



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1006443-5 B1



(22) Data do Depósito: 22/04/2010

(45) Data de Concessão: 25/05/2021

(54) Título: PROTEÍNA OU PEPTÍDEO DE FUSÃO E MÉTODO PARA AUMENTAR A MEIA-VIDA IN VIVO DE UMA PROTEÍNA OU PEPTÍDEO

(51) Int.Cl.: C07K 19/00; C07K 14/475; C07K 14/81.

(30) Prioridade Unionista: 22/04/2009 KR 10-2009-0035190.

(73) Titular(es): ALTEOGEN, INC..

(72) Inventor(es): HYE-SHIN CHUNG; SEUNG BUM YOO; SANG MEE LEE.

(86) Pedido PCT: PCT KR2010002520 de 22/04/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/123290 de 28/10/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/10/2011

(57) Resumo: PROTEÍNA OU PEPTÍDEO DE FUSÃO DE MEIA-VIDA AUMENTADA IN VIVO MANTIDOS POR LIBERAÇÃO SUSTENTADA IN VIVO, E MÉTODO PARA AUMENTAR A MEIA-VIDA IN VIVO USANDO OS MESMOS. A presente invenção se refere a uma proteína ou a um peptídeo de fusão, a meia-vida in vivo dos quais é aumentada por manutenção de liberação sustentada in vivo, e a um método para aumentar a meia-vida in vivo usando os mesmos. Uma proteína ou um peptídeo de fusão de acordo com a presente invenção tem excelente estabilidade in vivo, por ligação de uma proteína fisiologicamente ativo ou de um peptídeo fisiologicamente ativo a uma antitripsina alfa-1 ou a um mutante de antitripsina alfa-1 com um ou mais aminoácidos mutados, para manter a liberação sustentada in vivo e para aumentar de maneira significativa a meia-vida dos mesmos no sangue (T1/2) comparados a uma proteína fisiologicamente ativa inerente ou a um peptídeo fisiologicamente ativo inerente. Portanto, uma proteína ou um peptídeo de fusão de acordo com a presente invenção pode ser útil no desenvolvimento de uma preparação da liberação sustentada de uma droga de proteína ou de peptídeo.

PROTEÍNA OU PEPTÍDEO DE FUSÃO E MÉTODO PARA AUMENTAR A MEIA-VIDA IN VIVO DE UMA PROTEÍNA OU PEPTÍDEO

Campo Técnico

[001] A presente invenção se refere a uma proteína ou peptídeo de fusão apresentando meia-vida aumentada *in vivo*, e a um método para aumentar a meia-vida *in vivo* de uma proteína ou de um peptídeo usando os mesmos.

Antecedentes da Técnica

[002] Drogas de proteína e de peptídeo apresentam excelentes efeitos terapêuticos, que, de outra maneira, não podem ser tratados por drogas químicas sistêmicas em geral, e, portanto, assumem posições importantes na Medicina e na Farmácia. Por exemplo, o hormônio de crescimento humano recombinante (hGH) é o único agente terapêutico efetivo para o tratamento de deficiência de hormônio do crescimento, e a eritropoietina humana recombinante (EPO) é usada no tratamento da anemia resultante de doença renal crônica devido a sua capacidade de aumentar o nível de células vermelhas do sangue, e o hormônio estimulante de colônias de granulócitos recombinante (G-CSF) é usado como a única droga para aumentar a contagem de células brancas do sangue em pacientes com câncer depois de quimioterapia. Em adição, vários tipos de citocinas, hormônios e peptídeos, que são encontrados no corpo, são usados como os únicos agentes terapêuticos para um amplo espectro de doenças para as quais não estão disponíveis atualmente quaisquer outras alternativas.

[003] Embora elas exibam excelentes efeitos terapêuticos *in vivo*, essas drogas de proteína ou de peptídeo rapidamente perdem a sua atividade terapêutica e, portanto, apresentam meias-vidas curtas *in vivo* porque elas são degradadas por proteinases do sangue imediatamente depois de injeção ou elas são prontamente removidas do corpo pelos rins ou pelo fígado. Portanto, elas são desvantajosas pelo fato de que elas exigem injeções frequentes a fim de se manter um nível constante no sangue ou o título das mesmas. Tal injeção frequente baixa a obediência à droga por pacientes por causa do medo e da dor da injeção ou inconveniência por

administrações repetidas, quando elas forem usadas durante um longo período de tempo.

[004] Muitos estudos têm sido continuamente conduzidos a fim de aumentar a estabilidade no sangue de drogas de proteína e de peptídeo e de manter os níveis das drogas no sangue durante um longo período de tempo.

[005] Por exemplo, formas de liberação sustentada de drogas têm sido desenvolvidas por formulação de uma proteína ou de um peptídeo terapeuticamente ativos com um polímero biodegradável, que permita que proteínas ou peptídeos sejam liberados lentamente a partir do sítio de injeção. Quando a droga de liberação sustentada for injetada subcutaneamente ou intramuscularmente, a droga é liberada lentamente para manter a droga em um nível constante durante um período de tempo específico (M. Chasin & R. Langer, et al., *Biodegradable polymer as drug delivery system*, Marcel Dekker (1990); J. Heller, et al., *Adv. Drug Del. Rev.*, 10, 163 (1993)). Dentre os polímeros biodegradáveis, PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico)) tem sido largamente usado. Por exemplo, uma forma de dosagem sustentada de peptídeo agonista de LHRH (hormônio de liberação de hormônio luteinizante) foi produzida, e foi constatado que esse produto libera o peptídeo *in vivo* durante um ou três meses. O uso de polímeros biodegradáveis tem sido aplicado a proteínas de elevados pesos moleculares. Por exemplo, a patente norte-americana de número 6.500.448 revela uma composição farmacêutica para a liberação sustentada de hormônio de crescimento humano, que compreende um polímero biocompatível, e partículas de hormônio de crescimento humano complexado com cátion de metal. Em outro estudo, as patentes coreanas de números 10-0236771 e 10-0329336 descreveram o uso de ácido hialurônico para as micropartículas de liberação sustentada das drogas de proteína, apresentando a aplicação de hormônio de crescimento humano recombinante.

[006] Conquanto, para a liberação sustentada de drogas, polímeros biodegradáveis têm sido aplicados de maneira bem sucedida a peptídeos de baixos

pesos moleculares, há limitações que dizem respeito a sua aplicação a proteínas com pesos moleculares elevados. A razão para isso é que proteínas são facilmente desnaturadas no curso de produção de micropartículas de liberação sustentada, e os aminoácidos desnaturados diminuem a atividade da proteína, o que causa algumas respostas imunes indesejadas no corpo humano. Em adição, o tamanho das micropartículas para a liberação sustentada de proteínas ou de peptídeos é, de maneira geral, grande, exigindo agulhas de seringas grossas quando injetadas no ser humano, o que cria dor no sítio de injeção. Além disso, as micropartículas apresentam a desvantagem econômica de baixos rendimentos de produção, na produção dos produtos para a finalidade comercial.

[007] A fim de superar os problemas anteriormente mencionados, os estudos têm sido direcionados na direção da demora de eliminação renal de proteínas ou de peptídeos. No todo, proteínas com um peso molecular de 60.000 Dalton ou menos passam através dos rins sem retenção renal. Portanto, têm sido feitas tentativas para aumentar o baixo peso molecular de agentes terapêuticos de peptídeo ou de proteína, para prolongar o tempo de circulação *in vivo*, reduzindo, assim, a frequência de injeções. De acordo com essas técnicas, proteínas e peptídeos fisiologicamente ativos não são fornecidos em uma forma sustentada, mas, ao invés disto, em uma forma de longa atuação.

[008] Uma das estratégias mais populares usadas para reduzir a frequência de injeções é se fixar um polímero altamente solúvel, tal como polietileno glicol (ao qual se refere, doravante, como "PEG") à superfície de proteínas ou peptídeos farmaceuticamente ativos. PEG pode ser fixado de maneira não específica ao grupo amino de aminoácidos de proteínas e de peptídeos. A PEGilação pode fornecer solubilidade à água a drogas e proteínas hidrofóbicas e aumenta o tamanho hidrodinâmico do agente para prolongar o tempo em circulação quando ele for injetado no corpo (Sada et al., *J. Ferment Bioeng* 71, 137-139, 1991).

[009] Recentemente, interferon-alfa PEGilado tem sido comercializado a fim de reduzir os intervalos de injeção. Em adição, Kinstler et al., demonstraram que uma

injeção de fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) PEGilado por semana (um ciclo de quimioterapia) tinha o mesmo efeito médico que tinham injeções trissemanais de G-CSF (Kinstler et al., *Pharm Res* 12, 1883-1888, 1995). PEG-GSCF estava comercialmente disponível sob o nome comercial “Neulast”.

[010] Uma vez que o interferon-alfa PEGilado de uma proteína resulta da conjugação covalente não específica de PEG à superfície da proteína, a interação da proteína com seu receptor pode ser impedida na região PEGilada, diminuindo, assim, de maneira significativa a atividade *in vivo* da proteína. Em adição, a PEGilação é algo inconveniente, porque as proteínas PEGiladas no sítio fisiologicamente ativo têm que ser removidas durante um processo de purificação para deixar os conjugados de PEG-proteína, que tenham sua atividade diminuída ao mínimo grau possível. Nesse processo, portanto, o rendimento da produção de conjugados de PEG-proteína desejados é diminuído de maneira significativa, resultando na situação economicamente desfavorável. Em adição, como para algumas proteínas que são instáveis em soluções aquosas, tentativas para se conjugar com PEG têm sido malogradas.

[011] Além disso, uma técnica de glicoengenharia tem sido usada para reduzir a frequência de injeções e tem sido agora comercializada. Elliot et al., relataram a glicosilação adicional de eritropoietina (EPO) por substituição de aminoácidos em certas posições (*Nat Biotechnol* 21, 414-421, 2003; patente norte-americana de número 7,217,689). A eritropoietina modificada por técnica de glicoengenharia está agora comercialmente disponível sob o nome comercial de “Aranesp” e sabe-se que a circulação na corrente sanguínea, metabolismo e excreção da eritropoietina modificada são retardados devido à adição de cadeias de açúcares com ácido siálico no terminal e ao peso molecular elevado. Entretanto, a tecnologia de glicoengenharia para introduzir sítios de glicosilação adicionais das proteínas não tem sido amplamente usada, porque a fixação ou a adição de cadeias de açúcares podem causar inativação da proteína fisiologicamente ativa, e sua capacidade de manter estabilidade *in vivo* de muitas proteínas não foi

comprovada. Além disso, a escolha de sítios da proteína fisiologicamente ativa, os quais as cadeias de açúcares possam ser adicionalmente fixadas, é muito estreita. Em adição, a tecnologia de glicoengenharia não é fácil de se aplicar a peptídeos de baixos pesos moleculares.

[012] O desenvolvimento de tecnologia de engenharia genética permitiu ampliar o tamanho de uma proteína fisiologicamente ativa por fusão com proteína de elevado peso molecular (*Curr Opin Drug Discov Devel* 12, 284-295, 2009). Por exemplo, um gene de proteína fisiologicamente ativa é fundido a um gene de albumina humana e, então, expresso em células de levedura, para produzir uma proteína de fusão (Publicações de Patentes Internacionais de números WO 93/15199 e WO 93/15200). Exemplos da proteína fisiologicamente ativa fundida à albumina incluem fator estimulante de colônias de granulócitos (Halpern et al., *Pharm Res* 19, 1720-1729, 2002), hormônio de crescimento humano (Osborn et al., *Eur J Pharmacol* 456, 149-158, 2002), peptídeo-1 similar a glucagon (Baggio et al., *Diabetes* 53, 2492-2500, 2004), e interferon-alfa (Osborn et al., *J Pharmacol Exp Ther* 303, 540-548, 2002).

[013] No caso de tecnologia de fusão recombinante, proteínas de fusão com transferrina são também conhecidas. Por exemplo, a patente norte-americana de número 7.176.278 revela uma molécula de fusão, na qual peptídeo-1 similar a glucagon está fundido à transferrina nativa ou à transferrina aglicosilada e torna a meia-vida *in vivo* aumentada.

[014] Enquanto isso, a meia-vida *in vivo* de uma proteína pode ser estendida por fusão a um fragmento Fc de imunoglobulina (Ig) (Patentes norte-americanas de números 5,116,964 e 5,605,690). Um gene de fusão de um fragmento de receptor de TNF- α e de fragmento Fc de IgG1 foi expresso em uma célula animal (ovário de hamster chinês, CHO) transformada com o gene que codifica a proteína de fusão e a proteína de fusão está agora comercialmente disponível (nome comercial: Enbrel), depois de aprovação da USFDA como um agente terapêutico para artrite reumatoide. Além disso, Wang (Qinghua Wang; WO 2007/012188)

estendeu a meia-vida *in vivo* de GLP-1($t_{1/2} < 2$ min) ou de exendina-4 com meia-vida curta por fusão a um fragmento Fc de Ig.

[015] Mesmo se Fc de Ig for amplamente usado como um veículo para proteínas de fusão, a fim de aumentar a meia-vida *in vivo*, Fc de IgG1 retém a sua própria citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC) ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Portanto, quando injetada no corpo, uma proteína de fusão, de uma proteína fisiologicamente ativa com Fc de IgG1, pode causar respostas imunes complexas. Em adição, a administração repetida de proteínas de fusão de Fc, durante um longo período de tempo, pode produzir anticorpos indesejados. Consequentemente, o uso de proteínas de fusão de Fc de IgG1 apresenta limitação em aplicação clínica.

[016] A patente coreana de número 10-0725315 revela um complexo de proteína usando um fragmento de imunoglobulina e um método para a sua preparação, em que uma proteína fisiologicamente ativa é fundida a um Fc de IgG via PEG. O “complexo de proteína”, apresentando uma estrutura de proteína fisiologicamente ativa – PEG-Fc, tem uma meia-vida *in vivo* mais longa do que a proteína fisiologicamente ativa, conforme medida por ensaio farmacocinético. No entanto, as desvantagens ou problemas similares mostrados no método de fusão de Fc também podem ser observados no “complexo de proteína”, porque uma proteína fisiologicamente ativa e um fragmento de Fc estão quimicamente ligados por molécula de PEG.

[017] Outro exemplo do uso de imunoglobulina na intensificação da estabilidade *in vivo* de uma droga de peptídeo é a fusão de uma molécula de IgG inteira e um peptídeo de baixo peso molecular (Rader et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5396-5400, 2003, Doppalapudi et al., *Bioorg & Med Chem* 17, 501-506, 2007). No entanto, essa técnica, chamada “CovX-Body”, não pode ser aplicada a proteínas de elevados pesos moleculares e seu uso é limitado devido aos problemas gerados quando da produção das proteínas de fusão de Fc ou das proteínas de fusão de PEG.

