factor alfa, codões para Lys-Arg e o terminal N da sequência da miniproinsulina.

ins_gly-rev2

5'- TTTTTTCCAT GGGTCGCTAT CAG**CCC**ACAGT AGTTTTCCAG CTGG -3'
(SEQ ID N°. : 5)

O iniciador hibrida com a extremidade 3' da sequência do análogo de insulina clonado no plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21. Numa PCR (condições padronizadas) é gerado um fragmento de ADN que, após digestão com as enzimas de restrição KpnI e NcoI, é inserido no vector de expressão correspondentemente aberto e que contém a proteína de fusão desejada. As células incompetentes da estirpe de levedura Y79 transformam-se. Os transformantes são subsequentemente expressos como descrito no exemplo 7. A miniproinsulina Arg(B31), Gly(A21) é isolada de acordo com métodos conhecidos (documento EP-A 0229998) e é convertida em insulina humana Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) de acordo com o exemplo 2.

Exemplo 9: Sequência do gene para secreção de uma proteína de fusão hirudina insulina Arg(B31), Gly(A21) através de *Pichia pastoris*

A clonagem do vector de expressão efectua-se em analogia com o exemplo 4 do pedido de patente EP-A 1364032. Em vez da sequência do iniciador pichia_H_Irev2 utiliza-se, neste caso, o iniciador ins_gly_rev2 que depois permite a possibilidade da expressão de insulina humana Gly(A21) com o produto de PCR:

5'-TTTTTGGCGCCGAATTCACTACTATTAGCCACAGTAGTTTCCAGCTGG-3'
(SEQ ID N°. : 6)

O plasmídeo resultante obtém a designação pPich_Hir_ins-GlyA21. A purificação de miniproinsulina Arg(B31), Gly(A21) como material de partida para a produção de um análogo com extremidade de cadeia dibásica é realizada como descrito.

Exemplo 10: Sequência do gene para secreção directa do precursor Arg(B31), Gly(A21) através de *Pichia pastoris*

Em analogia com o exemplo 7, efectua-se a construção do vector de expressão correspondente. É necessário o ADN do plasmídeo pPich_Hir_ins-GlyA21 e dois iniciadores pich_insgly_dirf e pich_insgly_dirrev

pich_insgly_dirf

5'- TTTTTTCTCGAGAAAAGATTTGTTAACCAACACTTGTGTG -3'
(SEQ ID N°. :7)

pich_insgly_dirrev

5'- TTTTTT GGCGCCGAATTCACTACTATTAGCCAC -3' (SEQ ID N°.8)

Exemplo 11: Preparação de insulina Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão obtida por secreção de uma levedura, que contém proinsulina correctamente enrolada e cuja parte de fusão contém uma série de aminoácidos His₆

O ADN do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 serve como molde. São sintetizados dois iniciadores:

alfa_LT_H6_hirf e alfa_LT_H6_hirrev

alfa_LT_H6_hirf1:

5'- GCACCATCATCACCATCACTATACTGACTGCACTGAATC -3'
(SEQ ID N.º: 9)

O iniciador contém os codões para 6 histidinas em série e os aminoácidos 3 - 8, bem como 9 (parcial), da sequência de Refludan[®].

alfa_LT_H6_hirf2:

5'- GAAGGGGTACCTTTGGATAAAAGACTTACGCACCATCATCACCATCAC -3'
(SEQ ID N.º: 10)

O iniciador contém os codões para 6 histidinas em série, os codões para os aminoácidos 1 e 2 da sequência de lepidurina e sequências do factor alfa, que compreendem o local de

