



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

(21) **PI 0714297-8 A2**

(22) Data de Depósito: 05/07/2007
(43) Data da Publicação: 26/02/2013
(RPI 2199)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/62
C12P 21/02

(54) **Título:** PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DE INSULINA COM CADEIA B-TERMINAL DIBÁSICA

(30) **Prioridade Unionista:** 11/07/2006 DE 10 2006 031 955.9

(73) **Titular(es):** Sanofi-Aventis Deutschland GMBH

(72) **Inventor(es):** Frank Zocher, Paul Habermann

(74) **Procurador(es):** Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007005933 de 05/07/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/006497de 17/01/2008

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DE INSULINA COM CADEIA B-TERMINAL DIBÁSICA. A presente invenção refere-se a um processo de produção de um tipo de insulina cujo precursor é geneticamente engendrado e, convertendo o dito precursor à respectiva insulina através da reação de ligação catalisada por enzima com lisinamida ou arginamida, ou por usina ou arginina, a qual é modificada por grupos de proteção, e opcionalmente por hidrólise subsequente.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DE INSULINA COM CADEIA B-TERMINAL DIBÁSICA**".

Descrição

5 A presente invenção refere-se a um processo para preparação de uma insulina com extremidade de cadeia dibásica através de preparação biotecnológica de um seu precursor e subsequente conversão em uma reação de ligação catalisada com enzima com lisinamida ou argininamida, ou lisina ou arginina modificada por grupos protetores, e opcionalmente subsequente hidrólise, para render esta insulina.

10 Cerca de 177 milhões de pessoas ao redor do mundo sofrem de diabetes mellitus. Estas incluem cerca de 17 milhões de diabéticos tipo I para os quais reposição da secreção de insulina endócrina em falta é a única terapia possível no presente. Aqueles afetados são dependentes de injeções

15 de insulina, usualmente várias vezes por dia, por toda vida. Diabetes tipo II contrasta com diabetes tipo I em que não há sempre uma deficiência de insulina, mas em um grande número de casos, especialmente no estágio avançado, tratamento com insulina, onde apropriado combinado com um anti-diabético oral, é visto como o tipo de terapia mais favorável.

20 Em pessoas saudáveis, liberação de insulina é estritamente acoplada à concentração de glicose no sangue. Elevados níveis de glicose no sangue como aqueles ocorrendo após refeições são rapidamente compensados por um correspondente aumento em secreção de insulina. No estado de jejum, o nível de insulina em plasma cai para um valor de linha base que

25 é suficiente para assegurar um suprimento contínuo de glicose para órgãos e tecidos sensíveis a insulina e para manter baixa produção de glicose hepática durante a noite. Substituição da secreção de insulina endógena através de administração usualmente subcutânea, exógena de insulina usualmente não se aproxima da qualidade da regulação fisiológica de glicose no sangue

30 descrita acima. Rearranjos ascendentes ou descendentes do nível de glicose no sangue são frequentes e podem, em suas formas mais severas, ser ameaçadores de vida. Entretanto, em adição, elevados níveis de glicose no

sangue permanecendo por anos representam, mesmo sem sintomas iniciais, um considerável risco para a saúde. O estudo DCCT em grande escala nos USA (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993)N. Engl. J. Méd. 329, 977-986) provou sem ambigüidades que níveis

5 de glicose cronicamente elevados no sangue são substancialmente responsáveis pelo desenvolvimento de posteriores complicações diabéticas. Posteriores complicações diabéticas e dano micro e macrovascular que em algumas circunstâncias torna-se manifesto como retinopatia, nefropatia ou neuropatia e conduz a cegueira, insuficiência renal e perda de extremidades e,

10 em adição, é associada a um aumentado risco de distúrbios cardiovasculares. É para ser inferior do mesmo que uma aperfeiçoada terapia de diabetes tem de alvejar primariamente a manutenção de glicose no sangue tão próxima quanto possível dentro de faixa fisiológica. A política de terapia de insulina intensiva pretende obter isto através de injeções várias vezes ao dia de

15 preparações de insulina de atuação rápida e lenta. Formulações de atuação rápida são dadas em momentos de refeição de modo a compensar a elevação pós-prandial em glicose no sangue. Insulinas basais de atuação lenta são pretendidas para assegurar um suprimento básico de insulina especialmente durante a noite sem conduzir a hipoglicemia.

20 Insulina é um polipeptídeo composto por 51 aminoácidos divididos em 2 cadeias de aminoácidos: a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos. As cadeias são ligadas por 2 pontes dissulfeto. Preparações de insulina foram empregadas por muitos anos para a terapia de diabetes. Além disso, não somente insulinas ocorrendo naturalmente são

25 usadas, mas mais recentemente também derivados e análogos de insulina.

Análogos de insulina são análogos de insulinas ocorrendo naturalmente, por exemplo insulina humana ou insulinas animais que diferem por substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido ocorrendo naturalmente por outros resíduos de aminoácidos e/ou adição/supressão de pelo

30 menos um resíduo de aminoácido da correspondente, de outro modo idêntica, insulina ocorrendo naturalmente. A patente US 5 656 722, por exemplo, descreve derivados de des-Phe^(B1)-insulina. Os resíduos de aminoácidos que

foram adicionados e/ou substituídos também podem ser uns que não ocorrem naturalmente.

Derivados de insulina são derivados de insulinas ocorrendo naturalmente ou análogos de insulina nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos e/ou os termini N ou C da cadeia A e/ou B são substituídos com grupos funcionais. Os grupos funcionais são selecionados de um grupo compreendendo resíduos amida, resíduos amina, resíduos carboxila, resíduos alquila, resíduos álcool e resíduos alcoxi.

Uma eficiente terapia de insulina faz uso das assim chamadas insulinas basais. Por estas são pretendidas formulações que tornam possível a liberação contínua, lenta, de insulina administrada exogenamente. Deste modo, a concentração de insulina de linha base no corpo que tem efeitos vantajosos sobre a condição fisiológica da pessoa sofrendo de diabetes é obtida sobre um maior período de tempo.

O análogo de insulina recombinante insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32) (insulina Glargina) é neste sentido notável por precisar ser suprida para o corpo somente cada 24 horas – isto é, somente uma vez por dia – de modo a obter um efeito basal. A administração uma vez por dia conduz a uma aperfeiçoada qualidade de vida. A fisiologia aperfeiçoada conduz, por exemplo, a uma redução no nível de Hba1c e pode ser esperado que, devido a este aperfeiçoamento, as sequelas posteriores de diabetes aparecerão – se assim for – consideravelmente mais tarde, tornando assim possível prolongar a expectativa de vida do diabético relevante.