[018] Conforme descrito acima, muitas tentativas têm sido feitas para fundir um biopolímero a uma proteína fisiologicamente ativa ou a um peptídeo terapêutico, mas podem ser aplicadas somente a uma gama limitada de proteínas ou de peptídeos pelas seguintes razões: o tempo de residência *in vivo* não é suficientemente longo o bastante para se desenvolver a proteína de fusão para uso medicinal; rendimento de produção notavelmente baixo, resultando em situação economicamente desfavorável; respostas imunes indesejadas, quando usadas durante um longo tempo; e a presença residual indesejável de derivados químicos tóxicos, quando usadas para a conjugação com proteínas ou peptídeos. Portanto, existe uma demanda por novas proteínas ou peptídeos de fusão, que possam estender a meia-vida *in vivo* de proteínas ou peptídeos fisiologicamente ativos, com a perda mínima de atividade *in vivo*.

Problema Técnico

[019] Conduzindo a presente invenção, pesquisa intensiva e abrangente sobre proteínas ou peptídeos de fusão, que apresentam uma meia-vida estendida *in vivo* e perda minimizada de atividade *in vivo*, conduzida pelos presentes inventores, resultou na constatação de que antitripsina alfa-1, ou uma variante da mesma, permite que uma proteína ou peptídeo fisiologicamente ativos, fundidos à mesma, mantenham circulação sustentada *in vivo* e, portanto, tenham estabilidade *in vivo* e meia-vida *in vivo* ($T_{1/2}$) aumentadas, comparados aos próprios proteína ou peptídeo.

Solução Técnica

[020] A presente invenção fornece uma proteína ou peptídeo de fusão com meia-vida estendida *in vivo*, com a circulação sustentada dos mesmos mantida, e um método para estender a meia-vida *in vivo* de uma proteína ou de um peptídeo usando os mesmos.

Descrição dos Desenhos

- a FIG. 1 é um gráfico demonstrando os comportamentos farmacocinéticos da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], da

fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], da fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH].

- a FIG. 2 é um gráfico demonstrando os comportamentos farmacocinéticos da fusão de interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α].

- a FIG. 3 é um gráfico demonstrando os comportamentos farmacocinéticos da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF].

- a FIG. 4 é um gráfico demonstrando os comportamentos farmacocinéticos da fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)].

- a FIG. 5 é um gráfico mostrando a atividade *in vivo* (mudança de peso do corpo em ratos dos quais foi removida a glândula pituitária) da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH].

- a FIG. 6 é um gráfico mostrando as atividades *in vivo* (aumento da contagem de leucócitos) da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF], e da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF].

- a FIG. 7 é um gráfico mostrando os resultados de um teste de tolerância à glicose intraperitoneal, com fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)].

- a FIG. 8 é um gráfico mostrando o efeito da fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] sobre o nível de açúcar no sangue em modelos de ratos com diabetes.

- a FIG. 9 é um gráfico mostrando as atividades intracelulares da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], e da fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH].
- a FIG. 10 é um gráfico mostrando as atividades intracelulares da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF].
- a FIG. 11 é um gráfico mostrando as atividades inibidoras da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] e da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] contra tripsina.
- a FIG. 12 é um gráfico mostrando as atividades inibidoras da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] e da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] contra elastase de neutrófilos humanos.
- a FIG. 13 é uma fotografia mostrando bandas de proteína da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], e da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], e da fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH] depois de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

Melhor Modo

[021] De acordo com um aspecto da mesma, a presente invenção fornece uma proteína ou um peptídeo de fusão de meia-vida estendida *in vivo*, em que uma proteína ou um peptídeo fisiologicamente ativo é fundido à antitripsina alfa-1, por meio disto a proteína ou o peptídeo fisiologicamente ativos podem ser circulados de

uma maneira sustentada *in vivo*.

[022] De acordo com outro aspecto da mesma, a presente invenção fornece uma proteína ou um peptídeo de fusão de meia-vida estendida *in vivo*, em que uma proteína ou um peptídeo fisiologicamente ativo é fundido a uma variante de antitripsina alfa-1 mutada em um ou mais resíduos de aminoácidos, por meio disto a proteína ou o peptídeo fisiologicamente ativos podem ser circulados de uma maneira sustentada *in vivo*.

[023] De acordo com um outro aspecto da mesma, a presente invenção fornece um método para estender a meia-vida *in vivo* de uma proteína ou de um peptídeo fisiologicamente ativos, compreendendo a fusão da proteína ou do peptídeo fisiologicamente ativos à antitripsina alfa-1 ou a uma variante de antitripsina alfa-1 apresentando um ou mais aminoácidos mutados, por meio disto a proteína ou o peptídeo fisiologicamente ativos podem ser circulados de uma maneira sustentada *in vivo*.

[024] Abaixo, é dada uma descrição detalhada da presente invenção.

[025] A proteína ou o peptídeo de fusão de acordo com a presente invenção apresenta o uso de antitripsina alfa-1 ou de variante de antitripsina alfa-1 para manter a circulação sustentada de uma proteína ou de um peptídeo fisiologicamente ativos, para estender a meia-vida *in vivo* por fusão da proteína ou do peptídeo fisiologicamente ativos à mesma.

[026] Conforme usado aqui, o termo “proteína de fusão / polipeptídeo de fusão” significa uma nova molécula de proteína, na qual uma proteína fisiologicamente ativa, com um peso molecular elevado, é fundida ao terminal N ou C de antitripsina alfa-1 ou de uma variante de antitripsina alfa-1. Igualmente, o termo “peptídeo de fusão”, conforme usado aqui, significa uma nova molécula de peptídeo, na qual um peptídeo fisiologicamente ativo, com um peso molecular baixo, é fundido ao terminal N ou C de antitripsina alfa-1 ou de uma variante de antitripsina alfa-1.

[027] A proteína ou o peptídeo fisiologicamente ativos podem ser fundidos diretamente ou via um ligador, consistindo em aminoácidos, à antitripsina alfa-1 ou

a uma variante de antitripsina alfa-1 mutada com um ou mais aminoácidos.

[028] De preferência, uma técnica de recombinação de gene é usada para fundir a proteína ou o peptídeo fisiologicamente ativos à antitripsina alfa-1 ou a uma variante de antitripsina alfa-1 mutada em um ou mais aminoácidos. Alternativamente, um ligador bem conhecido na técnica pode ser usado para a fusão da proteína ou do peptídeo fisiologicamente ativos ao terminal N ou C ou a um grupo livre de antitripsina alfa-1 ou de uma variante de antitripsina alfa-1 mutada em um ou mais aminoácidos.

[029] Dentre as proteínas fisiologicamente ativas, estão hormônios e seus receptores, modificadores de resposta biológica e seus receptores, citocinas e seus receptores, enzimas, anticorpos e fragmentos de anticorpos. Exemplos concretos da proteína fisiologicamente ativa incluem hormônio de crescimento humano (hGH), insulina, hormônio estimulante de folículos (FSH), gonadotropina coriônica humana, hormônio da paratireoide (PTH), eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), interferon-alfa, interferon-beta, interferon-gama, interleucinas, fator ativante de macrófagos, fator de necrose de tumor, ativador de plasminogênio de tecido, fator de coagulação VII, VIIa, VIII e IX, proteína 2 morfogênica de ossos humanos (hBMP2), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), glicocerebrosidase, α -galactosidase A, α -L-iduronidase, iduronato-2-sulfatase, lactase, adenosina deaminase, butiril-colinesterase, quitinase, glutamato descarboxilase, imiglicerase, lipase, uricase, acetil-hidrolase de fator ativante de plaquetas, endopeptidase neutra, uroquinase, estreptoquinase, mieloperoxidase, superóxido dismutase, toxina botulínica, collagenase, hialuronidase, L-asparaginase, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ e Fd, mas não estão limitados a eles.

[030] Exemplos do peptídeo fisiologicamente ativo incluem peptídeo-1 similar a glucagon (GLP-1) e seus análogos, exendina e seus análogos, somatostatina e seus

análogos, agonista e antagonista de hormônio de liberação de hormônio luteinizante (LHRH), hormônio adrenocorticotrópico, hormônio de liberação de hormônio de crescimento, oxitocina, timosina alfa-1, fator de liberação de corticotropina, calcitonina, bivalirudina, análogos de vasopressina e fragmentos de proteínas fisiologicamente ativas, mas não limitados a eles.

[031] Antitripsina alfa-1 é uma proteína do soro humano de cerca de 50.000 Dalton e presente em elevada quantidade no sangue em cerca de 2 mg/mL (Robin W.C. et al., *Nature* 298, 329-334, 1982). Também se refere à antitripsina alfa-1 como inibidor de protease alfa-1, porque ela inibe uma ampla variedade de proteases. Em conjunção com doenças conhecidas, entretanto, ela apresenta a função predominante de proteger os tecidos dos pulmões contra a elastase de neutrófilos (Beatty et al., *J Biol Chem* 255, 3931-3934, 1980). Na ausência de antitripsina alfa-1, a elastase de neutrófilos está livre para degradar a elastina, o que contribui para a elasticidade dos pulmões, resultando em complicações respiratórias, tais como enfisema. Distúrbios dessa proteína incluem deficiência de antitripsina alfa-1, um distúrbio hereditário. A antitripsina alfa-1 extraída do soro tem estado comercialmente disponível como um agente terapêutico para o enfisema, sob o nome comercial de “Prolastina”, desde que ele foi aprovado pela FDA. A estabilidade e a segurança de Prolastina foram comprovadas e ela é injetada intravenosamente em uma dose de 60 mg/Kg por semana. Em adição, sabe-se que a própria antitripsina alfa-1 apresenta uma meia-vida *in vivo* de cerca de 5 – 6 dias (Weweres, MD, et al., *N. Engl J Med* 316, 1055-1062, 1987). Isso fornece uma base teórica, sobre a qual antitripsina alfa-1, que é segura para o corpo mesmo se for administrada em uma grande quantidade, pode funcionar para aumentar a meia-vida *in vivo* de uma proteína ou de um peptídeo fisiologicamente ativos, por fusão entre eles. O papel como um inibidor de protease e a estrutura de antitripsina alfa-1 são bem conhecidos (Elliott, P. et al., *JMB* 275, 419-425, 1998). O resíduo de aminoácido P1 (posição 358 a partir do terminal N), na antitripsina alfa-1, é metionina, um resíduo essencial para ligação à elastase. Sabe-se que a proteína

também inibe uma ampla variedade de proteases, incluindo tripsina, quimiotripsina, trombina e elastase. O gene de antitripsina alfa-1 é altamente pleiomórfico com mais do que 100 alelos identificados até agora, os fenótipos dos quais são determinados usando IEF (focalização isoelétrica) e designados por um código de letras (A a Z) (Stoller et al., *The Lancet*, 365, 2225-2236, 2005). À família de alelos M, a mais predominante dentre os alelos, refere-se como M, e é adicionalmente dividida em subtipos, tais como M1 (Val²¹³), M1 (Ala²¹³), M2 e M3, de acordo com as mutações na sequência de aminoácidos. Portanto, a antitripsina alfa-1 usada na presente invenção é um subtipo específico pertencendo à família de alelos M, e outros subtipos são também usados com o mesmo efeito.

[032] A variante de antitripsina alfa-1 pode ser preparada por mutagênese sítio-dirigida em um ou mais aminoácidos. Por exemplo, a variante de antitripsina alfa-1 pode ter asparagina na posição 357 de P2 em substituição à prolina. Em adição à substituição por asparagina em P2, à prolina, na posição 357, a variante de antitripsina alfa-1 também pode ter um ou mais outros aminoácidos mutantes em outras posições. Em detalhes, a variante de antitripsina alfa-1 pode ter asparageína ao invés de prolina na posição 357 e, opcionalmente, treonina ao invés de serina na posição 359 e/ou serina ao invés de cisteína na posição 232. A variante de antitripsina alfa-1, útil na presente invenção, pode ser selecionada dentre a monovariante de antitripsina alfa-1 [α 1AT(P357N)], a divariante de antitripsina alfa-1 [α 1AT(P357N, S359T)], a divariante 2 de antitripsina alfa-1 [α 1AT(P357N, C232S)], e a trivariante de antitripsina alfa-1 [α 1AT(P357N, C232S, S359T)].

[033] A monovariante de antitripsina alfa-1 [α 1AT(P357N)] resulta da substituição de prolina (Pro) por asparagina (Asn) na posição 357 de P2 a partir do terminal N. Essa variante de antitripsina alfa-1 é caracterizada pela geração de um novo sítio de N-glicosilação Asn-X-Ser, que contribui para função de neutralização da atividade inibidora de antitripsina alfa-1 como um inibidor de protease e também minimizando a imunogenicidade atribuível à substituição de aminoácido quando da injeção.

[034] A divariante de antitripsina alfa-1 [α 1AT(P357N, S359T)] resulta da

substituição de prolina por asparagina na posição 357 de P2 e de serina por treonina na posição 359. Essa variante de antitripsina alfa-1 é caracterizada pela geração de um novo sítio de N-glicosilação Asn-X-Thr, que contribui para função de neutralização da atividade inibidora de antitripsina alfa-1 como um inibidor de protease e minimizando a imunogenicidade atribuível à substituição de aminoácido quando da injeção.

[035] A divariante 2 de antitripsina alfa-1 [α 1AT(P357N, C232S)] resulta da substituição de prolina por asparagina na posição 357 de P2 e de cisteína por serina na posição 232. Essa divariante 2 de antitripsina alfa-1 é caracterizada pela geração de um novo sítio de N-glicosilação Asn-X-Ser, que contribui para função de neutralização da atividade de antitripsina alfa-1 como um inibidor de protease e minimizando a imunogenicidade atribuível à substituição de aminoácido quando da injeção, e, adicionalmente, a prevenção da formação de um dímero mediada pela cisteína livre.

[036] Resultando da substituição de prolina por asparagina na posição 357 de P2, de cisteína por serina na posição 232 e de serina por treonina na posição 359, a trivariante de antitripsina alfa-1 [α 1AT(P357N, C232S, S359T)] é caracterizada pela geração de um novo sítio de N-glicosilação Asn-X-Thr, que contribui para função de neutralização da atividade inibidora de antitripsina alfa-1 como um inibidor de protease e minimizando a imunogenicidade atribuível à substituição de aminoácido quando da injeção, e, adicionalmente, a prevenção da formação de um dímero mediada pela cisteína livre.

[037] Dentre as proteínas ou os peptídeos de fusão da presente invenção estão hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] (SEQ ID NO: 1), hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] (SEQ ID NO: 2), hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH] (SEQ ID NO: 3), interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α] (SEQ ID NO: 4), fator estimulante de colônias de granulócitos

/ divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] (SEQ ID NO: 5), fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] (SEQ ID NO: 6), e exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] (SEQ ID NO: 7).

[038] Todas as proteínas e os peptídeos de fusão aqui descritos, hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH], interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α], fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF], fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF], e exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)], são significativamente aumentados em meia-vida no soro ($t_{1/2}$) e exibem excelente estabilidade *in vivo*, quando comparados às próprias proteínas e aos próprios peptídeos fisiologicamente ativos.