processamento Lys - Arg e que cobrem o local de reconhecimento para a enzima de restrição Kpn 1. O ADN do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 serve como molde numa PCR convencional com os iniciadores alfa_LT_H6_hirf1 e ins_gly_a21_rev do exemplo 7 do presente pedido. O produto da reacção é isolado e é utilizada uma alíquota como molde para uma segunda PCR com os iniciadores alfa_LT_H6_hirf2 e ins_gly_a21_rev. O produto de reacção é processado como descrito com Kpn1 e Nco1 e depois é clonado. É produzido o plasmídeo pADH2_LT_H6_Hir_ins_glyA21: Após transformação de Y79 com ADN do plasmídeo, a proteína de fusão é expressa. As células são separadas do sobrenadante por centrifugação e o sobrenadante é concentrado através de filtros de membrana, p. ex. da firma Sartorius, e em seguida por cromatografia de afinidade com Ni^{2+} , em que se segue o protocolo para o sistema de purificação ProBond TM da firma Invitrogen. Após eliminação do tampão de eluição por diálise e/ou filtração ou filtração em gel como alternativa, a proteína de fusão pode ser processada de maneira em si conhecida para dar insulina humana Arg(B31), Gly(A21) e, em seguida, ser convertida a insulina glargina.

Exemplo 12: Preparação de insulina humana Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão obtida por secreção de uma levedura, que contém proinsulina correctamente enrolada e cuja parte de fusão é clivada com a enzima enterocinase

O ADN do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 serve como material de partida. São utilizados os iniciadores ins_gly_a21_rev do exemplo 7 do presente pedido e hirf1 do exemplo do pedido WO 02/070722 A1. Para o efeito são preparados dois novos iniciadores:

Hir_entero-insf

5'- CTTCAG GACGATGACGATAAATTTGTTAACCAACACTTGTGTGG -3'
(SEQ ID N.º: 11)

O iniciador cobre os aminoácidos B1 - B7 e B8 (parcial) da sequência de miniproinsulina e contém os codões para a sequência de aminoácidos Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, que representam locais de reconhecimento para enterocinase.

Hir_entero-insrev

5'- TTTATCGTCATCGTCCTGAAGGCTGAAGGTATTCCTCAGGG -3'
(SEQ ID N.º: 12)

O iniciador reverso cobre os aminoácidos 60 - 65 da sequência de lepirudina e contém os codões para a sequência de aminoácidos Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID N.º.: 13), que representam locais de reconhecimento para enterocinase. Em primeiro lugar são realizadas duas PCR com os pares de iniciadores hirf1/Hir_entero_insrev e Hir_entero_insf/ins_gly_a21_rev. Os produtos de reacção são isolados. Misturam-se alíquotas do material e a mistura é empregue numa terceira PCR como molde para o par de iniciadores hirf1/ins_gly_a21_rev. O produto de reacção é clonado como descrito. Produz-se o vector pADH2Hir_ins_glyA21. A proteína de fusão é preparada como descrito.

A clivagem da proteína de fusão efectua-se através da enterocinase. A enzima é obténível comercialmente.

A reacção de clivagem foi realizada em tampão de enterocinase (Tris/HCl a 20 mM, NaCl a 50 mM, CaCl₂ a 2 mM pH 7,4) por utilização de uma quantidade de enzima correspondente à respectiva especificação do fabricante. A clivagem efectua-se em regra após a separação das células hospedeiras e o passo subsequente de processamento. Ela também pode no entanto efectuar-se directamente no sobrenadante após a fermentação, depois de terem sido ajustadas as condições óptimas de reacção.

Exemplo 13: Preparação de insulina humana Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão obtida por secreção de uma levedura, que contém proinsulina correctamente enrolada e cuja parte de fusão é clivada com a enzima enterocinase e contém uma sequência de poli-histidina

Utiliza-se ADN do plasmídeo pADH2_LT_H6_Hir_ins_glyA21 e os iniciadores Hir_entero_insrev, Hir_entero_insf e ins_gly_a21_rev, e substitui-se o iniciador hirf1 pelo iniciador alfa_lt_enterof com a sequência seguinte:

5'- GAAGGGGTACCTTTGGATAAAAG - 3' (SEQ ID NO.: 13)

Em analogia com o exemplo 12, constrói-se depois um vector pADH2_LT_H6_Hir_etero_ins_glyA21 que codifica para uma proteína de fusão, cuja parte de fusão hirudina foi prolongada por seis histidinas a começar com a posição 3 no terminal N e terminal C a partir da posição 72 pela sequência DDDDK (SEQ ID N°. 14). A preparação de insulina humana Arg(B31), Gly(A21) efectua-se depois por combinação do método descritos nos exemplos 11 e 12.