A demanda por análogo de insulina é correspondentemente alta. Uma vez que o número de diabéticos está crescendo continuamente, é além disso de interesse econômico minimizar os custos para preparação de correspondentes análogos. US 5 656 722 descreve a possível preparação de análogos de insulina através de uma proteína de fusão pré-pró-insulina que consiste em uma porção de fusão ("porção pré") e de uma variante pró-insulina de macaco. Um dos análogos descritos compreende glicina ao invés de asparagina em posição A(21). A correspondente proteína de fusão é uma variante precursora de peptídeo para preparação de insulina glargina. O pro-

cesso provê supressão da porção pré e o peptídeo C desta proteína de fusão através de reação com tripsina. EP-A 0 668 292 descreve uma proteína de fusão que segue o mesmo princípio mas permite que glargina insulina seja preparada através de um processo que é um aperfeiçoamento sobre US 5 656 722. É claro para aqueles versados nesta técnica que uma clivagem parcial é possível em particular nos limites da cadeia B e cadeia C de insulina, que é definido pela estrutura dibásica Arg-Arg, e conduz a um análogo de insulina humana mono-arg B31. Este produto defeituoso tem de ser removido do real produto de interesse. Isto conduz a um acentuado prejuízo no rendimento. O problema pode ser evitado através de preparação recombinante de pró-insulinas e sua reação com uma específica endoprotease tal como, por exemplo, lisil endopeptidase, e reagindo a resultante insulina humana dês-B30 (análogo) em uma abordagem de química de peptídeo semissintética com o tripeptídeo Thr-Arg-Arg. EP-A 0 132 769 e WO 2003/044210 descrevem a necessidade de proteger os grupos reativos do tripeptídeo durante a reação. Os grupos protetores são eliminados subsequente à reação. Esta rota está associada a custos crescentes a partir da preparação do tripeptídeo através de síntese química e a introdução de grupos protetores. Assim, pode ser desejável ter um processo permitindo análogos de insulina Arg(B31), Arg(B32) serem preparados a partir de precursor de insulina humana Arg(B31).

O pedido de patente DE 10 2005 046 113.1 (não publicado) descreve um processo incluindo a ligação catalisada com tripsina de aminoácidos que têm amidação C-terminal a peptídeos cujo aminoácido C-terminal consiste em lisina ou arginina. Os rendimentos observados neste caso são surpreendentemente altos e além disso é possível realizar a reação de acoplamento sem mascaramento com grupos protetores. A reação ocorre em um meio não-aquoso. Foi agora surpreendentemente verificado que o acoplamento de arginina amida ou lisina amida a análogos de insulina B31 é possível com altos rendimentos. Além disso é surpreendentemente possível controlar a reação de modo que haja preferencial formação de análogos de insulina da forma insulina amida humana Arg(B31), Arg(B32) ou da forma

insulina amida humana Arg(B31), Lys(B32). O rendimento é além disso maior que 60%. O grupo amida pode ser eliminado através de hidrólise ácida no fim da reação. Da mesma maneira foi surpreendentemente verificado que é possível como alternativa para lisinamida ou argininamida empregar na reação arginina ou lisina possivelmente tendo um grupo protetor. Grupos protetores que podem ser mencionados como exemplos são t-butiloxicarbonila (Boc) ou dimetoxifenilpropiloxicarbonila (DZZ). Uma vez que existem descrições na literatura que em particular derivados de arginina protegidos podem ser instáveis em vários solventes, é claro para aqueles versados na técnica que existe contínuo desenvolvimento de novos grupos protetores que têm o efeito de aperfeiçoada estabilidade em química de peptídeo. Uma influência positiva sobre o rendimento é possível através de variação de condições de reação de acordo com os grupos protetores ou grupo amida. Isto é familiar para aqueles versados na técnica e a invenção também se refere-se a isto.

O produto de clivagem parcial de insulina humana B(31), na preparação de glargina insulina ou comparáveis análogos de insulina Arg(B31), Arg(B32) a partir de precursores de pré-pró-insulina (US 5 656 722) assim torna-se disponível para preparação de produto de valor. Correspondentes proteínas de fusão não precisam neste caso ser preparadas intracelularmente. É claro para aqueles versados na técnica que análogos pró-insulina também podem ser preparados através de expressão bacteriana com subsequente secreção no periplasma e/ou no sobrenadante de cultura. O pedido de patente EP-A 1 364 029 descreve isto a título de exemplo. A invenção também refere-se ao uso de precursores de insulina humana Arg(B31) resultantes diretamente após expressão a partir de tais processos bacterianos.

Ainda existe em adição um aspecto técnico do processo, ao qual da mesma maneira a invenção refere-se. O pedido de patente EP-A 0 347 781, e pedidos de patente EP-A 1 364 030 e EP-A 1 364 032, descrevem processos baseados em leveduras para preparação de mini-pró-insulinas com altos rendimentos. Extensão de um tal processo ou um similar à preparação de mini-pró-insulinas que têm os resíduos de aminoácidos descritos na patente US 5 656 722, isto é, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met,

Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp ou Glu, na posição A21 permite estas mini-pró-insulinas serem convertidas nos análogos de insulina Arg(B31), Arg(B32) imediatamente após clivagem na insulina de duas cadeias.

Se a expressão ocorre, como descrito em EP-A 1 364 032, através de uma proteína de fusão, é vantajoso não eliminar a porção pré com tripsina ou endoproteases similares. Ao invés, um sítio de clivagem que é reconhecido por uma específica endoprotease que não cliva o derivado de insulina é incorporado de modo a eliminar apropriadamente a porção pré ou de fusão. Enterocinase (DDDDK) ou fator Xa (IEGR) são mencionados a título de exemplo. A invenção também refere-se ao mesmo. Além disso é claro para aqueles versados na técnica que as duas reações de clivagem podem proceder em uma reação em um pote. Ainda uma possibilidade é eliminar a proteína de fusão somente em uma etapa seguinte. A porção de proteína de fusão neste caso pode ser escolhida para ser derivados de um grande número de proteínas secretadas eficientemente. Exemplos que podem ser mencionados para bactérias são DHFR (diidrofolato redutase), glutathiona S-transferase e hirudina. Exemplos que podem ser usados para secreção de levedura são albumina ou seus derivados, superóxido dismutase ou derivados, interleucina 2 ou derivados e hirudina ou derivados. No presente pedido de patente, a título de exemplo um derivado de hirudina é usado como porção de fusão para expressão bacteriana e para expressão em levedura. Neste sentido foi surpreendentemente verificado que a sequência de hirudina pode ser ainda modificada através de introdução de uma sequência de peptídeo de consecutivas histidinas e/ou uma sequência de peptídeo DDDDK que representa o sítio de reconhecimento para enterocinase, sem afetar adversamente o dobramento da porção de mini-pró-insulina. Processos de cromatografia de afinidade são assim feitos disponíveis. A invenção também refere-se aos mesmos.

Aqueles versados na técnica são ainda familiares com o fato de que os sistemas de expressão descritos a título de exemplo representam somente um pequeno segmento dos sistemas de hospedeiro/vetor desenvolvidos para a preparação recombinante de proteínas. Sistemas de hospe-

deiro/vetor permitindo a preparação dos peptídeos alvos assim também formam parte da invenção.