[039] Quando injetada em uma pluralidade de ratos que tiveram suas glândulas pituitárias removidas, constatou-se que a fusão de hormônio de crescimento humano monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] induz os animais a ganharem peso. O nível de leucócitos em ratos foi aumentado quando eles foram injetados com a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] ou a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF]. O grupo administrado com a fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] exibiu níveis de açúcar no sangue mais baixos do que o fizeram os grupos administrados com exendina-4 e este baixo nível de açúcar no sangue foi

mantido durante pelo menos 24 horas depois da administração. Portanto, as proteínas ou os peptídeos de fusão de acordo com a presente invenção retêm atividade *in vivo* durante um longo período de tempo.

[040] Em adição, as proteínas ou os peptídeos de fusão, hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH], fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF], apresentam atividades intracelulares similares (EC_{50}) e, portanto, suas atividades não variam de maneira significativa dependendo do tipo dos veículos, isto é, antitripsina alfa-1 e variantes de antitripsina alfa-1.

[041] Além disso, a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] da presente invenção exibe excelente atividade inibidora contra tripsina e elastase de neutrófilos humanos, enquanto que a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] tem atividade inibidora muito baixa contra tripsina e elastase de neutrófilos humanos. Consequentemente, o fato que a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] e a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] aumentam a meia-vida *in vivo*, por circulação sustentada, não é dependente da propriedade inerente de antitripsina alfa-1.

[042] Conforme descrito acima, as proteínas ou os peptídeos de fusão de acordo com a presente invenção têm suas meias-vidas no soro ($T_{1/2}$) aumentadas através de circulação sustentada, e, portanto, apresentam estabilidade *in vivo* mais elevada, comparados às próprias proteínas e aos próprios peptídeos fisiologicamente ativos. Consequentemente, as proteínas e os peptídeos de fusão da presente invenção podem ser aplicados ao desenvolvimento das formas de dosagem de circulação

sustentada das drogas de proteína e de peptídeo.

Modo da Invenção

[043] Um melhor entendimento da presente invenção pode ser obtido através dos seguintes exemplos, que são mostrados para ilustrar, mas não devem ser construídos como limitantes da presente invenção.

EXEMPLO 1: Preparação de Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Antitripsina Alfa- 1 [T109wt: α 1AT/hGH]

1. Construção do Vetor de Expressão, pSNAT

[044] Para uso na expressão de hormônio de crescimento humano fundido ao terminal C de antitripsina alfa-1, foi construído o vetor de expressão pSNAT, que veiculou antitripsina alfa-1. Em detalhe, o gene de antitripsina alfa-1 foi obtido a partir do vetor hMU001448 (KRIBB) por PCR usando um par de iniciadores ALT21 (SEQ ID NO: 8) e ALT30 (SEQ ID NO: 9), que foram projetados para fundir hormônio de crescimento humano ao terminal C de antitripsina alfa-1. O iniciador ALT30 também foi projetado para apresentar um ligador, que daria a flexibilidade necessária para a manutenção das proteínas de fusão. O nucleotídeo amplificado foi digerido com duas enzimas de restrição XhoI e BamHI e clonados em pSGHV0 (Número de Acesso ao GenBank AF285183), resultando em um vetor recombinante, chamado pSNAT.

2. Construção de Vetor de Hormônio de Crescimento Humano / Antitripsina Alfa-1 [T109wt, α 1AT/hGH]

[045] Um gene de hormônio de crescimento humano (hGH) foi amplificado a partir do vetor IOH45734 (Invitrogen) por PCR usando um par de iniciadores DH22 (SEQ ID NO: 10) e ALT12 (SEQ ID NO: 11). O produto de PCR assim obtido foi digerido com duas enzimas de restrição BamHI e NotI, e clonado em pSNAT no mesmo sítio de restrição de BamHI/NotI, para preparar um vetor de expressão recombinante, chamado T109wt (SEQ ID NO: 1).

3. Expressão de Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Antitripsina Alfa-1 (T109wt)

[046] A fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 (T109wt), preparada acima em 1-2, foi expressa em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1). CHO-K1 foram mantidas em DMEM (Meios Eagle Modificados por Dulbecco) suplementado com FBS à 10% (Soro Bovino Fetal) e antibióticos à 37°C sob uma condição de CO₂ à 5%. Um dia antes da introdução da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 (T109wt) nelas, as células foram inoculadas em uma densidade de 1×10^6 células em uma placa de cultura de 100 mm. A 800 µL de DMEM livre de FBS e antibióticos, foram adicionados 5 µg da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 (T109wt) e a mistura foi incubada, à temperatura ambiente, durante 1 min, misturada com 20 µg de PEI (Polietilenimina, linear, Polysciences Inc (Número de Catálogo: 23966, PM~25,000)) e deixada à temperatura ambiente durante 10 – 15 minutos. Nesse meio tempo, as células incubadas durante um dia foram lavadas com PBS e dotadas com 6 mL de DMEM fresco. A fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 (T109wt) deixada durante 10 – 15 min à temperatura ambiente, foi adicionada à placa de cultura. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e dotadas com IMDM livre de FBS (Número de Catálogo: 12200-028, Gibco, Meio de Dulbecco modificado por Iscove) para identificar a expressão da proteína.

4. Purificação de Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Antitripsina Alfa-1 (T109wt)

[047] Depois de ser expressa em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), conforme descrito em 1-3 acima, a proteína T109wt foi purificada como se segue. Em detalhes, porque a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 (T109wt) foi secretada para o meio, a cultura de células foi centrifugada, de modo que o sobrenadante pudesse ser coletado. Esse sobrenadante foi diluído em uma solução de tampão em equilíbrio (fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0), carregada em uma coluna de Q-Sepharose (GE Healthcare, EUA) previamente equilibrada com a solução de tampão em equilíbrio e suficientemente lavada com a solução de tampão em equilíbrio, seguido por eluição com um gradiente de concentração de

NaCl crescente de um eluente (0 – 400 mM de NaCl, fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0). O eluato de proteína foi misturado com um sal, carregado para uma coluna de Fenil-Sepharose equilibrada (GE Healthcare, EUA), e lavado com uma quantidade suficiente da solução de tampão em equilíbrio, seguido por eluição com um gradiente de concentração de NaCl decrescente de um eluente (NaCl 2 – 0 M, fosfato de sódio 20 mM, pH 6,8). A fração de proteína foi concentrada com o auxílio de Vivaspín20 (GE Healthcare, EUA) para produzir T109wt altamente purificada.

EXEMPLO 2: Preparação de Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH]

1. Preparação de Monovariante de Antitripsina Alfa-1 (Vetor de Clonagem pDHT3N) [048] Porque antitripsina alfa-1 usada para um veículo de fusão na molécula de fusão apresenta uma atividade inibidora própria, a atividade inibidora de antitripsina alfa-1 foi substancialmente diminuída por preparação de uma variante de antitripsina alfa-1. A esse respeito, um gene de antitripsina alfa-1 foi amplificado a partir do vetor hMU001448 (KRIBB) por PCR, e clonado no vetor yT&A, para produzir um vetor pDHT3 recombinante. Depois disso, mutação de substituição do resíduo de prolina na posição 357 de P2 por asparagina, para N-glicosilação, foi realizada usando um par de iniciadores ALT1 (SEQ ID NO: 12) e ALT2 (SEQ ID NO: 13) com o auxílio de um kit de mutagênese (Stratagene, QuikChange II Número de Catálogo 200523-5), para produzir um vetor de clonagem pDHT3N.

2. Construção do Vetor de Expressão pSNATN

[049] Para uso na expressão de hormônio de crescimento fundido ao terminal C da antitripsina alfa-1 inativada, foi construído o vetor de expressão pSNATN, que portava a monovariante de antitripsina alfa-1. Em detalhes, um gene de monovariante de antitripsina alfa-1 foi obtido a partir do vetor pDHT3N por PCR usando um par de iniciadores ALT14 (SEQ ID NO: 14) e ALT30 (SEQ ID NO: 9) e clonado em pSNAT digerido com duas enzimas de restrição EcoRV e BamH1, para fornecer um vetor recombinante, chamado pSNATN.

3. Construção do Vetor de Hormônio de Crescimento Humano / Monovariante de

Antitripsina Alfa-1 [T109, α 1AT(P357N)/hGH]

[050] O gene de hormônio de crescimento humano, amplificado no Exemplo 1-2, foi inserido em pSNATN, no sítio de restrição BamHI/NotI, para fornecer um vetor de expressão recombinante, chamado T109 (SEQ ID NO: 2).

4. Expressão da Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 (T109)

[051] A expressão da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 (T109), em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), foi identificada no mesmo que no Exemplo 1-3.

5. Purificação da Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 (T109)

[052] A fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 (T109) foi purificada da mesma maneira que no Exemplo 1-4.

EXEMPLO 3: Preparação da Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH]

1. Preparação da Divariante de Antitripsina Alfa-1 (Vetor de Clonagem pDHT3NT)

[053] Para uso na preparação de antitripsina alfa-1 inativada, por introdução de sítio de glicosilação no sítio ativo da molécula, antitripsina alfa-1 foi duplamente mutada para diminuir sua atividade e alcançar a homogeneidade de glicosilação. A esse respeito, a substituição do resíduo de serina na posição 359 por treonina para homogeneidade de formação de glicosilação foi realizada no vetor de clonagem pDHT3N induzido por N-glicosilação, que veicula a monovariante de antitripsina alfa-1, era diminuída em atividade por mutação de prolina na posição 357 de P2 para asparagina, usando um par de iniciadores ALT82 (SEQ ID NO: 15) e ALT83 (SEQ ID NO: 16) com o auxílio de um kit de mutagênese (Enzymomics, EZchange Número de Catálogo EM020), para produzir um vetor de clonagem, chamado pDHT3NT.

2. Construção do Vetor de Expressão pSNATNT

[054] Para uso na expressão de hormônio de crescimento humano fundido ao

terminal C da divariante de antitripsina alfa-1, que apresenta a homogeneidade de glicosilação e tinha atividade diminuída, foi construído um vetor de expressão pSNATNT. A esse respeito, um gene de divariante de antitripsina alfa-1 foi amplificado a partir de pDHT3NT por PCR usando um par de iniciadores ALT14 (SEQ ID NO: 14) e ALT30 (SEQ ID NO: 9), projetados para fundir hormônio de crescimento humano ao terminal C da divariante de antitripsina alfa-1, e clonado em pSNAT, previamente tratado com duas enzimas de restrição EcoRV e BamHI, para dar um vetor de expressão, chamado pSNATNT.

3. Construção do Vetor de Hormônio de Crescimento Humano / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T109T, α 1AT(P357N, S359T)/hGH]

[055] O nucleotídeo de hormônio de crescimento humano, amplificado no Exemplo 1-2, foi clonado em pSNATNT no sítio de restrição BamHI/NotI, para dar um vetor de expressão, chamado T109T (SEQ ID NO: 3).

4. Expressão da Fusão Hormônio de Crescimento Humano / Divariante de Antitripsina Alfa-1 (T109T)

[056] A expressão de fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 (T109T), em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), foi identificada da mesma maneira que no Exemplo 1-3.

5. Purificação da Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Divariante de Antitripsina Alfa-1 (T109T)

[057] A de fusão hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 (T109T) foi purificada da mesma maneira que no Exemplo 1-4.

EXEMPLO 4: Preparação da Fusão de Interferon-Alfa Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α]

1. Construção do Vetor de Interferon-Alfa Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T502, α 1AT(P357N)/IFN- α]

[058] Um gene de interferon-alfa humano (IFN- α) foi amplificado a partir do vetor MHS1010-98051913 (Open Biosystems) por PCR, usando um par de iniciadores ALT45 (SEQ ID NO: 17) e ALT49 (SEQ ID NO: 18). O produto de PCR assim obtido

foi duplamente digerido com BamHI e NotI e, então, clonado em pSNATN no sítio de restrição BamHI/NotI, para dar um vetor de expressão recombinante, chamado T502 (SEQ ID NO: 4).

2. Expressão de Interferon-Alfa Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 (T502)

[059] A expressão da fusão de interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 (T502), em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), foi identificada da mesma maneira que no Exemplo 1-3.

3. Purificação de Interferon-Alfa Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 (T502)

[060] A fusão de interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 (T502) foi purificada da mesma maneira que no Exemplo 1-4.

EXEMPLO 5: Preparação da Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T602S: α1AT(P357N, C232S)/G-CSF]

1. Preparação da Divariante 2 de Antitripsina Alfa-1 (Vetor de Clonagem pDHT3NS)

[061] Para uso na preparação de agentes terapêuticos de proteína ou de peptídeo, foi preparada a divariante 2 de antitripsina alfa-1 por mutação de antitripsina alfa-1 para diminuir a atividade inerente de antitripsina alfa-1 e para eliminar a possibilidade de desnaturação de proteína resultando de formação de dímero mediada por cisteína. Nesse contexto, a mutação de substituição do resíduo de cisteína, na posição 232, por treonina foi realizada no vetor de clonagem pDHT3N induzido por N-glicosilação, o qual veicula a monovariante de antitripsina alfa-1 de atividade diminuída, por mutação de prolina, na posição 357 de P2, por asparagina, usando um par de iniciadores ALT52 (SEQ ID NO: 19) e ALT53 (SEQ ID NO: 20) com o auxílio de um kit de mutagênese (Stratagene, QuikChange II Número de Catálogo 200523-5), para produzir um vetor de clonagem, chamado pDHT3NS.

2. Construção do Vetor de Expressão pSNATNS

[062] Para uso na expressão de fator estimulante de colônias de granulócitos fundido ao terminal C da divariante 2 de antitripsina alfa-1, que apresenta atividade

inibidora diminuída, foi construído um vetor de expressão pSNATNS. A esse respeito, um gene de divariante 2 de antitripsina alfa-1 foi amplificado a partir de pDHT3NS por PCR, usando um par de iniciadores ALT14 (SEQ ID NO: 14) e ALT30 (SEQ ID NO: 9), projetados para fundir o fator estimulante de colônias de granulócitos ao terminal C da divariante 2 de antitripsina alfa-1, e foi clonado em pSNATNS previamente tratado com duas enzimas de restrição BstEII e BamHI, para dar um vetor de expressão recombinante, chamado pSNATNS.

3. Construção do Vetor de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Divariante 2 de Antitripsina Alfa-1 [T602S, α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF]

[063] Um gene de fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) foi amplificado a partir de IHS1380-97652343 (Open Biosystems) por PCR, usando um par de iniciadores ALT56 (SEQ ID NO: 21) e ALT57 (SEQ ID NO: 22). O produto de PCR assim obtido foi duplamente digerido com BamHI e NotI, e clonado em pSNATNS no sítio de restrição de BamHI/NotI, para dar um vetor de expressão recombinante, chamado T602S(SEQ ID NO: 5).

4. Expressão da Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Divariante de Antitripsina Alfa-1 (T602S)

[064] A expressão da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 (T602S), em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), foi identificada da mesma maneira que no Exemplo 1-3.

5. Purificação da Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Divariante de Antitripsina Alfa-1 (T602S)

[065] A fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 (T602S) foi purificada da mesma maneira que no Exemplo 1-4.