Exemplo 14: Sequência do gene para secreção de uma hirudina da proteína de fusão insulina Phe(B1), Arg(B31), Gly(A21) através de levedura de padeiro

A transformação e a expressão efectuam-se em analogia com o exemplo 7.

São sintetizadas duas sequências de iniciadores:

Desphef1:

5'-CTTCAGGGAAATTCGGCACGAGTTAACCAACACTTGTGTGGTTC-3'
(SEQ ID N°. : 15)

e Desphe_rev1:

5'-GAACCACACA AGTGTGTTGGTT AACTCGTGCC GAATTTCCCTGAAG-3'
(SEQ ID N°. : 16)

O ADN do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 do exemplo 7 serve como molde. São realizadas duas reacções da polimerase em cadeia independentemente uma da outra. Na reacção 1 são utilizados o iniciador Desphe_rev1 e o iniciador SEQ ID N°. : 4 do exemplo 1 do pedido EP-A 1364032, e na reacção 2 são utilizados o iniciador ins_gly_a21_rev do exemplo 7 do presente pedido e o iniciador Desphef1. Os produtos de reacção de ambas as reacções são isolados e alíquotas do rendimento são combinadas numa terceira reacção e são utilizadas como molde para o par de iniciadores composto pelos iniciadores SEQ ID N°. : 4 do exemplo 1 do pedido EP-A 1364032 e ins_gly_a21_rev. O produto de reacção da terceira reacção é clonado, transformado e expresso como

descrito no exemplo 7. A proteína de fusão produzida serve como material de partida para a preparação de análogos de insulina correspondentes com extremidades de cadeia dibásicas.

Exemplo 15: Sequência do gene para secreção de uma proteína de fusão hirudina insulina Ala(B31), Arg(B32), Gly(A21) através de levedura de padeiro

São sintetizadas duas sequências de iniciadores:

Ala_b31f1:

5'- CTTCTACACTCCAAAGACGgctCGTGGTATCGTTGAACAATGTTG -3'

(SEQ ID N°. : 17)

e Ala_b31rev1:

5'- CAACATTGTT CAACGATACC ACGagcCGTC TTTGGAGTGT AGAAG -3'

(SEQ ID N°. : 18)

O ADN do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 do exemplo 7 serve como molde. São realizadas duas reacções da polimerase em cadeia independentemente uma da outra. Na reacção 1 são utilizados o iniciador Ala_b31rev1 e o iniciador SEQ ID N°. : 4 do exemplo 1 do pedido EP-A 1364032, e na reacção 2 são utilizados o iniciador ins_gly_a21_rev do exemplo 7 do presente pedido e o iniciador Ala_b31f1. Os produtos de reacção de ambas as reacções são isolados. Alíquotas do rendimento são combinadas numa terceira reacção e são utilizadas como molde para o par de iniciadores composto pelos iniciadores SEQ ID N°. : 4 do exemplo 1 do pedido EP-A 1364032 e ins_gly_a21_rev. O produto de

reacção da terceira reacção é clonado, transformado e expresso como descrito no exemplo 7. A proteína de fusão produzida serve como material de partida para a preparação de análogos de insulina correspondentes com extremidades de cadeia dibásicas.

Exemplo 16: Sequência do gene para a secreção directa de um precursor de Lys(B31) através de levedura de padeiro.

São sintetizados dois iniciadores:

Lys_b31f

5'- CTTCTACTCTCCAAAGACGAAAGGTATCGTTGAACAATGTTG -3'

(SEQ ID N°.: 19)

e Lys_b31rev

5'- CAACATTGTT CAACGATACC TTTCGTCTTT GGAGTGTAGA AG -3'

(SEQ ID N°.: 20)

O ADN do plasmídeo pADH2Hir_ins do exemplo 1 do pedido WO 02/070722A1 serve como molde para duas reacções da polimerase em cadeia. Na reacção 1 são utilizados os iniciadores Lys_b31f1 e insncolrev (SEQ ID N°.: 6 do documento W002/070722A1) e na reacção 2 são utilizados os iniciadores Lys_b31rev e alfa_insfl do exemplo 7 do presente pedido. As reacções padronizadas são efectuadas e os fragmentos de PCR produzidos são isolados. Alíquotas de ambos os rendimentos são combinados e servem como molde para uma terceira reacção com os iniciadores insncolrev e SEQ ID N°.: 6 do documento WO 02/070722A1. O fragmento de PCR produzido é clonado e expresso como descrito no exemplo 8.