A invenção assim refere-se à preparação de análogos de insulina que são caracterizados pela presença dos resíduos de aminoácidos Arg(B31), Arg(B32) ou Arg(B31), Lys(B32) a partir de precursores de insulina humana Arg(B31) dos análogos através de ligação catalisada com tripsina com arginina ou lisina. É claro para aqueles versados na técnica neste sentido que, devido à surpreendente seletividade da reação, a reação de ligação também pode ser repetida sobre uma pluralidade de ciclos de reação, de modo que análogos de insulina tendo ainda aminoácidos básicos lisina ou arginina além de posições B31 e B32 tornem-se disponíveis. Isto é obtido através de realização de uma reação de acoplamento, desamidação ou desproteção de aminoácido terminal, e empregando de novo o produto em um apropriado ciclo de reação seguinte. Tais produtos da mesma maneira podem ser obtidos através de uso de um análogo já tendo Arg(B31), Arg(B32) ou Arg(B31), Lys(B32) como precursor. Da mesma maneira é possível preparar análogos que compreendem em posição B31 e a seguir quaisquer aminoácidos geneticamente codificáveis que não precisam ser arginina ou lisina em sequência, mas cuja extremidade C-terminal seja caracterizada pela sequência dibásica Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Lys, ou Lys-Arg. A reação é além disso não limitada ao uso de tripsina como catalisador. É familiar para aqueles versados na técnica que, além de tripsinas humanas ou suína, bovina, de rato, comercialmente disponíveis conhecidas ou outras isoenzimas ou seus derivados ou variantes, também é possível usar as seguintes enzimas: catepsina, tripsina de *Fusarium oxysporum* e de *Streptomyces* (*S. griseus*, *S. exfoliatus*, *S. erythraeus*, *S. fradiae* e *S. albidoflavus*), triptase, mastina, a-crosina, kallikreína, hepsina, prostasina I, lisil endopeptidase (Lisina-C) e endoproteinase Arg-C (clostripaina).

A invenção por isso refere-se a um processo para preparação de um análogo de insulina ou um derivado do mesmo, onde um aminoácido básico, ocorrendo naturalmente que é amidado ou protegido em C-terminal com um grupo protetor, ou um peptídeo que consiste em aminoácidos bási-

cos, ocorrendo naturalmente ou seus derivados e é amidado ou protegido em C-terminal com um grupo protetor, é adicionado sobre um inicial análogo de insulina ou um derivado do mesmo, cujo aminoácido C-terminal da cadeia A e/ou B é selecionado de um grupo compreendendo aminoácidos básicos, ocorrendo naturalmente ou seus análogos ou derivados, sobre um dos ditos aminoácidos C-terminais na presença de uma enzima tendo a atividade biológica de tripsina, e o resultante análogo de insulina modificado é purificado e opcionalmente o grupo amida ou o grupo protetor de C-terminal do aminoácido adicionado ou do peptídeo adicionado é eliminado.

10 A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima, em que o análogo de insulina é caracterizado pela fórmula geral I



R1-(A1-A5)-Cys-Cys-(A8-A10)-Cys-(A12-A19)-Cys-A21-R2

(cadeia A)



(I)

R3-B1-Val-B3-Gln-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B26)-B27-B28-B29-B30-

15 R4-R5

(cadeia B)

em que os significados são

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

20 (A12-A19) os resíduos de aminoácidos em posições A12 a A19 da cadeia A de insulina humana ou insulina animal,

A21 um resíduo de aminoácido ocorrendo naturalmente,

(B8-B18) os resíduos de aminoácidos em posições B8 a B18 da cadeia B de insulina humana ou insulina animal,

25 (B20-B26) os resíduos de aminoácidos em posições B20 a B26 da cadeia B de insulina humana ou insulina animal,

(A8-A10) os resíduos de aminoácidos em posições A8 a A10 da

cadeia A de insulina humana ou insulina animal,

B30 uma ligação química ou um resíduo de aminoácido ocorrendo naturalmente,

5 B1 uma ligação química ou um resíduo de aminoácido ocorrendo naturalmente,

B3 um resíduo de aminoácido ocorrendo naturalmente,

B27, B28 e B29 um resíduo de aminoácido ocorrendo naturalmente,

10 R1 um grupo amino ou um a três resíduos de aminoácidos ocorrendo naturalmente,

R2 um grupo carbóxi ou um a três resíduos de aminoácidos ocorrendo naturalmente,

R3 um grupo amino ou um a três resíduos de aminoácidos ocorrendo naturalmente,

15 R4 uma ligação química ou um a três resíduos de aminoácidos ocorrendo naturalmente, onde o resíduo de aminoácido ocorrendo em C-terminal representa um aminoácido básico,

R5 um ou dois resíduos de aminoácidos básicos cujos terminus C é livre ou amidado,

20 onde o resíduo de aminoácido cujo terminus C está ligado ao terminus N de R5 é selecionado de um grupo compreendendo aminoácidos básicos, ocorrendo naturalmente.

A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima, onde o análogo de insulina inicial é caracterizado pela fórmula geral II



25 R1-(A1-A5)-Cys-Cys-(A8-A10)-Cys-(A12-A19)-Cys-A21-R2
(cadeia A)



(II)

R3-B1-Val-B3-Gln-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B26)-B27-B28-B29-B30-R4

(cadeia B)

onde R1, (A1-A5), (A8-A10), (A12-A19), A21, R2, R3, B1, B3, (B8-B18),
5 (B20-B26), B27, B28, B29, B30 e R4 são definidos como na reivindicação 1,
e o resíduo de aminoácido de C-terminal da cadeia B é selecionado de um
grupo compreendendo aminoácidos básicos, ocorrendo naturalmente.

A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima,
onde o aminoácido básico ocorrendo naturalmente que é amidado ou prote-
10 gido em C-terminal com um grupo protetor é arginina amidada em C-terminal
ou arginina protegida em C-terminal com um grupo protetor Boc.

A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima,
onde o análogo de insulina modificado é insulina humana Gly(A21),
Arg(B31), Arg (B32) cuja extremidade C-terminal de cadeia B é amidada,
15 com o análogo de insulina inicial sendo em particular insulina humana
Gly(A21), Arg(B31).

A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima,
onde o análogo de insulina inicial é preparado através de expressão recom-
binante de uma proteína precursora compreendendo a cadeia A e a cadeia B
20 do análogo de insulina inicial, em particular um processo deste tipo onde um
gene que é parte de um replicon é expresso.

A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima,
onde uma bactéria ou uma levedura é usada como célula hospedeira.

A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima,
25 onde a proteína precursora é secretada após expressão, em particular onde
a proteína precursora é isolada do sobrenadante celular de bactérias ou le-
veduras.

A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima,
onde a proteína precursora é isolada do periplasma de uma bactéria.