EXEMPLO 6: Preparação de Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Trivariante de Antitripsina Alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF]

1. Preparação da Trivariante de Antitripsina Alfa-1 (Vetor de Clonagem pDHT3NST)

[066] Para uso na preparação de agentes terapêuticos de proteína ou de peptídeo, foi preparada uma trivariante de antitripsina alfa-1 por mutação da divariante de

antitripsina alfa-1, para se conseguir a homogeneidade de glicosilação. A esse respeito, usando um kit de mutagênese (Enzynomics, EZchange Número de Catálogo EM020), na presença de um par de iniciadores ALT82 (SEQ ID NO: 15) e ALT83 (SEQ ID NO: 16), a substituição do resíduo de serina na posição 359 por treonina, para homogeneidade de glicosilação, foi realizada no vetor de clonagem pDHT3NS induzido por N-glicosilação, portando a divariante 2 de antitripsina alfa-1, em que a atividade inerente foi diminuída como um resultado de substituição da prolina na posição 357 de P2 por asparagina, e a probabilidade de desnaturação de proteína, atribuível à formação de dímero mediada por cisteína, foi removida como um resultado da substituição de cisteína na posição 232 por serina.

2. Construção do Vetor de Expressão pSNATNST

[067] Para uso na expressão de fator estimulante de colônias de granulócitos fundido ao terminal C da trivariante de antitripsina alfa-1, que apresenta atividade diminuída, foi construído um vetor de expressão pSNATNST. A esse respeito, um gene da trivariante de antitripsina alfa-1 foi amplificado a partir de pDHT3NST por PCR, usando um par de iniciadores ALT14 (SEQ ID NO: 14) e ALT30 (SEQ ID NO: 9), projetados para fundir o fator estimulante de colônias de granulócitos ao terminal C da trivariante de antitripsina alfa-1, e foi clonado em pSNAT previamente tratado com duas enzimas de restrição BstEII e BamHI, para dar um vetor de expressão recombinante, chamado pSNATNST.

3. Construção do Vetor de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Trivariante de Antitripsina Alfa-1 [T602ST, α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF]

[068] Um gene de fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) foi amplificado a partir do vetor IHS1380-97652343 (Open Biosystems) por PCR, usando um par de iniciadores ALT56 (SEQ ID NO: 21) e ALT57 (SEQ ID NO: 22). O nucleotídeo amplificado foi duplamente digerido com BamHI e NotI e clonado em pSNATNST no sítio de restrição de BamHI/NotI, para dar um vetor de expressão recombinante, chamado T602ST (SEQ ID NO: 6).

4. Expressão da Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos /

Trivariante de Antitripsina Alfa-1 (T602ST)

[069] A expressão da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 (T602ST), em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), foi identificada da mesma maneira que no Exemplo 1-3.

5. Purificação da Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Trivariante de Antitripsina Alfa-1 (T602ST)

[070] A fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 (T602ST) foi purificada da mesma maneira que no Exemplo 1-4.

EXEMPLO 7: Preparação da Fusão de Exendina-4 / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)]

1. Construção do Vetor de Expressão pSCAT

[071] Para uso na expressão de exendina-4 fundida ao terminal N de antitripsina alfa-1, foi construído um vetor pSCAT. Em detalhes, antitripsina alfa-1, ao terminal N da qual exendina-4 poderia ser fundida, foi amplificada a partir do vetor hMU001448 (KRIBB) por PCR, usando um par de iniciadores ALT21 (SEQ ID NO: 8) e ALT5 (SEQ ID NO: 23). O nucleotídeo amplificado foi digerido com duas enzimas de restrição XhoI e NotI e clonado em pSGHV0 (Número de Acesso ao GenBank AF285183), para dar um vetor recombinante, chamado pSCAT.

2. Construção do Vetor de Expressão pSCATN

[072] Para uso na expressão de exendina-4 fundida ao terminal N da monovariante de antitripsina alfa-1 inativada, foi construído pSCATN. Nesse contexto, um gene que codifica a monovariante de antitripsina alfa-1, ao terminal N da qual exendina-4 poderia ser fundida, foi obtido a partir do vetor pDHT3N e clonado em pSACT usando duas enzimas de restrição EcoRV e NotI, para dar um vetor recombinante, chamado pSCATN.

3. Preparação de Exendina-4

[073] Um gene de exendina-4 foi amplificado por PCR, usando DH15 (códon com sentido, SEQ ID NO: 24) e DH16 (códon sem sentido, SEQ ID NO: 25).

4. Construção de Exendina-4 / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T304, Exendin-

4/ α 1AT(P357N)]

[074] Um gene de exendina-4 foi amplificado a partir do gene preparado no Exemplo 7-3 por PCR, usando um par de iniciadores ALT44 (SEQ ID NO: 26) e ALT41 (SEQ ID NO: 27). Esse nucleotídeo amplificado foi duplamente digerido com XhoI e BamHI e clonado em pSCATN no sítio de restrição XhoI/BamHI, para produzir um vetor de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 (T304, SEQ ID NO: 7).

5. Expressão da Fusão de Exendina-4 / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 (T304)

[075] A expressão da fusão de exendina-4 / variante de antitripsina alfa-1 (T304), em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), foi identificada da mesma maneira que no Exemplo 1-3.

6. Purificação da Fusão de Exendina-4 / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 (T304)

[076] A fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 (T304) foi purificada da mesma maneira que no Exemplo 1-4.

EXEMPLO DE TESTE 1: Imunoensaio com Enzima das Proteínas ou dos Peptídeos de Fusão

[077] O imunoensaio com enzima foi conduzido para analisar as proteínas ou os peptídeos de fusão da presente invenção como se segue.

1. Imunoensaio com Enzima de Hormônio de Crescimento Humano (hGH), Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Antitripsina Alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] e Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH]

[078] Um anticorpo monoclonal anti-hormônio de crescimento humano (Medix Biochemica, Finlândia) foi diluído para uma concentração de 1 ~ 5 μ g/mL em salina tamponada com fosfato (PBS) e foram tomadas alíquotas da diluição em uma quantidade de 100 μ L/cavidade por sobre uma placa de 96 cavidades (Nunc, Dinamarca) e incubadas à temperatura ambiente durante 15 – 18 horas. Depois que os anticorpos que permaneceram suspensos foram removidos, PBS contendo

1% de albumina de soro bovino foi plaqueado em uma quantidade de 250 µL/cavidade e incubado à temperatura ambiente durante 2 horas. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (Tween 20 à 0,05%, PBS) e a solução foi aspirada. Amostras foram diluídas em PBS contendo 1% de albumina de soro bovino e adicionadas às placas de 96 cavidades antes da incubação à temperatura ambiente durante 2 horas. As placas de 96 cavidades foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e 100 µL do conjugado de anticorpo monoclonal de hormônio de crescimento humano – biotina, preparado usando sulfo-NHS-biotina (Pierce Biotechnology, EUA) foram adicionados a cada cavidade das placas de 96 cavidades e, então, incubados à temperatura ambiente durante 2 horas. As placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e incubadas com estreptavidina-HRP à temperatura ambiente durante 30 minutos. Novamente, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e reagidas com 100 µL de uma mistura de TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina) e peróxido de hidrogênio por cavidade, durante 30 minutos, em um local escuro. A cada cavidade, foram adicionados 100 µL de ácido sulfúrico 1 M para terminar a reação, seguido por medição da absorbância à 450 nm, em uma leitora de microplacas VersaMax (Molecular Device, EUA). Os valores para cada amostra foram calculados por análise de regressão depois que uma curva padrão foi traçada para um material de referência.

2. Imunoensaio com Enzima de Interferon-Alfa Humano (IFN-α), Fusão de Interferon-Alfa Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T502: α1AT(P357N)/IFN-α]

[079] O imunoensaio com enzima de interferon-alfa humano (IFN-α) e fusão de interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 foi conduzido com Pares de Anticorpos pareados de IFN-α Humano para ELISA (Bender Medsystems, Áustria). O anticorpo de IFN-α (10 µg/mL) foi deixado aderir às placas de 96 cavidades e bloqueado conforme descrito no Exemplo de Teste 1-1. Uma diluição da amostra foi reagida com o anticorpo à temperatura ambiente durante 2 horas com agitação. Um conjugado de anti-IFN-α-HRP foi plaqueado em uma quantidade

de 50 µL/cavidade e foi reagido com o anticorpo à temperatura ambiente durante 2 horas com agitação. Processos subsequentes foram conduzidos da mesma maneira como no Exemplo de Teste 1-1.

3. Imunoensaio com Enzima de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (G-CSF), Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T602S: α1AT(P357N, C232S)/G-CSF], Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Trivariante de Antitripsina Alfa-1 [T602ST: α1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF]

[080] O mesmo procedimento que no Exemplo de Teste 1 foi repetido, com a exceção de que um anticorpo monoclonal de anti-fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) (RND Systems, EUA), ao invés do anticorpo anti-hormônio de crescimento humano, foi diluído para uma concentração de 1 - 5 µg/mL e foi usado conjugado de anticorpos policlonais de fator estimulante de colônias de granulócitos – biotina (RND Systems, EUA), ao invés do conjugado de anticorpo monoclonal de hormônio de crescimento humano – biotina.

4. Imunoensaio com Enzima de Exendina-4, Exendina-4 / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T304: Exendin-4/α1AT(P357N)]

[081] O mesmo procedimento que no Exemplo de Teste 1-1 foi repetido, com exceção de que anticorpos policlonais anti-exendina-4 (Peptron, Coréia), ao invés do anti-hormônio de crescimento humano, foram diluídos para uma concentração de 5 – 10 µg/mL em PBS e foi usado um conjugado de anticorpo monoclonal de exendina-4 – biotina, ao invés do conjugado anticorpo monoclonal de hormônio de crescimento humano – biotina.

[082] Como para a fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 (T304) preparada no Exemplo 7, ela foi misturada com um adjuvante de Freund (Sigma, EUA) antes da injeção em ratos para produzir antissoros. Os anticorpos foram purificados usando Protein G-Sepharose (GE Healthcare, EUA). Os anticorpos purificados foram diluídos para uma concentração de 10 – 20 µL/mL em PBS, e placas de 96 cavidades foram revestidas com os anticorpos, e reagidas com o

conjugado de anticorpo policlonal de fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 (T304) – biotina, preparado usando um conjugado de sulfo-NHS-biotina (Pierce Biotechnology, EUA), de uma maneira similar àquela do Exemplo de Teste 1-1. As reações com a amostra e o conjugado foram conduzidas enquanto sendo agitadas.

EXEMPLO DE TESTE 2: Ensaio Fármacocinético das Proteínas e dos Peptídeos de Fusão

[083] Para examinar a farmacocinética das proteínas e dos peptídeos de fusão, foram conduzidos os seguintes experimentos.

1. Farmacocinética de Hormônio de Crescimento Humano (hGH), Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Antitripsina Alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH]

[084] Ratos Sprague-Dawley foram usados como animais experimentais e a três deles administrou-se hormônio de crescimento humano, enquanto que cinco ratos foram designados para cada um dos grupos administrados com fusão. A fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], e a fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH], todas preparadas nos Exemplos 1-3, foram injetadas subcutaneamente em uma dose de 720 μ g/Kg nos grupos respectivos de ratos Sprague-Dawley. As amostras foram diluídas em PBS antes da injeção. Amostras de sangue foram tiradas em 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 30 e 48 horas depois da injeção, e centrifugadas para se obter os soros. Para um controle, Scitropin (SciGen, Singapura), um tipo de hormônio de crescimento humano, foi injetado subcutaneamente em uma dose de 200 μ g/Kg. PBS foi usado como um diluente. Amostras de sangue foram tiradas em 0, 0,33, 1, 2, 5, 8, 12, 18, 24, 30 e 48 horas depois da injeção, e centrifugadas para se obter os soros. Cada

amostra foi analisada da mesma maneira que no imunoensaio com enzima do Exemplo de Teste 1.

[085] As farmacocinéticas da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], e da fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH] estão lançadas em gráfico na FIG. 1.

[086] Conforme visto na FIG.1, a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 5,3 horas e um tempo até a concentração no soro de pico ($T_{\text{máx}}$) de 8 horas, a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 5,4 horas e um $T_{\text{máx}}$ de 12 horas, e a fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH] tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 4,9 horas e um $T_{\text{máx}}$ de 12,8 horas. Por outro lado, o hormônio de crescimento humano (hGH) tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 0,8 horas e um $T_{\text{máx}}$ de 1 hora. Portanto, observou-se que todas elas, a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], e a fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH], têm estabilidade *in vivo* significativamente aumentada em face daquela do hormônio de crescimento humano.

2. Farmacocinéticas de Interferon-Alfa Humano (IFN- α), Fusão de Interferon-Alfa Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α]

[087] Ratos Sprague-Dawley foram usados como animais experimentais e cinco ratos foram designados para cada grupo de teste. A fusão de interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α], preparada no Exemplos 4, foi injetada subcutaneamente em uma dose de 200 μ g/Kg nos ratos

Sprague-Dawley de um grupo de teste, 0, 0,33, 1, 2, 5, 8, 12, 18, 24, 30, 48, 72 e 96 horas depois do quê amostras de sangue foram tiradas, e centrifugadas para se obter os soros. Como um controle, interferon-alfa humano (IFN- α , Intermax alpha, LG Life Sciences, Coréia) foi injetado subcutaneamente em uma dose de 60 μ g/Kg nos ratos, 0, 0,33, 1, 2, 5, 8, 12, 18, e 24 horas depois do quê amostras de sangue foram tiradas, e centrifugadas para se obter os soros. Cada amostra foi analisada da mesma maneira que no imunoensaio com enzima do Exemplo de Teste 1.

[088] As farmacocinéticas da fusão de interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α] são mostradas na FIG. 2.

[089] Conforme visto na FIG. 2, a fusão de interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α] tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 18,5 horas e um $T_{m\acute{a}x}$ de 12 horas, enquanto que o interferon-alfa humano tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 3,4 horas e um $T_{m\acute{a}x}$ de 1,4 horas. Portanto, a fusão de interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α] da presente invenção apresenta estabilidade *in vivo* significativamente aumentada, quando comparada a interferon-alfa humano.

3. Farmacocinéticas de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (G-CSF), Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF], Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Trivariante de Antitripsina Alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF]

[090] Ratos Sprague-Dawley foram usados como animais experimentais e a três deles administrou-se fator estimulante de colônias de granulócitos, enquanto que cinco ratos foram designados para cada um dos grupos administrados com fusão. A fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF], fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF], todas preparadas nos Exemplos 5-6, foram injetadas subcutaneamente em uma dose de 340 μ g/Kg nos grupos respectivos de ratos

Sprague-Dawley. Amostras de sangue foram tiradas em 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 30 e 48 horas depois da injeção, e centrifugadas para se obter os soros. Para um controle, Filgrastim (Gracin, Jeil Pharmaceutical Co. Ltd., Coréia), um fator estimulante de colônias de granulócitos comercialmente disponível, foi injetado subcutaneamente em uma dose de 100 µg/Kg. Amostras de sangue foram tiradas em 0, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 30 e 48 horas depois da injeção, e centrifugadas para se obter os soros. Cada amostra foi analisada da mesma maneira que no imunoensaio com enzima do Exemplo de Teste 1.