Produz-se a miniproinsulina Lys(B31) que é feita reagir com lisilendopeptidase para dar insulina de divisão B(1-29)-A(1-21) e como intermediário para a preparação de insulina argininamida B30 ou insulina lisisinamida B30, que em seguida pode ser convertida ao respectivo análogo dibásico.

Exemplo 17: Clivagem com lisilendopeptidase:

O precursor de insulina é feito reagir com lisilendopeptidase (LEP) como descrito no documento DE3844211 (exemplo 1). Para o efeito, 10 mg de miniproinsulina Lys(B31) são dissolvidos em tampão Tris (pH 8,0) e é adicionada LEP a partir de *Lysobacter enzymogenes* (0,01 mL de uma solução conc. de 1 mg/mL em água, Merckbiosciences). Incuba-se 2 h à temperatura ambiente e purifica-se por RP-HPLC (coluna Nucleosil 120-5). Produz-se insulina de divisão B(1-29)-A-(1-21).

Exemplo 18: Preparação de insulina Arg(B30) a partir de um precursor de insulina de divisão B(1-29)-A-(1-21) através de acoplamento com argininamida

Dissolvem-se 100 mg de insulina de divisão B(1-29)-A-(1-21) em 0,95 mL de solução de argininamida (446 g/L), adicionam-se 0,13 mL de tampão acetato de Na M (pH 5,8) e 2 mL de DMF. A mistura de reacção é arrefecida para 12 °C e é iniciada por adição de 0,094 mL de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics).

Após 8 h, a reacção é parada por adição de TFA até pH 2,5, e é analisada por HPLC. Forma-se > 60% de insulinamida Arg(B30). Após adição de solução inibidora de tripsina, efectua-se a

purificação do análogo amidado em analogia com o documento US 5.656.722. O análogo de insulina amidado pode ser hidrolisado em seguida na presença de ácido, durante várias horas, para dar insulina Arg(B30) ou a amida pode ser directamente utilizada como medicamento.

Exemplo 19: Preparação de insulina Lys(B30) a partir de um precursor de insulina de divisão B(1-29)-A-(1-21) através de acoplamento com lisinamida

Dissolvem-se 100 mg de insulina de divisão B(1-29)-A-(1-21) em 0,93 mL de solução de lisinamida (400 g/L), adicionam-se 0,13 mL de tampão acetato de Na M (pH 5,8) e 2 mL de DMF. A mistura de reacção é arrefecida para 12 °C e é iniciada por adição de 0,094 mL de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics). Após 8 h, a reacção é parada por adição de TFA até pH 2,5, e é analisada por HPLC. Forma-se insulinamida Lys(B30) que, após adição de solução inibidora de tripsina, é purificada em analogia com o documento US 5.656.722. O análogo de insulina amidado pode ser hidrolisado em seguida na presença de ácido durante várias horas para dar insulina Lys(B30) ou ser directamente utilizado como medicamento.

Listagem de Sequências

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> Processo para a preparação de análogos de insulina com extremidade de cadeia B dibásica

<130> DE2006/025

<140> 10 2006 031 955.9

<141> 2006-07-11

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusão de insulina

<400> 1

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His
1 5 10 15

Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu
20 25 30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro
35 40 45

Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu
50 55 60

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
65 70 75 80

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
85 90 95

Gly

<210> 2

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador insu_a21_gly_rev

<400> 2

ttttttaagc ttgtcgactc attagccgca gtagttctcc agctg

45

<210> 3

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador ins_gly_a21_rev

<400> 3

ttttttccat gggtcgacta tcagccacag tagttttcca gctgg

45

<210> 4

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador alfa_insfl

<400> 4

ttttttggat cctttggaat aaaagatttg ttaaccaaca cttgtgtg

48

<210> 5

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador ins_gly_rev2

<400> 5

ttttttccat gggtcgctat cagccacagt agttttccag ctgg

44

<210> 6

<211> 49

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador ins_gly_rev2

<400> 6

tttttgggc cgaattcact actattagcc acagtagttt tccagctgg

49

<210> 7

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador pich_insgly_dirf

<400> 7

ttttttctcg agaaaagatt tgttaaccaa cacttgtgtg

40

<210> 8

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador pich_insgly_dirrev

<400> 8

ttttttggcg cogaattcac tactattagc cac

33

<210> 9

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador alfa_LT_H6_hirf1

<400> 9

gcaccatcat caccatcact atactgactg cactgaatc

39

<210> 10

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador alfa_LT_H6_hirf2

<400> 10

gaaggggtac ctttgataa aagacttacg caccatcatc accatcac

48

<210> 11

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Hir_entero_insf

<400> 11

cttcaggacg atgacgataa atttggttaac caacacttgt gtgg

44

<210> 12

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Hir_entero_insrev

<400> 12

tttatcgta tcgtcctgaa ggctgaaggt attcctcagg g

41

<210> 13

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador alfa_1t_entero

<400> 13

gaaggggtac ctttggataa aag

23

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de reconhecimento

<400> 14

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 15

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Desphef1

<400> 15

cttcagggaa attcggcacg agttaaccaa cacttggtg gttc

44

<210> 16

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Desphe_rev1

<400> 16

gaaccacaca agtgttggtt aactcgtgcc gaatttcct gaag

44

<210> 17

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Ala_b31f1

<400> 17

cttctacact ccaaagacgg ctctgggtat cgttgaacaa tgttg

45

<210> 18

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Ala_b31rev1

<400> 18

caacattggt caacgatacc acgagccgtc ttggagtggt agaag

45

<210> 19

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Lys_b31f

<400> 19

cttctacact ccaaagacga aaggtatcgt tgaacaatgt tg

42

<210> 20

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Lys_b31rev

<400> 20

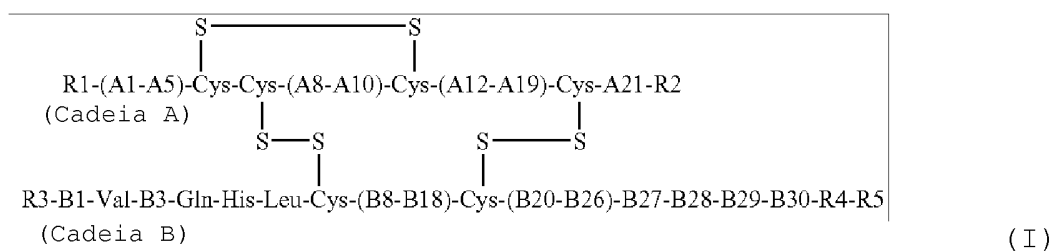
caacattggt caacgatacc ttctgtcttt ggagtgtaga ag

42

Lisboa, 12 de Julho de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de um análogo de insulina ou um derivado deste, em que o análogo de insulina é caracterizado pela fórmula geral I



em que significam

- | | |
|-------------|--|
| (A1 - A5) | os resíduos de aminoácidos nas posições A1 a A5 da cadeia A de insulina humana ou insulina animal, |
| (A12 - A19) | os resíduos de aminoácidos nas posições A12 a A19 da cadeia A de insulina humana ou insulina animal, |
| A21 | um resíduo de aminoácido de ocorrência natural, |
| (B8 - B18) | os resíduos de aminoácidos nas posições B8 a B18 da cadeia B de insulina humana ou insulina animal, |