30 A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima,
onde a proteína precursora obtida como reivindicado em qualquer uma das
ditas reivindicações é submetida a um processo de dobra e clivagem enzi-

mática.

A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima, onde o análogo de insulina inicial é preparado por expressão direta recombinante.

5 A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima, onde a enzima tendo atividade biológica de tripsina é selecionada de um grupo compreendendo tripsina humana, tripsina suína, tripsina bovina, e uma variante de tripsina humana, tripsina suína e tripsina bovina.

10 A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima, onde a extremidade C-terminal da cadeia B do análogo de insulina modificado é subsequentemente desprotegida em uma reação de hidrólise.

A invenção ainda refere-se a um processo como descrito acima, onde o resultante análogo de insulina é insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32).

15 A invenção ainda refere-se ao uso de um análogo de insulina ou de um derivado do mesmo, cujo aminoácido terminal – C da cadeia A e/ou B é amidada como medicamento.

20 A invenção ainda refere-se a análogo de insulina ou seu derivado obtível através de um processo como descrito acima, cujo aminoácido C-terminal de cadeia A e/ou B é amidado.

A invenção é explicada em mais detalhes abaixo por meio de alguns exemplos de procedimento. Estes exemplos de procedimento não são pretendidos terem efeito restritivo.

25 Exemplo 1: preparação de insulina Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão após dobramento *in vitro*.

A patente US 5 663 291 descreve no exemplo 1 a obtenção de uma proteína de fusão de insulina dobrada corretamente da estrutura:

30 MATTSTGNSA RFVNQHLCGS HLVEALYLVC GERGFFYTPK TRREA-
EDPQV GQVELGGGPG AGSLQPLALE GSLQKRGIVE QCCTSICSLY
QLENYCG (SEQ ID NO: 1)

Este material é convertido de acordo com exemplo V de patente US 5 227 293 através de reação com tripsina em insulina de duas cadeias, e

insulina Arg(B31), Arg(B31), Gly(A21) e insulina Arg(B31), Gly(A21) são isoladas.

Assim é possível obter diretamente o análogo insulina Arg(B31), Arg(B31), Gly(A21), enquanto o subproduto Arg(B31),Gly(A21) pode ser empregado como precursor na ligação catalisada com tripsina com arginina modificada ou lisina.

Exemplo 2: preparação de insulina Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão que foi obtida através de secreção e compreende pró-insulina dobrada corretamente.

Como uma alternativa para exemplo 1, proteínas de fusão também podem ser preparadas através de secreção em sistemas de bactérias. Neste caso, a estrutura pró-insulina como parte da proteína de fusão é dobrada corretamente, e a etapa de redobra "in vitro" pode ser dispensada. O pedido de patente WO 02/068660 propõe um sistema deste tipo. Se, por exemplo, o códon para Asn(A21) é substituído por um códon para Gly(A21) no plasmídeo pBpfuHir_Ins que é descrito no exemplo 1 deste pedido de patente internacional, o resultado é uma proteína de fusão da qual glargina insulina pode ser obtida a título de exemplo, e além disso insulina humana Arg(B31), Gly(A21) pode ser isolada como subproduto, como descrito no exemplo 1.

Para preparar a sequência, um novo iniciador insu_a21_gly_rev tendo a seguinte estrutura:

5'- TTTTTTAAGCTTGTCTGACTCATTAGCC GCAGTAGTTCTCCAGCTG-3'
(SEQ ID NO: 2)

é requerido.

Este iniciador é empregado em analogia ao pedido de patente WO 02/068660 com o iniciador pfu 1 sobre DNA do plasmídeo pBpfuHir_ins em um PCR. É possível isolar a partir do produto de PCR um fragmento BamH1/Hind3 que pode ser clonado de acordo com o exemplo do pedido de patente WO 02/068660. Após expressão, uma proteína de fusão é isolada e é ainda tratada de acordo com exemplo 1 do presente pedido de patente.

É claro para aqueles versados na técnica que o precursor de

insulina humana Arg(B31), Gly(A21) também pode ser obtido diretamente através de secreção em bactérias de uma proteína de fusão. A invenção também refere-se à mesma.

5 Exemplo 3: preparação de insulina Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) a partir de um precursor Arg(B31), Gly(A21) através de acoplamento com argininamida.

10 100 mg de 21A-Gly-30B uma L-Arg-insulina são dissolvidos em 0,95 mL de solução de argininamida (446 g/L), e 0,13 mL de tampão acetato de Na M (pH 5,8) e 2 mL de DMF são adicionados. A mistura de reação é resfriada para 12°C e iniciada pela adição de 0,094 mL de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics).

15 Após 8 horas, a reação é interrompida através de adição de TFA para pH 2,5 e analisada por HPLC. >60%-insulina humana Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) são formados. Adição de solução inibidora de tripsina é seguida por purificação do análogo amidado em analogia a US 5 656 722. O análogo de insulina amidado é então hidrolisado na presença de ácido por várias horas para render insulina humana Arg(B31), Arg(B32),-Gly(A21).

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

20 100 mg de 21A-Gly-30B uma L-Arg-insulina são dissolvidos em 0,93 mL de solução de lisinamida (400 g/L), e 0,13 mL de tampão acetato de Na M (pH 5,8) e 2 mL de DMF são adicionados. A mistura de reação é resfriada para 12°C e iniciada pela adição de 0,094 mL de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics).

25 Após 8 horas, a reação é interrompida através de adição de TFA para pH 2,5 e analisada por HPLC. Insulina humana Arg(B31), Lys(B32)-NH₂, Gly(A21) é formada e é purificada após adição de solução inibidora de tripsina em analogia a US 5 656 722. O análogo de insulina amidado é então hidrolisado na presença de ácido por várias horas para render insulina hu-
30 mana Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21).

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

OH.

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

A reação é interrompida pela adição de uma mistura de 25% água, 25% acetonitrila e 50% ácido trifluor acético. A mistura é liofilizada e, para eliminar o grupo protetor, dissolvida em 1 mL de TFA e deixada em repouso em temperatura ambiente por cerca de 3 horas. Purificação da insulina humana Arg(B31), Arg(B32)-NH₂, Gly(A21) ocorre a título de exemplo em analogia a US 5 656 722.

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

50 mg de insulina humana Arg(B31),-Gly(A21) são dissolvidos em 0,62 mL de solução de H-Lys(Boc)-OtBu (0,5 g/mL, pH 5), e 1 mL de N,N-dimetil formamida (DMF) é adicionado. A mistura é resfriada para 12°C, e 2 mg de tripsina (Roche Diagnostics) são adicionados.

Após mais que 10 horas, a reação é interrompida pela adição de 2 mL de uma mistura de acetonitrila/água de 50% de resistência e 1 mL de TFA (100%). A mistura é liofilizada e, para eliminar o grupo protetor Boc, dissolvida em 1 mL de TFA e deixada em repouso em temperatura ambiente por cerca de 3 horas. Purificação da Arg(B31), Lys(B32),OH ocorre a título de exemplo em analogia a US 5 656 722.