[091] As farmacocinéticas da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] estão retratadas na FIG. 3.

[092] Conforme visto na FIG. 3, a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α1AT(P357N, C232S)/G-CSF] tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 5,1 horas e um $T_{m\acute{a}x}$ de 13,6 horas, e a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 4,5 horas e um $T_{m\acute{a}x}$ de 16 horas. Por outro lado, uma meia vida no soro ($t_{1/2}$) de 1,8 horas e um $T_{m\acute{a}x}$ de 1,8 horas foram medidos no grupo ao qual foi administrado fator estimulante de colônias de granulócitos. Portanto, constatou-se que a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] apresentam estabilidades *in vivo* aumentadas de maneira significativa, quando comparadas ao fator estimulante de colônias de granulócitos.

4. Farmacocinéticas de Exendina-4, Exendina-4 / Fusão de Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T304: Exendin-4/α1AT(P357N)]

[093] Ratos Sprague-Dawley foram usados como animais experimentais e cinco ratos foram designados para cada grupo de teste. A fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] preparada no Exemplo 7 foi injetada subcutaneamente em uma dose de 520 μ g/Kg em ratos Sprague-Dawley de cada um dos grupos de teste. Amostras de sangue foram tiradas em 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 30, 48 e 72 horas depois da injeção, e centrifugadas para se obter os soros. Como um controle, exendina-4 foi injetada subcutaneamente a ratos em uma dose de 40 μ g/Kg. Amostras de sangue foram tiradas e colocadas em tubos heparinizados em 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 min depois da injeção, e centrifugadas para se obter os soros. Cada amostra foi analisada da mesma maneira que no imunoensaio com enzima do Exemplo de Teste 1.

[094] As farmacocinéticas da fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] estão retratadas na FIG. 4.

[095] Como visto na FIG. 4, a fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 19,1 horas e um $T_{m\acute{a}x}$ de 10,4 horas, enquanto que exendina-4 tinha uma meia-vida no soro ($t_{1/2}$) de 0,8 horas e um $T_{m\acute{a}x}$ de 0,4 horas. Portanto, a fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] da presente invenção apresenta estabilidade *in vivo* aumentada de maneira significativa, quando comparada à exendina-4.

EXEMPLO DE TESTE 3: Ensaio para Atividade *In Vivo* das Proteínas ou dos Peptídeos de Fusão

[096] Os seguintes experimentos foram conduzidos para examinar a atividade *in vivo* das proteínas ou dos peptídeos de fusão de acordo com a presente invenção.

1. Atividade In Vivo de Hormônio de Crescimento Humano (hGH), Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH]

[097] Ratos Sprague-Dawley, que tiveram suas glândulas pituitárias removidas,

foram usados como animais experimentais e divididos em três grupos de sete. Aos ratos Sprague-Dawley hipofisectomizados, foram injetadas subcutaneamente a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], preparada no Exemplo 2, e hormônio de crescimento humano (Eutropin, LG Life Sciences Ltd, Coréia), em doses de 18 μ g e de 5 μ g por rato, respectivamente, a cada dia. Para um controle, foi usado PBS. Os ratos foram pesados a cada dia depois de serem injetados.

[098] Os resultados de análise da atividade *in vivo* (mudança de peso do corpo em ratos que tiveram suas glândulas pituitárias removidas) da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] são dados na FIG. 5.

[099] Como visto na FIG. 5, os ratos que tiveram suas glândulas pituitárias removidas quase não ganharam peso quando a eles foi administrado PBS, enquanto que ganho de peso foi observado em cerca de 10,2% e 9,4% no dia 7, nos ratos que tiveram suas glândulas pituitárias removidas, aos quais se administrou hormônio de crescimento humano e a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], respectivamente. Portanto, constatou-se que a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] da presente invenção retém atividade *in vivo* efetiva nos ratos que tiveram suas glândulas pituitárias removidas, como o hormônio de crescimento humano.

2. Atividade *In Vivo* de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (G-CSF), de Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e de Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Trivariante de Antitripsina Alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF]

[0100] Ratos Sprague-Dawley foram usados como animais experimentais e divididos em cinco grupos de cinco cada um. Aos ratos Sprague-Dawley, foi injetada subcutaneamente a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos /

divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF], preparada no Exemplo 5, em doses de 340 μ g/Kg e 1.700 μ g/Kg. A outros grupos de ratos, foram injetadas subcutaneamente a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF], preparada no Exemplo 6, e o fator estimulante de colônias de granulócitos Filgrastim (Gracin, Jeil Pharmaceutical Co. Ltd., Coréia), em doses de 1.700 μ g/Kg e 100 μ g/Kg, respectivamente. Amostras de sangue foram tiradas da cauda nos 3 dias antes do experimento e nos dias 1, 2, 3, 4 e 5 depois da injeção e os leucócitos foram contados usando analisador de hematologia (Pentra 120).

[0101] Os resultados de análise da atividade *in vivo* (mudanças no nível de leucócitos) da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] são dados na FIG. 6.

[0102] Como visto na FIG. 6, a contagem de leucócitos foi observada a atingir o nível de pico no Dia 1 e, então, a diminuir para a linha de base a partir do Dia 2, no grupo ao qual se administrou o fator estimulante de colônias de granulócitos Filgrastim, e nível de pico no Dia 2 e, então, diminuição a partir do Dia 3, no grupo ao qual se administrou a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF], em uma dose de 340 μ g/Kg. Nos grupos aos quais se administrou respectivamente a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] em uma dose de 1.700 μ g/Kg, a contagem de leucócitos permaneceu elevada até o Dia 3 e começou a diminuir no Dia 4. Portanto, constatou-se que a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1

[T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] prolongam a atividade *in vivo* em face do fator estimulante de colônias de granulócitos.

3. Atividade *In Vivo* de Exendina-4 e de Fusão de Exendina-4 / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)]

[0103] Para examinar a atividade *in vivo* da fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] da presente invenção, foram conduzidos um teste de tolerância à glicose intraperitoneal e um teste de redução de açúcar no sangue em modelo de camundongo com diabetes, como se segue.

3-1. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal

[0104] Camundongos C57BL/6 de oito semanas de idade foram alimentados, durante quatro semanas com ração de elevado teor em gordura, para neles induzir obesidade. Eles foram privados de alimento a partir de 15 horas antes de um teste de tolerância à glicose intraperitoneal. Nesse contexto, a fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT (P357N)], preparada no Exemplo 7, e exendina-4 foram injetadas intraperitonealmente uma vez em uma dose de 10 nmol/Kg nos grupos de camundongos respectivos, 30 min, 12 e 24 horas depois do quê a glicose foi injetada intraperitonealmente em uma dose de 1,5 g / 5 mL / Kg nos camundongos. Os níveis de açúcar no sangue dos camundongos foram medidos usando um glicosímetro (Allmedicus, Coréia) 0, 10, 20, 30, 60, 90, e 120 min depois da injeção de glicose.

[0105] Os resultados do teste de tolerância à glicose intraperitoneal, com a fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)], são mostrados na FIG. 7.

[0106] Como visto na FIG. 7, o grupo ao qual se administrou a fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] manteve baixos níveis de glicose durante um período de tempo mais longo do que o fez o grupo ao qual se administrou exendina-4.

3-2. Redução de açúcar no sangue em modelo de camundongo com diabetes

[0107] Os camundongos *db/db*, com 9 semanas de idade, foram usados como

animais experimentais e divididos em três grupos de seis. Enquanto eram deixados livremente se aproximarem da ração, os camundongos *db/db* foram injetados subcutaneamente com a fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)], preparada no Exemplo 7, ou com exendina-4 em uma dose de 100 nmol/Kg, 0, 1, 3, 6, 24, 43, 48 e 52 horas, depois do quê as concentrações de açúcar no sangue foram medidas usando um glicosímetro (Allmedicus, Coréia).

[0108] O efeito da fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] sobre o modelo de camundongo com diabetes é mostrado na FIG. 8.

[0109] Como visto na FIG. 8, a partir do tempo de 24 horas depois da injeção, o grupo ao qual se administrou exendina-4 tinha níveis de açúcar no sangue similares àqueles do controle, enquanto que o grupo a qual se administrou a fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1 [T304: Exendin-4/ α 1AT(P357N)] manteve níveis de açúcar no sangue mais baixos, demonstrando a atividade prolongada da proteína de fusão.

EXEMPLO DE TESTE 4: Atividade *In Vitro* das Proteínas e dos Peptídeos de Fusão

[0110] Para examinar a atividade *in vitro* das proteínas e dos peptídeos de fusão da presente invenção, os seguintes experimentos foram conduzidos.

1. Atividade *in vitro* de Hormônio de Crescimento Humano (hGH), Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Antitripsina Alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Monovariante de Antitripsina Alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], Fusão de Hormônio de Crescimento Humano / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH]

[0111] A linhagem de células de linfoma de rato (célula NB2) foi mantida em RPMI1640 suplementado com HS à 10% (soro de cavalo), FBS à 10%, 2-mercapto-etanol e antibióticos à 37°C, sob uma condição de CO₂ à 5%. Durante 24 horas antes do experimento, células NB2 foram incubadas em RPMI 1640 suplementado com HS à 10%. Depois disso, as células NB2 foram lavadas uma vez com 1 x DPBS

(Salina Tamponada com Fosfato de Dulbecco), e plaqueadas em uma densidade de 2×10^4 células / 100 μL / cavidade, em RPMI 1640 suplementado com HS à 5%, em placas de 96 cavidades (Corning, EUA), com volume final de 100 μL . Uma série de concentrações das amostras foram adicionadas em uma quantidade de 20 μL a cada cavidade das placas de 96 cavidades, seguido por incubação à 37°C durante 48 horas, sob uma condição de CO_2 à 5%. Subsequentemente, 20 μL de uma solução de MTS (Promega, EUA) foram adicionados a cada cavidade da placa de 96 cavidades e deixados reagir à 37°C durante 3 horas, sob uma condição de CO_2 à 5%. A reação foi terminada por adição de 20 μL de SDS à 10% (dodecil-sulfato de sódio) a cada cavidade. A absorbância foi medida à 490 nm usando uma leitora de placas VersaMax (Molecular Device, EUA). Valores de EC_{50} (concentração 50% efetiva) das drogas, isto é, as concentrações, nas quais 50% das células sobrevivem, foram determinados com base na absorbância medida usando o método com MTS.

[0112] Os resultados da análise da atividade in vitro da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: $\alpha 1\text{AT/hGH}$], da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: $\alpha 1\text{AT(P357N)/hGH}$], e da fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: $\alpha 1\text{AT(P357N, S359T)/hGH}$] estão resumidas na Tabela 1 e retratadas na FIG. 9.

TABELA 1

Amostra	$\text{EC}_{50}(\text{pM})$
T109wt	211,8
T109	181,1
T109T	217,1

[0113] Conforme é evidente a partir dos dados da Tabela 1 e da FIG. 9, a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: $\alpha 1\text{AT/hGH}$], a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109:

α 1AT(P357N)/hGH], e a fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH] não eram significativamente diferentes quanto aos valores de EC_{50} . Portanto, a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], e a fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH] mostraram atividades *in vivo* relativamente constantes (EC_{50}), independentemente da mutação de aminoácido de antitripsina alfa-1.

2. Atividade *In Vitro* de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (G-CSF), de Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Divariante de Antitripsina Alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e de Fusão de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos / Trivariante de Antitripsina Alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF]

[0114] Células NFS-60 mieloblásticas murinas foram incubadas em RPMI 1640 suplementado com PBS à 10%, IL-3 de camundongo e antibióticos à 37°C, sob uma condição de CO_2 à 5%. A absorbância das células foi medida à 490 nm da mesma maneira que no Exemplo de Teste 4-1. Os valores de EC_{50} (concentração 50% efetiva) das drogas, isto é, as concentrações, nas quais 50% das células sobrevivem, foram determinados com base na absorbância medida usando o método com MTS.

[0115] Os resultados da análise da atividade *in vitro* da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e da fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] são dados na Tabela 2 a na FIG. 10.

TABELA 2

Amostra	EC_{50} (pM)
T602S	78,1

T602ST	97,6
--------	------

[0116] Conforme é evidente a partir dos dados da Tabela 2 e da FIG. 10, a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] não eram significativamente diferentes quanto aos valores de EC_{50} . Portanto, a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1 [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] e a fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1 [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] mostraram atividades *in vitro* relativamente constantes (EC_{50}), independentemente da mutação de aminoácido de antitripsina alfa-1.

EXEMPLO DE TESTE 5: Ensaio para Atividade Inibidora das Proteínas e dos Peptídeos de Fusão em Face de Tripsina

[0117] Para examinar a atividade inibidora da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] e da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] em face de tripsina, o seguinte experimento foi conduzido.

[0118] A fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], preparada no Exemplo 1, e a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], preparada no Exemplo 1, foram misturadas separadamente com tripsina. A tripsina e as fusões foram usadas em uma concentração de 10 nM, respectivamente. Depois de ser incubada à temperatura ambiente durante 1 horas, a mistura foi reagida com o substrato cloridrato de N-Benzoil-Val-Gly-Arg p-nitro-anilida 0,2 mM (Sigma, EUA), seguido por medição da absorbância em 405 nm. A unidade de tripsina foi ajustada para ser a concentração de substrato que causa uma mudança de absorbância de 0,001 e a atividade da enzima foi expressa como unidades / mg de tripsina. Para

comparação, tripsina foi usada como um controle.

[0119] Os resultados estão retratados na FIG. 11.

[0120] Como visto na FIG. 11, K_a (constante de equilíbrio de associação) entre tripsina e antitripsina alfa-1 foi calculada como sendo cerca de $7,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ para a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: $\alpha 1\text{AT/hGH}$] e cerca de $8,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: $\alpha 1\text{AT(P357N)/hGH}$]. A fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: $\alpha 1\text{AT/hGH}$] exibiu excelente atividade inibidora contra a tripsina, enquanto que a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: $\alpha 1\text{AT(P357N)/hGH}$] não foi um bom inibidor de tripsina. Portanto, o fato de que a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: $\alpha 1\text{AT/hGH}$] e a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: $\alpha 1\text{AT(P357N)/hGH}$] aumentam a meia-vida *in vivo* por circulação sustentada não é dependente da propriedade inerente de antitripsina alfa-1.

EXEMPLO DE TESTE 6: Ensaio para Atividade Inibidora das Proteínas ou dos Peptídeos de Fusão em Face de Elastase de Neutrófilos Humanos

[0121] Para examinar a atividade inibidora da fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: $\alpha 1\text{AT/hGH}$] e da fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: $\alpha 1\text{AT(P357N)/hGH}$] em face de elastase de neutrófilos humanos, o seguinte experimento foi conduzido.