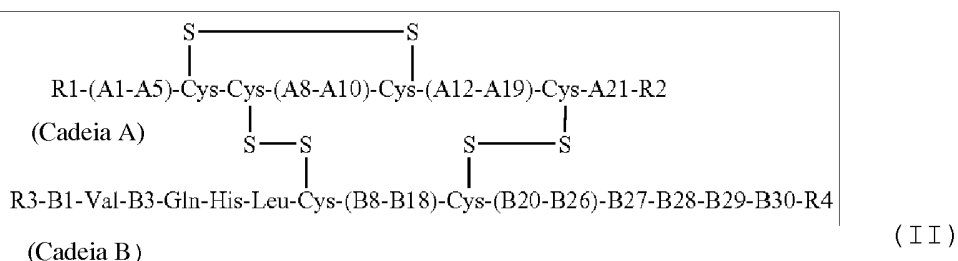
- (B20 - B26) os resíduos de aminoácidos nas posições B20 a B26 da cadeia B de insulina humana ou insulina animal,
- (A8 - A10) os resíduos de aminoácidos nas posições A8 a A10 da cadeia A de insulina humana ou insulina animal,
- B30 uma ligação química ou um resíduo de aminoácido de ocorrência natural,
- B1 uma ligação química ou um resíduo de aminoácido de ocorrência natural,
- B3 um resíduo de aminoácido de ocorrência natural,
- B27, B28 e B29 um resíduo de aminoácido de ocorrência natural,
- R1 um grupo amino ou um a três resíduos de aminoácidos de ocorrência natural,
- R2 um grupo carboxilo ou um a três resíduos de aminoácidos de ocorrência natural,
- R3 um grupo amino ou um a três resíduos de aminoácidos de ocorrência natural,
- R4 representa um aminoácido básico,

R5 um resíduo de aminoácido básico, cujo terminal C está presente quer livre, ou amidado,

em que aquele resíduo de aminoácido em cujo terminal C está ligado o terminal N de R5 é seleccionado de um grupo contendo Arg e Lys;

em que

a um análogo de insulina de partida ou um derivado deste, em que o análogo de insulina de partida é caracterizado pela fórmula geral II



em que R1, (A1-A5), (A8-A10), (A12-A19), A21, R2, R3, B1, B3, (B8-B18), (B20-B26), B27, B28, B29, B30 e R4 são definidos como na fórmula I e o resíduo de aminoácido C terminal da cadeia B é seleccionado de um grupo contendo Arg e Lys,

num dos aminoácidos C terminais indicados, na presença de uma enzima com a actividade biológica de tripsina, adiciona-se um aminoácido básico de ocorrência natural amidado ou protegido com um grupo de protecção C terminal, seleccionado do grupo Arg e Lys, e o análogo de insulina

modificada obtido é purificado e, opcionalmente, o grupo amida ou grupo de protecção no terminal C é clivado do aminoácido adicionado ou do péptido adicionado.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o análogo de insulina modificada é insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32), cuja extremidade C terminal da cadeia B é amidada.
3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que o análogo de insulina de partida é insulina humana Gly(A21), Arg(B31).
4. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, em que o análogo de insulina de partida é preparado por expressão recombinante de uma proteína precursora contendo a cadeia A e B do análogo de insulina de partida.
5. Processo de acordo com a reivindicação 4, em que é expresso um gene que é parte de um replicão.
6. Processo de acordo com uma das reivindicações 4 ou 5, em que é utilizada uma bactéria ou uma levedura como célula hospedeira.
7. Processo de acordo com uma das reivindicações 4 a 6, em que a proteína precursora é segregada após a expressão.
8. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que a proteína precursora é isolada a partir do sobrenadante celular de bactérias ou leveduras.

9. Processo para a preparação de análogos de insulina modificada de acordo com a reivindicação 6, em que a proteína precursora é isolada a partir do periplasma de uma bactéria.
10. Processo de acordo com uma das reivindicações 4 a 7, em que a proteína precursora obtida de acordo com uma das reivindicações indicadas é sujeita a um processo de enrolamento e clivagem enzimática.
11. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, em que o análogo de insulina de partida é preparado por expressão recombinante directa.
12. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 11, em que a enzima com actividade biológica de tripsina é seleccionada de um grupo contendo tripsina humana, tripsina porcina, tripsina bovina e uma variante de tripsina humana, tripsina porcina e tripsina bovina.
13. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 11, em que a enzima apresenta actividade de lisilendopeptidase.
14. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 12, em que a extremidade C terminal da cadeia B do análogo de insulina modificada é subsequentemente desprotegido numa reacção de hidrólise.
15. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 14, em que o análogo de insulina obtido é insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32).

Lisboa, 12 de Julho de 2013