Exemplo 7: sequência de gene para secreção de uma proteína de fusão de insulina hirudina Arg(B31), Gly(A21) por levedura de fermento de pão.

O pedido de patente EP-A 1 364 032 propõe o uso de hirudina como parceiro de fusão para a expressão e secreção de outras proteínas de valor, farmacologicamente interessantes, em leveduras.

O exemplo 1 do pedido de patente EP-A 1 364 032 descreve o sistema hospedeiro-vetor para preparação de uma proteína de fusão que

consiste em um derivado de hirudina e mini-pró-insulina. Este sistema pode ser usado a título de exemplo para preparação de mini-pró-insulinas em que na posição A21, o aminoácido asparagina foi substituído por aminoácidos como descrito em US 5 656 722.

5 O vetor de expressão pode ser construído em analogia ao exemplo do pedido de patente EP-A 1 364 032 se o iniciador insnc01rev é substituído e desenhado de modo que o códon na posição A21 seja alterado.

Para preparar a seqüência codificando insulina humana
10 Arg(B31), Gly(A21), por exemplo, o seguinte iniciador é sintetizado:

ins_gly_a21_rev

5'-TTTTTTCCATGGGTCGACTATCAGCCACAGTAGTTTTCCAGCTGG-3'

(SEQ ID NO: 3)

O iniciador neste caso cobre completamente o segmento de gene
15 ne codificando aminoácidos A15-A21 do análogo de insulina. Combinação deste iniciador com o iniciador de SEQ ID NO: 4 de exemplo 1 do pedido de patente, e uso do plasmídeo pADH2Hir_ins como molde permite a geração através de PCR de um fragmento de DNA que, após digestão com as enzimas de restrição KpnI e NcoI, é inserido no vetor de expressão correspondentemente aberto e compreende a desejada proteína de fusão.
20

O vetor é designado pADH2Hir_ins_glyA21. A proteína de fusão é expressa e processada de acordo com o pedido de patente EP-A 1 364 032 para render mini-pró-insulina Gly(A21), que é convertida de acordo com o exemplo 2 em insulina humana Gly(A21)-Lys(B32) , Gly(A21).

25 Exemplo 8: seqüência de gene para secreção direta do precursor Arg(B31), Gly(A21) através de levedura de fermento de pão.

DNA do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 descrito no exemplo 7 é usado para preparar uma construção vetor para direta secreção de insulina humana Arg(B31), Gly(A21).

30 Os seguintes iniciadores são sintetizados.

alfa_insf1

5'- TTTTTTGGATCCTTTGGAATAAAAGATTTGTTAACCAACACTTGTGTG-

3' (SEQ ID NO: 4)

Ele cobre a sequência do terminus C do fator alfa, códons para Lys-Arg e do terminus-N da sequência de mini-pró-insulina.

ins_gly_rev2

5 5' – TTTTTCAT GGGTCGCTAT CAGCCACAGT AGTTTTCCAG CTGG –
3' (SEQ ID NO: 5)

O iniciador hibridiza com a extremidade 3' da sequência de análogo de insulina clonada no plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21. Uma PCR (condições-padrão) gera um fragmento de DNA que, após digestão com as
10 enzimas de restrição KpnI e NcoI, é inserido no vetor de expressão correspondentemente aberto e compreende a desejada proteína de fusão. As células competentes da linhagem de levedura Y79 transformam-se. Transformantes são subsequentemente expressos como descrito no exemplo 7. A mini-pró-insulina Arg(B31), Gly(A21) é isolada através de processos conhecidos (EP-A 0 229 998) e convertida como no exemplo 2 em insulina humana
15 Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21).

Exemplo 9: sequência de gene para secreção de uma proteína de fusão insulina humana Arg(B31), Gly(A21) – hirudina através de Pichia pastoris.

Clonagem do vetor de expressão ocorre em analogia ao exemplo 4 do pedido de patente EP-A 1 364 032. Ao invés do iniciador de sequência pichia_H-Irev2, neste caso o iniciador ins_gly_rev2 é empregado e posteriormente permite a possibilidade de expressão de insulina humana Gly(A21) com o produto de PCR:

5'-

25 TTTTGGCGCCGAATTCACTACTATTAGCCACAGTAGTTTTCCAGCTGG
– 3' (SEQ ID NO:6)

O resultante plasmídeo é designado pPich_Hir_ins-GlyA21. Purificação de mini-pró-insulina Arg(B31), Gly(A21) como material de partida para geração de um análogo com extremidade de cadeia dibásica é realizada como descrito.
30

Exemplo 10: sequência de gene para secreção direta do precursor Arg(B31), Gly(A21) por Pichia pastoris.

O apropriado vetor de expressão é construído em analogia ao exemplo 7. O DNA do plasmídeo pPich_Hir_ins-GlyA21 e dois iniciadores pich_insgly_dirf e pich_insgly_dirrev

5 5'-TTTTTTCTCGAGAAAAGATTTGTTAACCAACACTTGTGTG-3' (SEQ ID NO: 7)

pich_insgly_dirrev

5'-TTTTTT GGCGCCGAATTCACTACTATTAGCCAC-3' (SEQ ID NO: 8)

são requeridos.

10 Exemplo 11: preparação de insulina Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão que é obtida por secreção de levedura e compreende pró-insulina corretamente dobrada, e sua porção de fusão compreende uma sequência de aminoácido His₆.

DNA do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 serve como molde.

15 Dois iniciadores são sintetizados:

alpha_LT_H6_hirf and alpha_LT_H6_hirrev

alfa_LT_H6_hirf1:

5'- GCACCATCATCACCATCACTATACTGACTGCACTGAATC -3' (SEQ ID NO: 9)

20 O iniciador compreende os códons para 6 histidinas em séries e aminoácidos 3-8 e 9 (parcialmente) da sequência Repludan[®]

alfa_LT_H6_hirf2:

5'-

GAAGGGGTACCTTTGGATAAAAGACTTACGCACCATCATCACCATCAC -

25 3' (SEQ ID NO: 10)

O iniciador compreende os códons para 6 histidinas em séries, os códons para aminoácidos 1 e 2 da sequência lepirudina e seqüências de fator alfa que incluem o sítio de processamento Lys-Arg, e cobre o sítio de reconhecimento para a enzima de restrição Kpn 1. DNA do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 serve como molde em uma PCR padrão com os iniciadores alfa_LT_H6_hirf1 e ins_gly_a21_rev do exemplo 7 do presente pedido de patente. O produto da reação é isolado e uma alíquota é empregada co-

mo molde para uma segunda PCR com os iniciadores alfa_LT_H6_hirf2 e ins_gly_a21_rev. O produto de reação é processado como descrito com KPN1 e Nco1 e então clonado. O resultado é o plasmídeo pADH2_LT_H6_Hir_ins_glyA21: seguindo transformação de Y79 com DNA do plasmídeo, a proteína de fusão é expressa. As células são separadas do sobrenadante por centrifugação, e o sobrenadante é concentrado através de filtros de membranas, por exemplo, de Sartorius, e então através de cromatografia de afinidade Ni²⁺, seguindo o protocolo para o sistema de purificação Invitrogen ProBond TM. Após remoção do tampão de eluição por diálise e/ou filtração ou filtração com gel como alternativa, a proteína de fusão pode ser processada em uma maneira conhecida para render insulina humana Arg(B31), Gly(A21) e então convertida em glargina insulina

Exemplo 12: preparação de insulina humana Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão que é obtida através de secreção por levedura e compreende a pró-insulina corretamente dobrada, e cuja proteína de fusão é eliminada com a enzima enterocinase.