[0122] A fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: $\alpha 1\text{AT/hGH}$], preparada no Exemplo 1, e a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: $\alpha 1\text{AT(P357N)/hGH}$], preparada no Exemplo 1, foram misturadas separadamente com elastase de neutrófilos humanos. A elastase e as fusões foram usadas em uma concentração de 40 nM, respectivamente. Depois de ser incubada à temperatura ambiente durante

1 horas, a mistura foi reagida com o substrato cloridrato de MeOSuc-AAPV-pNA 1 mM (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA), seguido por medição da absorbância em 405 nm. A unidade de elastase de neutrófilos humanos foi ajustada para ser a concentração de substrato que causa uma mudança de absorbância de 0,001 e a atividade da enzima foi expressa como unidades / mg de elastase.

[0123] Os resultados estão retratados na FIG. 12.

[0124] Como visto na FIG. 12, observou-se que a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] inibiu quase 100% de elastase de neutrófilos humanos, enquanto que a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] tinha uma K_a de cerca de $1,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Portanto, a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] serviu como um excelente inibidor de elastase de neutrófilos humanos, enquanto que a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] tinha baixa atividade inibidora em face de elastase de neutrófilos humanos. Portanto, o fato de que a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] e a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] aumentam a meia-vida *in vivo* por circulação sustentada não é dependente da propriedade inerente de antitripsina alfa-1.

EXEMPLO DE TESTE 7: Ensaio de Eletroforese das Proteínas e dos Peptídeos de Fusão

[0125] Para examinar a mudança de peso molecular de acordo com a adição de sítio de glicosilação, a fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH], a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] e a fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH] foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

[0126] Os resultados estão retratados na FIG. 13.

[0127] Como visto na FIG. 13, a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH], em que um sítio de glicosilação adicional (Asn-X-Ser) foi mostrado, uma banda tingida por proteína migrou na posição de peso molecular mais elevado, quando comparada à fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 [T109wt: α 1AT/hGH] nativa, em que nenhum sítio de glicosilação adicional foi gerado. Em relação à fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH], ela apresenta glicosilação adicional mais extensa na posição 357 (Asn-X-Ser) e seu peso molecular aumentado foi ainda mais evidente. Portanto, a fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1 [T109: α 1AT(P357N)/hGH] e a fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH] tiveram pesos moleculares aumentados devido à adição de um sítio de glicosilação a elas.

Aplicabilidade Industrial

[0128] Estando em formas de circulação sustentada, as proteínas e os peptídeo de fusão da presente invenção aumentam, de maneira significativa, a meia-vida no soro ($T_{1/2}$) e exibem excelente estabilidade *in vivo*, quando comparados às próprias proteínas e aos próprios peptídeos fisiologicamente ativos. Portanto, as proteínas e os peptídeos de fusão da presente invenção podem ser aplicados ao desenvolvimento das formas de dosagem de circulação sustentada das drogas de proteína ou de peptídeo.

Reivindicações

1. Proteína ou peptídeo de fusão, compreendendo uma proteína ou peptídeo fisiologicamente ativo fundido a uma variante de alfa-1 antitripsina tendo pelo menos um resíduo de aminoácido mutado, **caracterizado por** a proteína ou peptídeo fisiologicamente ativo possuir uma meia-vida *in vivo* aumentada por manutenção em uma circulação sustentada, e a variante de alfa-1 antitripsina ter uma atividade inibidora de protease reduzida, e com a referida variante de alfa-1 antitripsina sendo selecionada a partir do grupo que consiste em uma monovariante de alfa-1 antitripsina [α 1AT(P357N)] consistindo em SEQ ID NO: 28, uma divariante de alfa-1 antitripsina [α 1AT(P357N, S359T)] consistindo em SEQ ID NO: 29, uma divariante de alfa-1 antitripsina [α 1AT(P357N, C232S)] consistindo em SEQ ID NO: 30, ou uma trivariante de alfa-1 antitripsina [α 1AT(P357N, C232S, S359T)] consistindo em SEQ ID NO: 31.

2. Proteína ou peptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a proteína ou peptídeo fisiologicamente ativo ser fundido, diretamente ou através de um ligador, consistindo em aminoácidos, à variante de alfa-1 antitripsina tendo pelo menos um resíduo de aminoácido mutado.

3. Proteína ou peptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a proteína fisiologicamente ativa ser selecionada a partir do grupo que consiste em hormônios e seus receptores, modificadores da resposta biológica e seus receptores, citocinas e seus receptores, enzimas, anticorpos, e fragmentos de anticorpos.

4. Proteína ou peptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** a proteína fisiologicamente ativa ser selecionada a partir do grupo que consiste em hormônio de crescimento humano (hGH), insulina, hormônio folículo-estimulante (FSH), gonadotrofina coriônica humana, hormônio da paratireóide (PTH), eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF), interferon-alfa, interferon-beta, interferon-gama,

interleucinas, fator ativante de macrófagos, fator de necrose de tumor, ativador de plasminogênio de tecido, fator de coagulação VII, VIIa, VIII e IX, proteína 2 morfogênica de ossos humanos (hBMP2), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), glucocerebrosidase, α -galactosidase A, α -L-iduronidase, iduronato-2-sulfatase, lactase, adenosina deaminase, butiril-colinesterase, quitinase, glutamato descarboxilase, imiglucerase, lipase, uricase, acetil-hidrolase de fator ativante de plaquetas, endopeptidase neutra, uroquinase, estreptoquinase, mieloperoxidase, superóxido dismutase, toxina botulínica, collagenase, hialuronidase, L-asparaginase, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ e Fd, e uma combinação das mesmas.

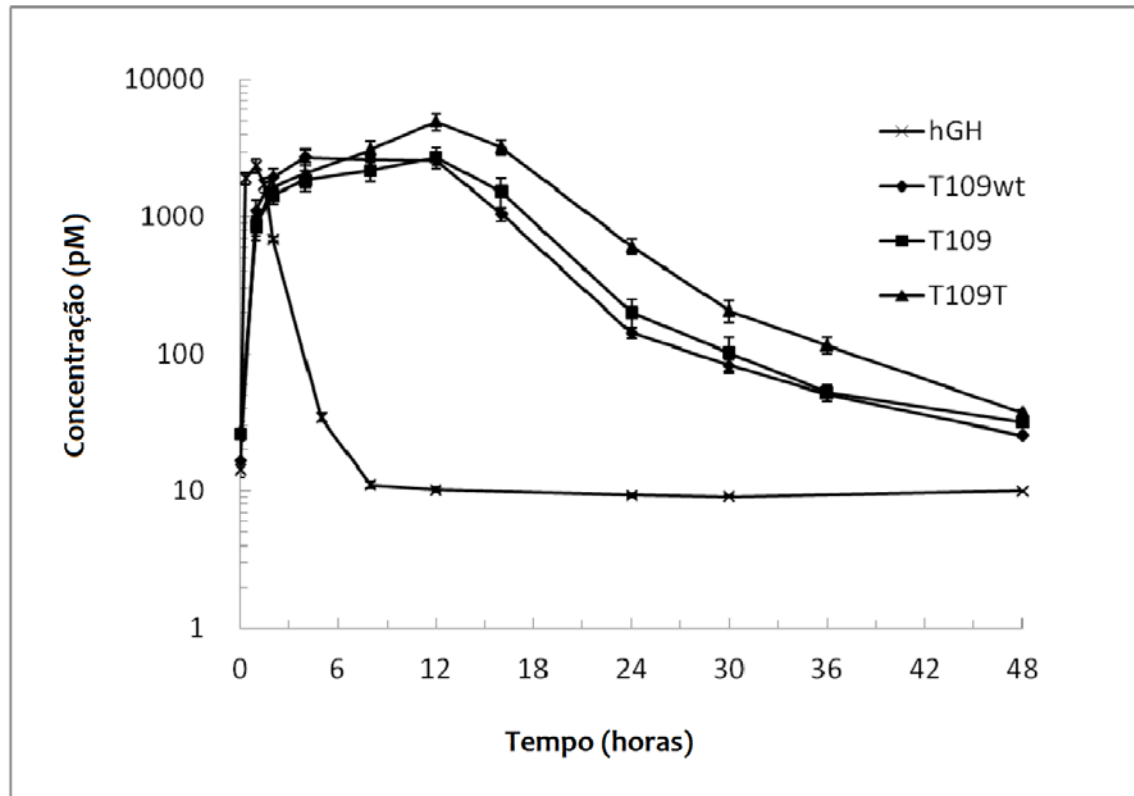
5. Proteína ou peptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o peptídeo fisiologicamente ativo ser selecionado a partir do grupo que consiste em peptídeo-1 similar a glucagon (GLP-1) e seus análogos, exendina e seus análogos, somatostatina e seus análogos, agonista e antagonista de hormônio de liberação de hormônio luteinizante (LHRH), hormônio adrenocorticotrópico, hormônio de liberação de hormônio de crescimento, oxitocina, timosina alfa-1, fator de liberação de corticotropina, calcitonina, bivalirudina, análogos de vasopressina, fragmentos de peptídeos fisiologicamente ativos, e uma combinação dos mesmos.

6. Proteína ou peptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** serem selecionados do grupo que consiste em uma fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de alfa-1 antitripsina [T109: α 1AT(P357N)/hGH] consistindo em SEQ ID NO: 2, uma fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de alfa-1 antitripsina [T109T: α 1AT(P357N, S359T)/hGH] consistindo em SEQ ID NO: 3, uma fusão de interferon alfa humano / monovariante de alfa-1 antitripsina [T502: α 1AT(P357N)/IFN- α] consistindo em SEQ ID NO: 4, uma fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de alfa-1 antitripsina [T602S: α 1AT(P357N, C232S)/G-CSF] consistindo

em SEQ ID NO: 5, uma fusão de fator estimulador de colônias de granulócitos / trivariante de alfa-1 antitripsina [T602ST: α 1AT(P357N, C232S, S359T)/G-CSF] consistindo em SEQ ID NO: 6, e uma fusão de exendina-4 / monovariante de alfa-1 antitripsina [T304: Exendina-4/ α 1AT(P357N)] consistindo em SEQ ID NO: 7.

7. Método para aumentar a meia-vida *in vivo* de uma proteína ou peptídeo, **caracterizado por** compreender a conjugação da proteína ou peptídeo fisiologicamente ativo com uma variante de alfa-1 antitripsina conforme definida na reivindicação 1, e por meio disto o conjugado apresentar um comportamento de circulação sustentada *in vivo*.

[Fig.1]



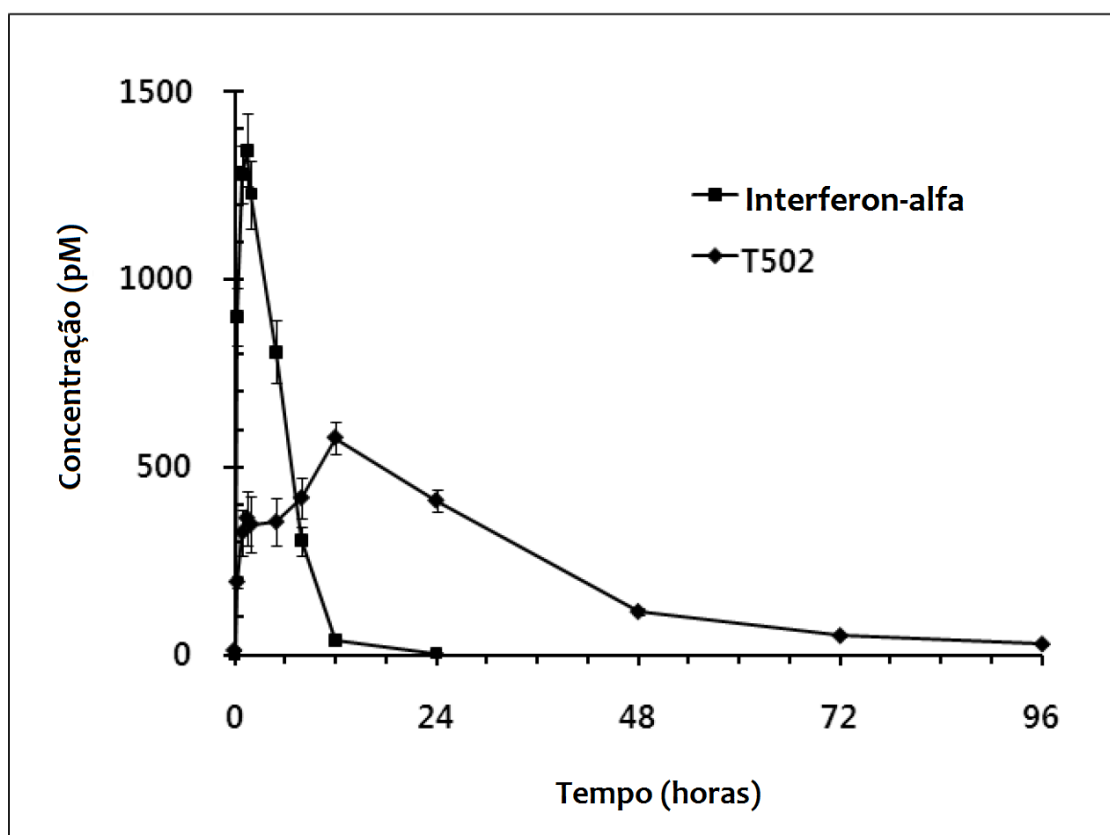
hGH : hormônio de crescimento humano

T109wt : fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1

T109 : fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1

T109T : fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1

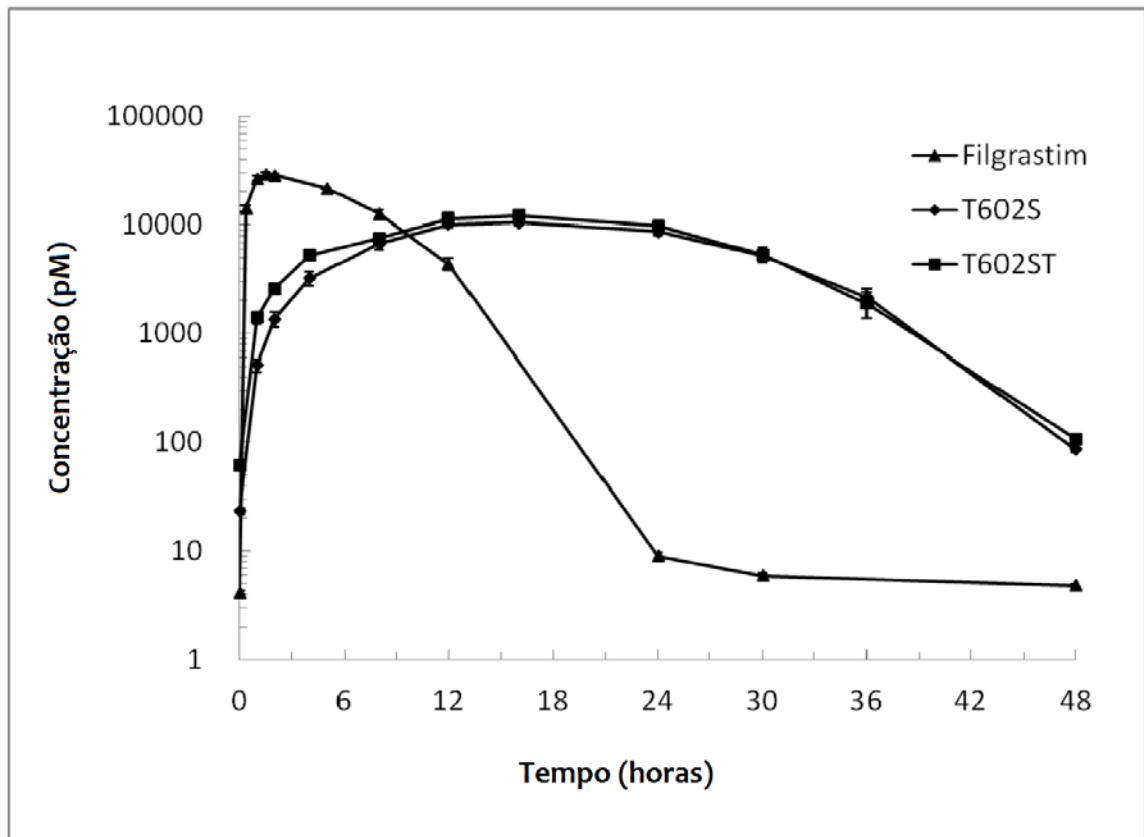
[Fig.2]



IFN- α : interferon-alfa humano

T502 : fusão de interferon-alfa humano / monovariante de antitripsina alfa-1

[Fig.3]

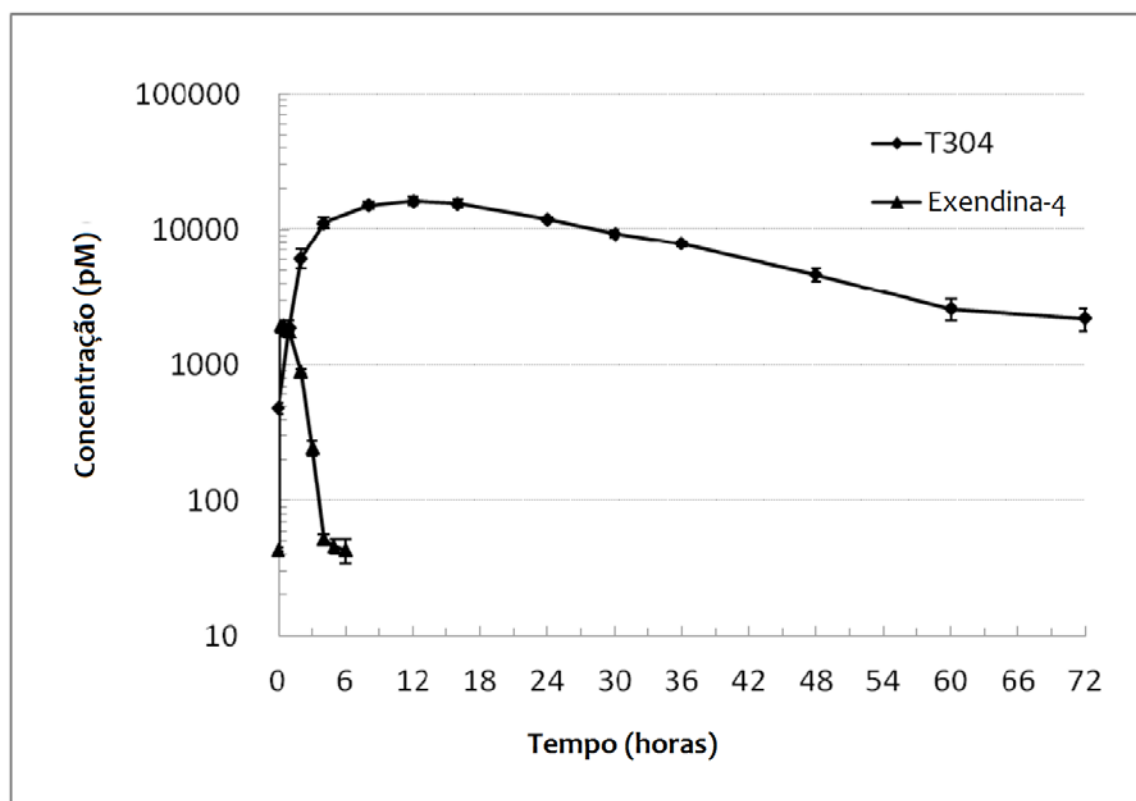


Filgrastim : G-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos)

T602S : fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina
alfa-1

T602ST : fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de
antitripsina alfa-1

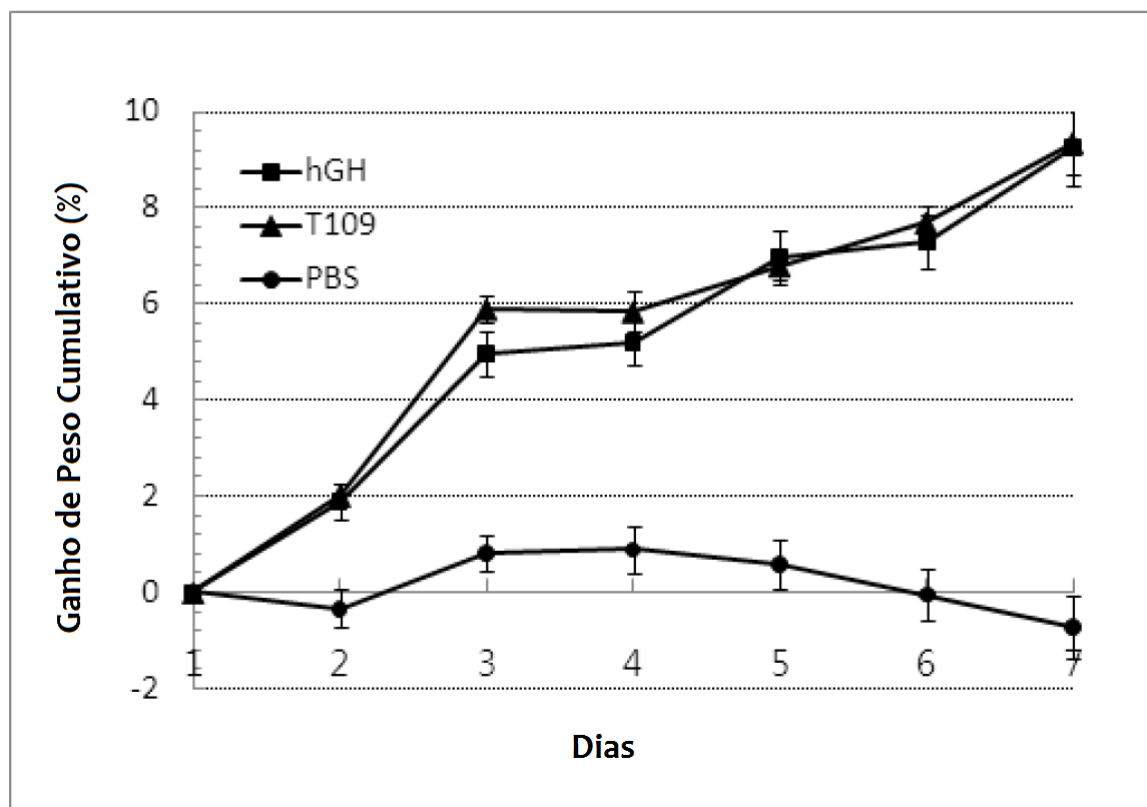
[Fig.4]



Exendina-4 : exendina-4

T304 : fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1

[Fig.5]

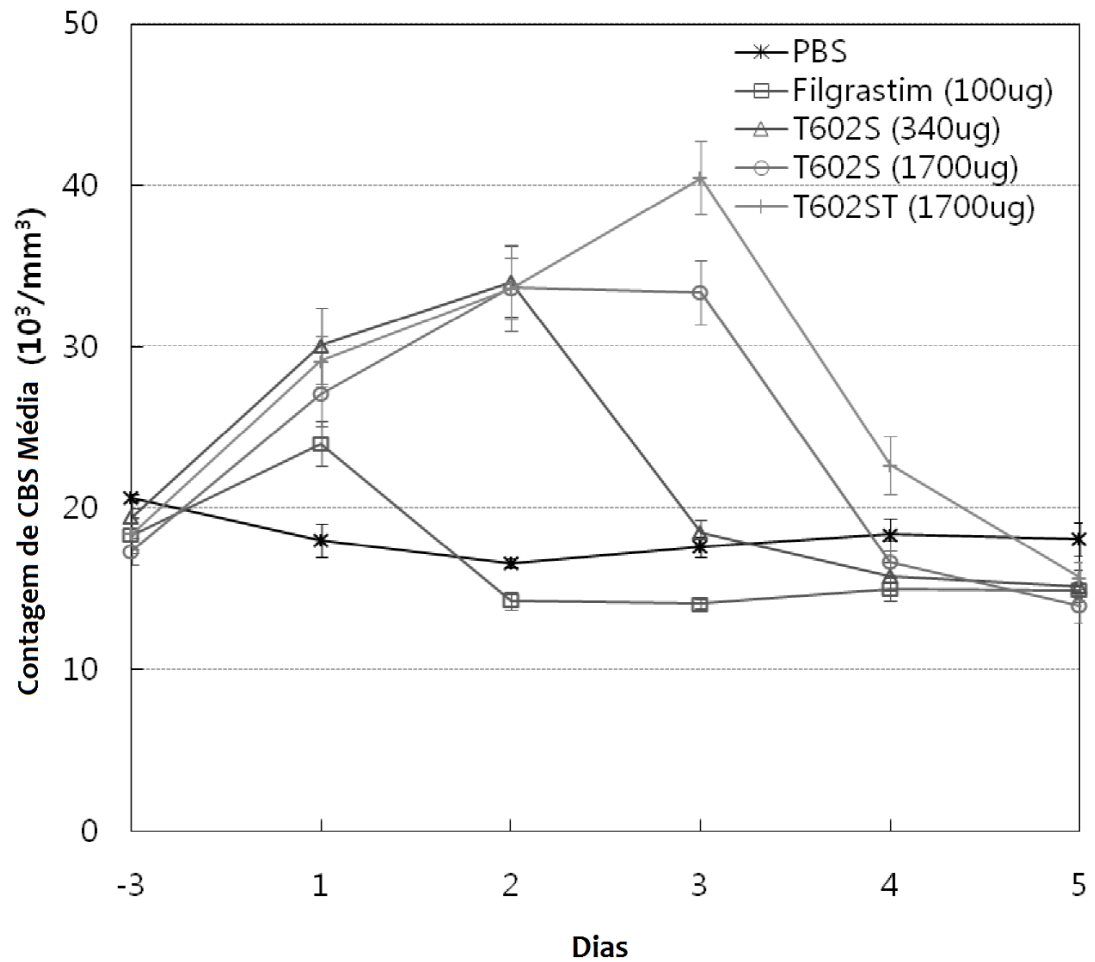


hGH : hormônio de crescimento humano

T109 : fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1

PBS : salina tamponada com fosfato

[Fig.6]

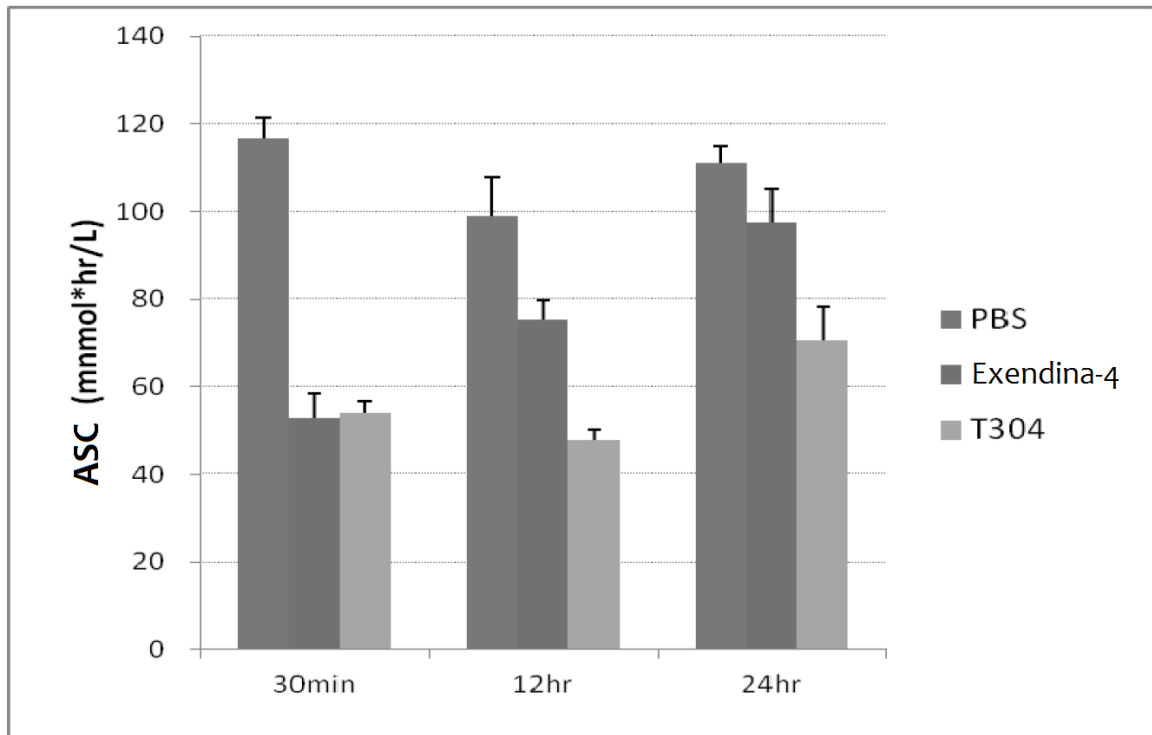


Filgrastim : fator estimulante de colônias de granulócitos

T602S : fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina
alfa-1

T602ST : fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de
antitripsina alfa-1

[Fig.7]