DNA do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 serve como material de partida. O iniciador ins_gly_a21_rev do exemplo 7 do presente pedido de patente e hirf1 do exemplo 1 do pedido de patente WO 02/070722 A1 são usados. Para este propósito, dois novos iniciadores são preparados:

Hir_entero_insf

5'- CTTCAG GACGATGACGATAAATTTGTTAACCAACACTTGTGTGG-3'
(SEQ ID NO: 11)

O iniciador cobre os aminoácidos B1-B7 e B8 (parcialmente) da sequência de mini-pró-insulina e compreende os códons para a sequência de aminoácidos Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, que representa sítio de reconhecimento para enterocinase.

Hir_entero_insrev

5'- TTTATCGTCATCGTCCTGAAGGCTGAAGGTATTCCTCAGGG-3' (SEQ ID NO: 12)

O iniciador reverso cobre os aminoácidos 60-65 da sequência lepirudina e compreende os códons para a sequência de aminoácidos Asp-

Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO: 13), que representa sítio de reconhecimento para enterocinase. Primeiramente duas PCR são realizadas com os pares de iniciadores hirf1/Hir_entero_insrev e Hir_entero_insf/ins_gly_a21_rev. Os produtos de reação são isolados. Alíquotas do material são misturadas e a
5 mistura é empregada em uma terceira PCR como molde para o par de iniciadores hirf1/ins_gly_a21_rev. O produto de reação é clonado como descrito. O resultado é o vetor pADH2Hir_ins_glyA21. A proteína de fusão é preparada como descrito.

10 A proteína de fusão é clivada com enterocinase. A enzima é comercialmente disponível.

A reação de clivagem é realizada em tampão enterocinase (Tris/HCl a 20 mM, NaCl a 50 mM, CaCl₂ a 2 mM, pH 7,4) empregando uma quantidade de enzima correspondendo à particular informação de fabricante. A clivagem comumente ocorre após remoção das células hospedeiras e a
15 seguinte etapa de trabalho. Entretanto, ela também pode ocorrer diretamente no sobrenadante após fermentação, após as ótimas condições de reação terem sido ajustadas.

Exemplo 13: preparação de insulina humana Arg(B31), Gly(A21) a partir de uma proteína de fusão que foi obtida através de secreção por levedura e
20 compreende pró-insulina corretamente dobrada, e cuja porção de fusão é eliminada com a enzima enterocinase e compreende uma sequência poliistidina.

DNA do plasmídeo pADH2_LT_H6_Hir_ins_glyA21 e os iniciadores Hir_entero_insrev, Hir_entero_insf e ins_gly_a21-ev são usados, e iniciador hirf1 é substituído pelo iniciador alfa_lt_enterof com a seguinte sequência:
25

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

Então, em analogia ao exemplo 12, um vetor pADH2_LT_H6_Hir_etero_ins_glyA21 que codifica uma proteína de fusão cuja
30 porção de fusão hirudina foi estendida por seis histidinas partindo com posição -3N terminal e terminal-C a partir de posição 72 pela sequência DDDDK (SEQ ID NO: 14) é construído. Insulina humana Arg(B31), Gly(A21) é então

preparada através de combinação de processo descrito em exemplos 11 e 12.

Exemplo 14: sequência de gene para secreção de uma proteína de fusão insulina dês-Phe(B1), Arg(B31) hirudina por levedura de fermento de pão.

5 A transformação e expressão ocorrem em analogia ao exemplo 7.

Duas seqüências iniciadoras são sintetizadas:

Desphef1:

5'-CTTCAGGGAAATTCGGCACGAGTTAACCAACACTTGTGTGGTTC-3'

10 (SEQ ID NO: 15)

e Desphe_rev1:

5'-GAACCACACA AGTGTTGGTT AACTCGTGCC GAATTTCCCT GAAG-3'

(SEQ ID NO: 16)

15 DNA do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 de exemplo 7 serve como molde. Duas reações de cadeia polimerase são realizadas independentemente uma da outra. Na reação 1, o iniciador Desphe_rev1 e o iniciador SEQ ID NO: 4 do exemplo 1 do pedido de patente EP-A 1 364 032 são empregados, e na reação 2 o iniciador ins_gly_a21_rev do exemplo 7 do presente pedido de patente e o iniciador Desphef1 são empregados. Os produtos de reação das duas reações são isolados e alíquotas do rendimento são combinadas em uma terceira reação e empregadas como molde para o par de iniciadores consistindo nos iniciadores SEQ ID NO: 4 de exemplo 1 do pedido de patente EP-A 1 364 032 e ins_gly_a21_rev. O produto de reação da terceira reação é clonado, transformado e expresso como descrito no exemplo 7. A resultante proteína de fusão serve como material de partida para preparação de correspondentes análogos de insulina com extremidades de cadeia dibásicas.

20

25

Exemplo 15: sequência de gene para secreção de uma proteína de fusão insulina Ala(B31), Arg(B32), Gly(A21) hirudina por levedura de fermento de

30 pão.

Duas seqüências iniciadoras são sintetizadas:

Ala_b31f1:

5'-CTTCTACTACTCCAAAGACGgctCGTGGTATCGTTGAACAATGTTG-3'

(SEQ ID NO: 17)

e Ala_b31rev1:

5 5'-CAACATTGTT CAACGATACC ACGagcCGTC TTTGGAGTGT AGAAG-3'

(SEQ ID NO: 18)

DNA do plasmídeo pADH2Hir_ins_glyA21 do exemplo 7 serve como molde. Duas reações de cadeia polimerase são realizadas independentemente uma da outra. Em reação 1, os iniciadores Ala_b31rev1 e o iniciador SEQ ID NO: 4 do exemplo 1 do pedido de patente EP-A 1 364 032 são empregados, e na reação 2 o iniciador ins_gly_a21_rev do exemplo 7 do presente pedido de patente e o iniciador Ala_b31f1 são empregados. Os produtos de reação das duas reações são isolados e alíquotas do rendimento são combinadas em uma terceira reação e empregadas como molde para o par de iniciadores consistindo nos iniciadores SEQ ID NO: 4 do exemplo 1 do pedido de patente EP-A 1 364 032 e ins_gly_a21_rev. O produto de reação da terceira reação é clonado, transformado e expresso como descrito no exemplo 7. A resultante proteína de fusão serve como material de partida para preparação de correspondentes análogos de insulina com extremidades de cadeia dibásicas.