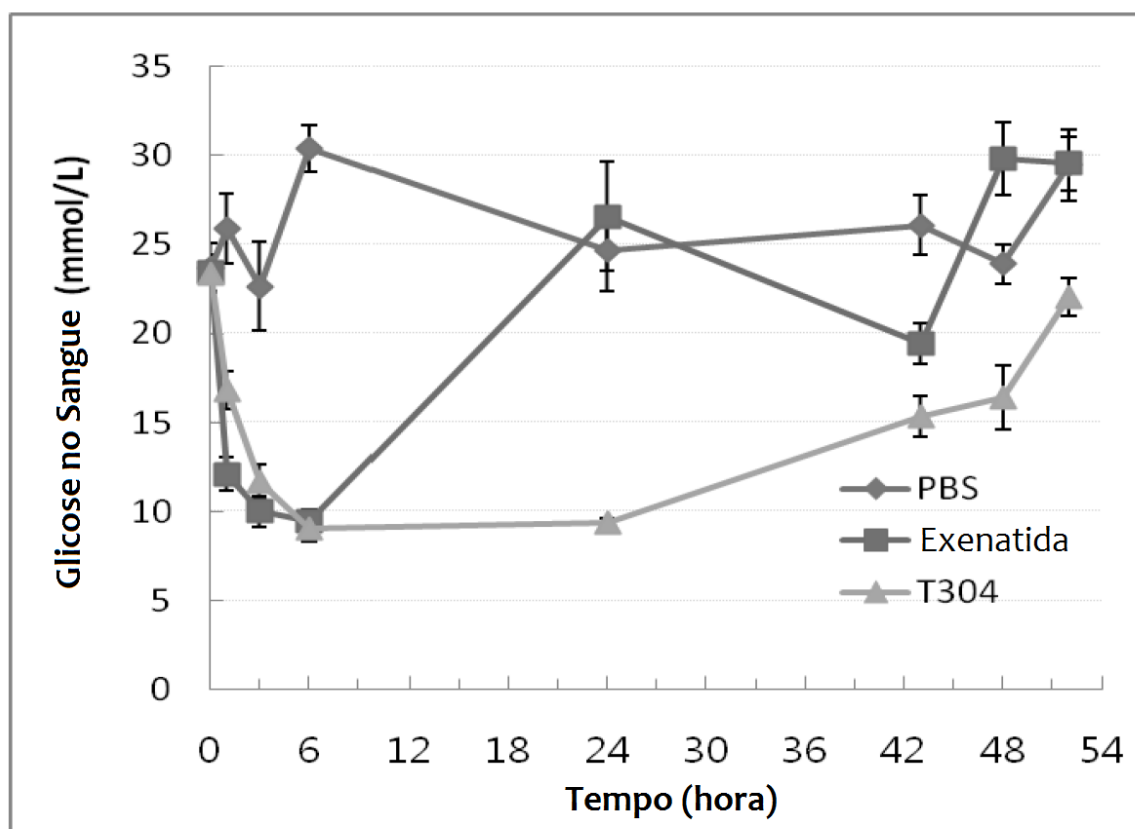


PBS : salina tamponada com fosfato

Exendina-4 : exendina-4

T304 : fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1

[Fig.8]

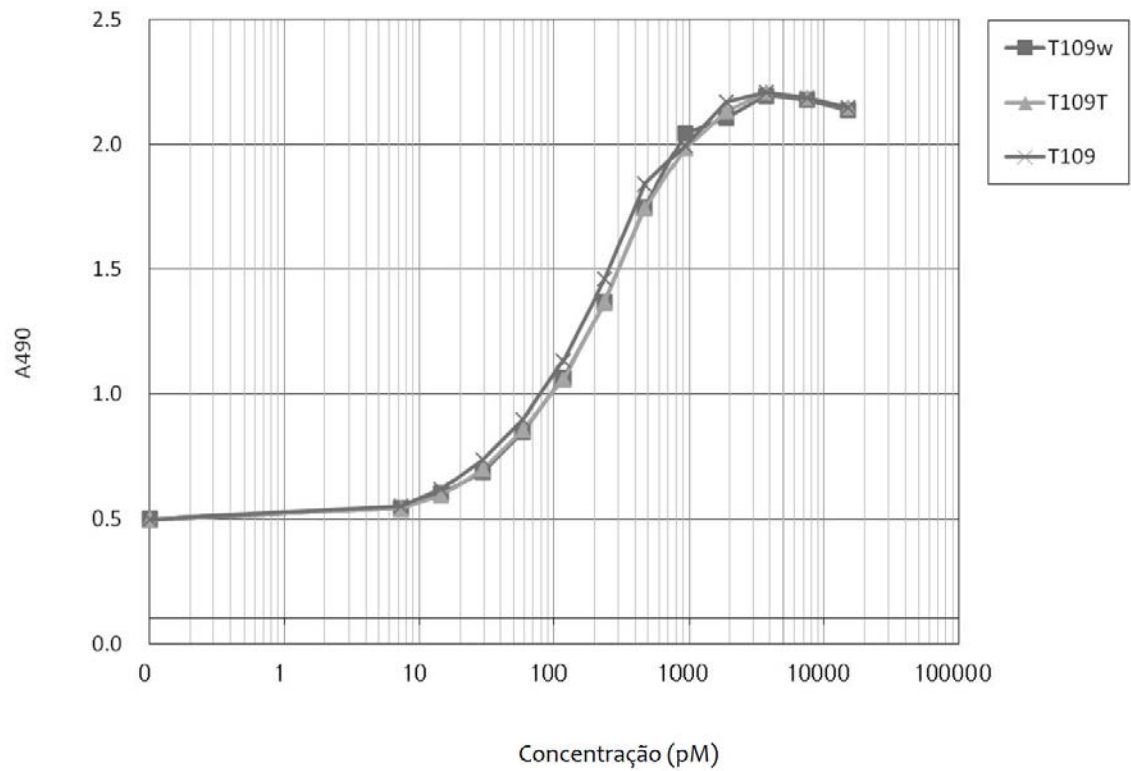


PBS : salina tamponada com fosfato

Exenatida : exendina-4

T304 : fusão de exendina-4 / monovariante de antitripsina alfa-1

[Fig.9]

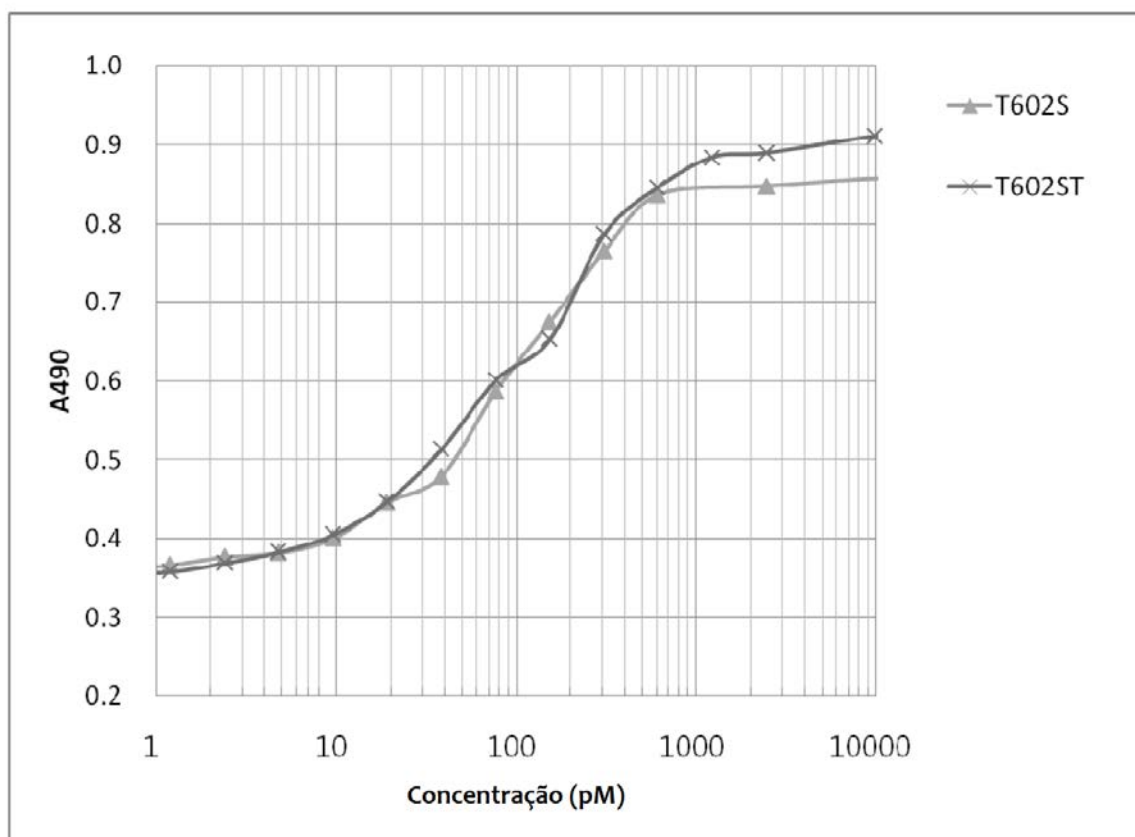


T109wt : fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1

T109 : fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1

T109T : fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1

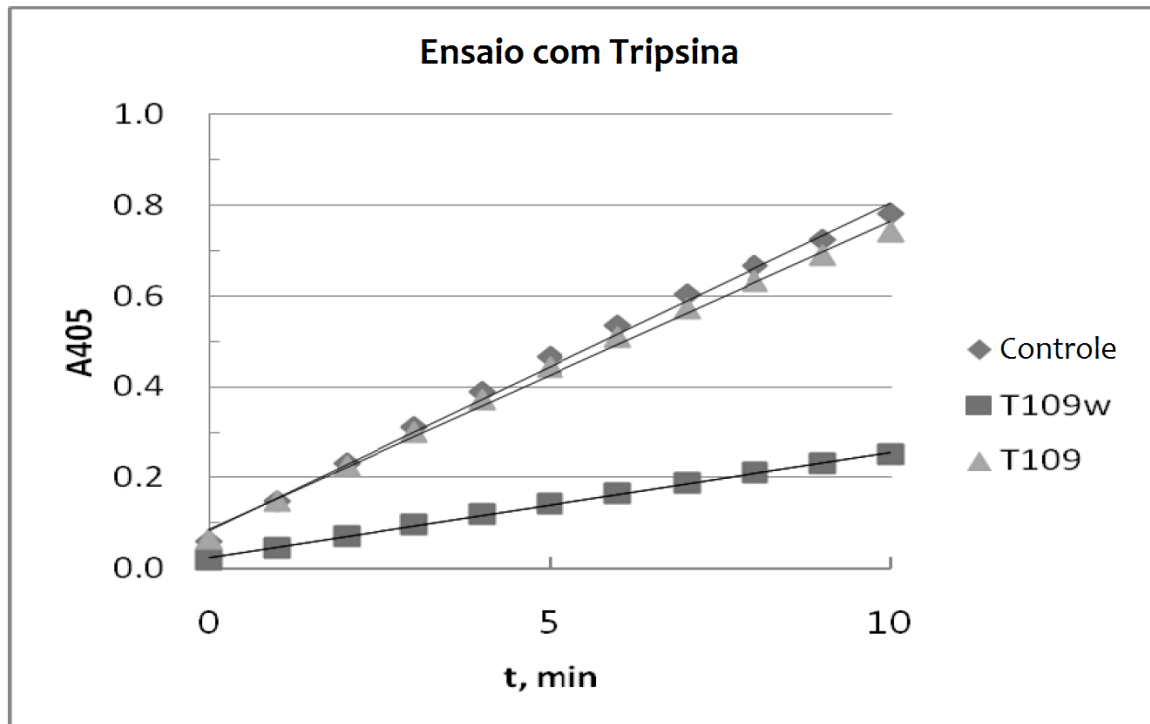
[Fig.10]



T602S : fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / divariante de antitripsina alfa-1

T602ST : fusão de fator estimulante de colônias de granulócitos / trivariante de antitripsina alfa-1

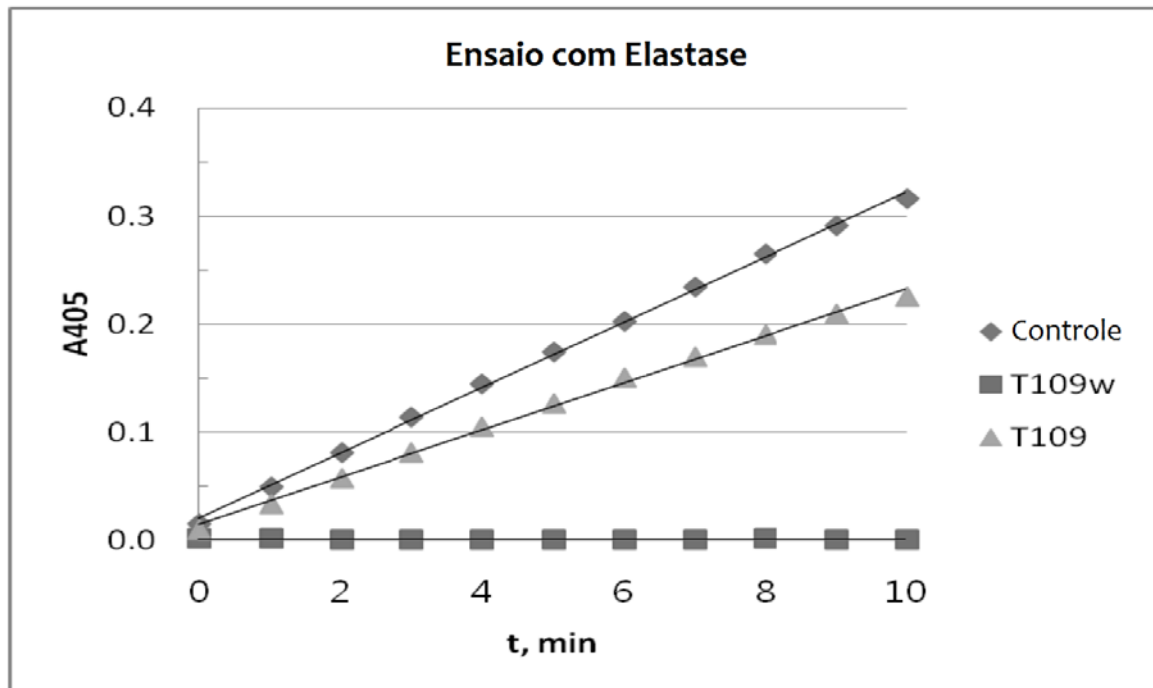
[Fig.11]



T109wt : fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1

T109 : fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1

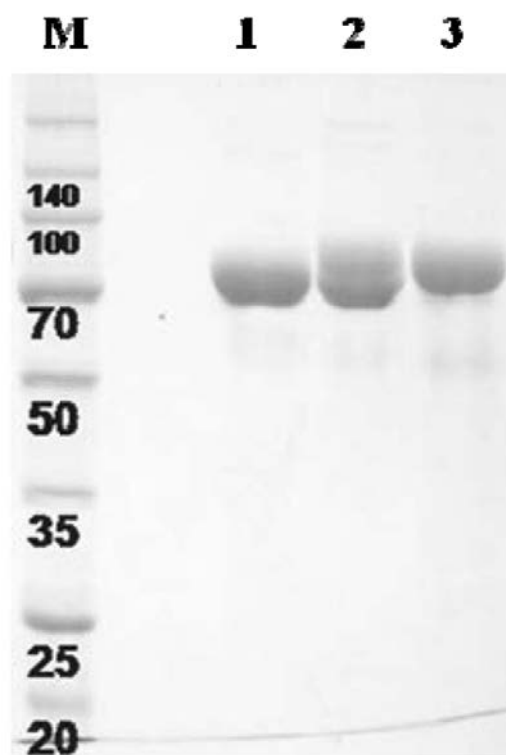
[Fig.12]



T109wt : fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1

T109 : fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1

[Fig.13]



M : marcador de peso molecular

1 : fusão de hormônio de crescimento humano / antitripsina alfa-1 (T109wt)

2 : fusão de hormônio de crescimento humano / monovariante de antitripsina alfa-1
(T109)

3 : fusão de hormônio de crescimento humano / divariante de antitripsina alfa-1 (T109T)