Exemplo 16: sequência de genes para secreção direta de um precursor Lys(B31) por levedura de fermento de pão

Dois iniciadores são sintetizados:

Lys_b31f

25 5'-CTTCTACTACTCCAAAGACGAAAGGTATCGTTGAACAATGTTG-3' (SEQ ID NO: 19)

e Lys_b31rev

5'-CAACATTGTT CAACGATACC TTTCGTCTTT GGAGTGTAGA AG -3 (SEQ ID NO: 20)

30 DNA do plasmídeo pADH2Hir_ins do exemplo 1 do pedido de patente WO 02/070722A1 serve como molde para duas reações de cadeia polimerase. Na reação 1, os iniciadores Lys_b31f1 e insnco1rev (SEQ ID

NO: 6 de WO 02/070722A1) são empregados, e na reação 2 os iniciadores Lys_b31rev e alfa_insf1 do exemplo 7 do presente pedido de patente são empregados. As reações-padrão são realizadas e os resultantes fragmentos de PCR são isolados. Alíquotas dos dois rendimentos são combinadas e servem como molde para uma terceira reação com os iniciadores insnco1rev e SEQ ID NO: 6 do WO 02/070722A1. O resultante fragmento de PCR é clonado e expresso como descrito no exemplo 8. O resultado é mini-pró-insulina Lys(B31), que é convertida com lisil endopeptidase em insulina separada B(1-29) – A(1-21) e como intermediário para preparação de insulina arginina-
5 namida-B30 ou insulina lisinamida B30, que subsequentemente pode ser convertida no respectivo análogo dibásico.

Exemplo 17: Clivagem com lisil endopeptidase

O precursor de insulina é reagido como descrito em DE 3844211 com lisil endopeptidase (LEP) (exemplo 1). Para este propósito, 10 mg de Lys(B31)-mini-pró-insulina são dissolvidos em tampão Tris (pH 8,0), e LEP de *Lysobacter enzymogenes* é adicionada (0,01 mL de uma solução conc. 1 mg/mL em água, Merckbiosciences). Incubação é realizada em temperatura ambiente por 2 horas e purificação é através de RP-HPLC (coluna Nucleosil 120-5). O resultado é insulina dividida B(1-29) – A(1-21).

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

100 mg de insulina dividida B(1-29)-A(1-21) são dissolvidos em 0,95 mL de solução de argininamida (446 g/L), e 0,13 mL de tampão de acetato de Na (pH 5,8) e 2 mL de DMF são adicionados. A mistura de reação é resfriada para 12°C e iniciada através de adição de 0,094 mL de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics).

Após 8 h, a reação é interrompida pela adição TFA para pH 2,5 e analisada por HPLC. Mais de 60%-Arg(B30)-insulinamida são formados. A adição de solução inibidora de tripsina é seguida por purificação do análogo amidado em analogia a US 5 656 722. O análogo de insulina amidado então
30 pode ser hidrolisado na presença de ácido por várias horas para render insulina Arg(B30), ou a amida pode ser empregada diretamente como medica-

mento.

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

100 mg de insulina dividida B(1-29)-A(1-21) são dissolvidos em
5 0,93 mL de solução de lisinamida (400 g/L), e 0,13 mL de tampão acetato de Na (pH 5,8) e 2 mL de DMF são adicionados. A mistura de reação é resfriada para 12°C e iniciada através de adição de 0,094 mL de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics). Após 8 h, a reação é interrompida pela adição de TFA para pH 2,5 e analisada por HPLC. Lys(B30)-insulinamida é formada e
10 purificada após adição de solução inibidora de tripsina em analogia a US 5 656 722. O análogo de insulina amidado então pode ser hidrolisado na presença de ácido por várias horas para render insulina-Lys(B30), ou ser empregado diretamente como medicamento.

2006-025.ST25
Listagem de Sequência

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
<120> Processo de preparação de análogo: de insulina com cadeia B terminal dibásica

<130> DE2006/025

<140> 10 2006 031 955.9

<141> 2006-07-11

<160> 20

<170> Versão de Patente 3.3

<210> 1

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusão de insulina

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Gly

<210> 2

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador insu_a21_gly_rev

<400> 2

ttttttaagc ttgtcgactc attagccgca gtagttctcc agctg

45

<210> 3

<211> 45

2006-025.ST25

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador ins_gly_a21_rev
 <400> 3
 ttttttccat gggtcgacta tcagccacag tagttttcca gctgg 45

<210> 4
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador alpha_insf1
 <400> 4
 ttttttggat cctttggaat aaaagatttg ttaaccaaca cttgtgtg 48

<210> 5
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador ins_gly_rev2
 <400> 5
 ttttttccat gggtcgctat cagccacagt agttttccag ctgg 44

<210> 6
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador ins_gly_rev2
 <400> 6
 tttttggcgc cgaattcact actattagcc acagtagttt tccagctgg 49

<210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador pich_insgly_dirf
 <400> 7
 ttttttctcg agaaaagatt tgtaaccaa cacttgtgtg 40

<210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador pich_insgly_dirrev
 <400> 8
 ttttttggcg ccgaattcac tactattagc cac 33

2006-025.ST25

<210> 9
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador alpha_LT_H6_hirf1

 <400> 9
 gcaccatcat caccatcact atactgactg cactgaatc 39

<210> 10
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador alpha_LT_H6_hirf2

 <400> 10
 gaaggggtac ctttggataa aagacttacg caccatcatc accatcac 48

<210> 11
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador Hir_entero_insf

 <400> 11
 cttcaggacg atgacgataa atttgttaac caacacttgt gtgg 44

<210> 12
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador Hir_entero_insrev

 <400> 12
 tttatcgtca tcgtcctgaa ggctgaaggt attcctcagg g 41

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador alpha_lt_enterof

 <400> 13
 gaaggggtac ctttggataa aag 23

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>

2006-025.ST25

<223> Sequência de Identificação

<400> 14

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 15

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Desphef1

<400> 15

cttcagggaa attcggcacg agttaaccaa cacttgtgtg gttc

44

<210> 16

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Desphe_rev1

<400> 16

gaaccacaca agtgttggtt aactcgtgcc gaatttcct gaag

44

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Ala_b31f1

<400> 17

cttctacact ccaagacgg ctcgtggtat cgttgaacaa tgttg

45

<210> 18

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Ala_b31rev1

<400> 18

caacattggt caacgatacc acgagccgtc tttggagtgt agaag

45

<210> 19

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Lys_b31f

<400> 19

cttctacact ccaagacga aaggatcgt tgaacaatgt tg

42

2006-025.ST25

<210> 20

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Lys_b31rev

<400> 20

caacattggt caacgatacc ttcgtcttt ggagtgtaga ag

42

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparação de um análogo de insulina ou um derivado do mesmo, no qual

um aminoácido básico, ocorrendo naturalmente, é amidado ou protegido em C-terminal com um grupo protetor, ou um peptídeo que consiste em aminoácidos básicos, ocorrendo naturalmente, ou seus análogos ou derivados e é amidado ou protegido em C-terminal com um grupo protetor, é adicionado

sobre um análogo de insulina inicial ou um derivado do mesmo, cujo aminoácido C-terminal da cadeia A e/ou B é selecionado do grupo compreendendo aminoácidos básicos, ocorrendo naturalmente, ou análogos ou derivados, sobre um dos ditos aminoácidos C-terminal na presença de uma enzima tendo a atividade biológica de tripsina, e o resultante análogo de insulina modificado é purificado e opcionalmente o grupo amida ou grupo protetor de C-terminal do aminoácido ou peptídeo adicionado é eliminado.

2. Processo de acordo com a reivindicado na reivindicação 1, onde o análogo de insulina é caracterizado pela fórmula geral I



R1-(A1-A5)-Cys-Cys-(A8-A10)-Cys-(A12-A19)-Cys-A21-R2
(cadeia A)



(I)

R3-B1-Val-B3-Gln-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B26)-B27-B28-B29-B30-R4-R5
(cadeia B)

na qual os significados são

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

(A12-A19) os resíduos de aminoácidos em posições A12 a A19 da cadeia A de insulina humana ou insulina animal,

A21 um resíduo de aminoácido ocorrendo naturalmente,
(B8-B18) os resíduos de aminoácidos em posições B8 a B18 da
cadeia B de insulina humana ou insulina animal,

(B20-B26) os resíduos de aminoácidos em posições B20 a B26
5 da cadeia B de insulina humana ou insulina animal,

(A8-A10) os resíduos de aminoácidos em posições A8 a A10 da
cadeia A de insulina humana ou insulina animal,

B30 uma ligação química ou um resíduo de aminoácido ocorren-
do naturalmente,

10 B1 uma ligação química ou um resíduo de aminoácido ocorrendo
naturalmente,

B3 um resíduo de aminoácido ocorrendo naturalmente,

B27, B28 e B29 um resíduo de aminoácido ocorrendo natural-
mente,

15 R1 um grupo amino ou um a três resíduos de aminoácidos ocor-
rendo naturalmente,

R2 um grupo carbóxi ou um a três resíduos de aminoácidos o-
correndo naturalmente,

R3 um grupo amino ou um a três resíduos de aminoácidos ocor-
20 rendo naturalmente,

R4 uma ligação química ou um a três resíduos de aminoácidos
ocorrendo naturalmente, onde o resíduo de aminoácido ocorrendo em C-
terminal representa um aminoácido básico,

R5 um ou dois resíduos de aminoácidos básicos cujas extreni-
25 dades C-terminais são livres ou contém amidadas,

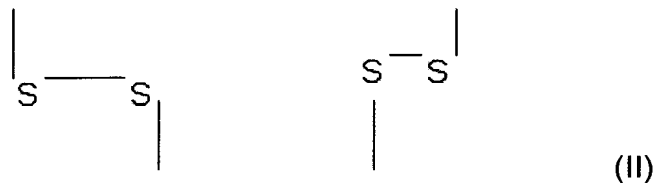
onde o resíduo de aminoácido cuja porção C-terminal está ligada
à N-terminal de R5 é selecionado de um grupo compreendendo aminoácidos
básicos, ocorrendo naturalmente.

3. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2,
30 onde o análogo de insulina inicial é caracterizado pela fórmula geral II



R1-(A1-A5)-Cys-Cys-(A8-A10)-Cys-(A12-A19)-Cys-A21-R2

(cadeia A)



R3-B1-Val-B3-Gln-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B26)-B27-B28-B29-B30-R4

5 (cadeia B)

em que R1, (A1-A5), (A8-A10), (A12-A19), A21, R2, R3, B1, B3, (B8-B18), (B20-B26), B27, B28, B29, B30 e R4 são definidos como na reivindicação 1, e o resíduo de aminoácido de C-terminal da cadeia B é selecionado de um grupo compreendendo aminoácidos básicos, ocorrendo naturalmente.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, onde o aminoácido básico, ocorrendo naturalmente, que é amidado ou protegido em C-terminal com um grupo protetor é arginina amidada em C-terminal ou arginina protegida em C-terminal com um grupo protetor.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, onde o análogo de insulina modificado é insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32) cuja extremidade C-terminal da cadeia B é amidada.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que o análogo de insulina inicial é insulina humana Gly(A21), Arg(B31).

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, onde o análogo de insulina inicial é preparado por expressão recombinante de uma proteína precursora compreendendo a cadeia A e a cadeia B do análogo de insulina inicial.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, onde um gene que é parte de um replicon é expresso.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, onde uma bactéria ou uma levedura é usada como célula hospedeira.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, onde a proteína precursora é secretada após expressão.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, onde a proteína precursora é isolada do sobrenadante celular de bactérias ou leveduras.

12. Processo para preparação de análogos de insulina modificados de acordo com a reivindicação 9, onde a proteína precursora é isolada do periplasma de uma bactéria.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, onde a proteína precursora obtida como reivindicado em qualquer uma das ditas reivindicações é submetida a um processo de dobra e clivagem enzimática.

14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, onde o análogo de insulina inicial é preparado por expressão direta recombinante.

15. Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 14, onde a enzima tendo a atividade biológica de tripsina é selecionada do grupo compreendendo tripsina humana, tripsina suína, tripsina bovina, e uma variante de tripsina humana, tripsina suína e tripsina bovina.

16. Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 14, onde a enzima tem atividade lisil endopeptidase.

17. Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 15, onde a extremidade C-terminal da cadeia B do análogo de insulina modificado é subsequentemente desprotegida em uma reação de hidrólise.

18. Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 17, no qual o resultante análogo de insulina é insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32).

19. Uso de um análogo de insulina preparado como definido nas reivindicações 1-16 ou de um derivado do mesmo, cujo aminoácido C-terminal da cadeia A e/ou B está amidado como medicamento.

20. Análogo de insulina ou um derivado do mesmo, obtível como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, cujo aminoácido C-terminal da cadeia A e/ou B está amidado.

RESUMO

Patente de Invenção: "**PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DE INSULINA COM CADEIA B-TERMINAL DIBÁSICA**".

5 A presente invenção refere-se a um processo de produção de um tipo de insulina cujo precursor é geneticamente engendrado e, convertendo o dito precursor à respectiva insulina através da reação de ligação catalisada por enzima com lisinamida ou arginamida, ou por lisina ou arginina, a qual é modificada por grupos de proteção, e opcionalmente por hidrólise subsequente.