

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

(21) **PI 0713726-5 A2**

(22) Data de Depósito: 19/06/2007
(43) Data da Publicação: 30/10/2012
(RPI 2182)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/86
A61K 38/46
C12N 1/21

(54) **Título:** BETA-LACTAMASE MODIFICADA E MÉTODOS PARA SUA PREPARAÇÃO

(30) **Prioridade Unionista:** 21/06/2006 FI 20065431

(73) **Titular(es):** Ipsat Therapies Oy

(72) **Inventor(es):** Nina Wickstrand, Pertti Koski, Susanna Kääriäinen

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

(86) **Pedido Internacional:** PCT FI2007050372 de 19/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/147945de
27/12/2007

(57) **Resumo:** BETA-LACTAMASE MODIFICADA E MÉTODOS PARA SUA PREPARAÇÃO. A invenção refere-se a uma modificação pós-traducional alvejada de metalo-beta-lactamase, através do truncamento e inserção de um dipeptídeo na extremidade do terminal de amino para reduzir a heterogeneização do terminal de amino em um sistema de produção de DNA recombinante. A proteína K-T-E-ABL é expressa e modificada pelas proteases hospedeiras para E-ABL. Moléculas, vetores e hospedeiros de nucleotídeos apropriados são também descritos. E-ABL é útil em uma composição farmacêutica por tratar os efeitos adversos induzidos por antibiótico no intestino de pacientes tratados com antibióticos beta-lactamas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**BETA-LACTAMASE MODIFICADA E MÉTODOS PARA SUA PREPARAÇÃO**".

Campo da Invenção

Vários antibióticos são usados no tratamento de infecções bacterianas. Entretanto, os antibióticos não atacam somente os patógenos, mas eles afetam a flora bacteriana normal, levando a efeitos colaterais adversos, por exemplo, no intestino do paciente. Esses efeitos colaterais podem ser reduzidos administrando enzimas capazes de degradar o antibiótico residual no intestino. A presente invenção refere-se a metalo-beta-lactamases modificadas que são úteis para tratar e prevenir efeitos adversos de antibióticos que têm um anel de beta-lactamase, ou na preparação de tais enzimas. A invenção é também dirigida para um método de preparar beta-lactama modificado como também para moléculas de nucleotídeos, vetores e células hospedeiras úteis para esse fim.

15 Antecedentes da Invenção

As enzimas beta-lactamases representam o principal mecanismo de resistência entre a bactéria para os antibióticos de beta-lactama, que incluem penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas. Essas enzimas catalisam a hidrólise irreversível da ligação de amida do anel beta-lactama para criar agentes antimicrobianos não eficazes. Com base na classificação da estrutura molecular e de mecanismos catalíticos, as beta-lactamases podem ser divididas em quatro classes: A, B, C, e D. As classes A, C e D são enzimas de serina e compreendem a maioria das beta-lactamases (Ambler, 1980). Essas enzimas geralmente desativam penicilinas ou cefalosporinas e muitas vezes mostram uma preferência por um desses dois antibióticos.

As beta-lactamases de Classe B são metalo-enzimas que requerem um ou dois íons de zinco como um co-fator para a atividade da enzima. As metalo-beta-lactamases constituem o grupo 3 na classificação funcional de Bush-Jacoby-Madeiros (Bush, 1998). Esse esquema é principalmente baseado nos perfis dos substratos, na sensibilidade deles ao EDTA e sua resistência aos inibidores de beta-lactamases serina. Baseadas nas similaridades estruturais na região que coordena a ligação de zinco, as metalo-

beta- lactamases podem ser divididas em três subgrupos, B1, B2 e B3 (Gal-
leni et al., 2001). O subgrupo B1 possui três histidinas e uma cisteína como
resíduos de coordenação do zinco chave. Estruturas cristalográficas têm
sido descritas para muitas enzimas de subgrupos B1 tais como BclI de *Bacil-*
5 *lus cereus* (Carfi et al, 1995 e 1998a), CcrA de *Bacteroides fragilis* (Carfi et
al., 1998b) e IMP-1 de *Pseudomonas aeruginosa* (Concha et al., 2000). De
uma maneira correspondente, lactamases B2 de subgrupo têm um resíduo
de arginina, em vez de histidina, na primeira posição do motivo de ligação do
zinco principal, NXHxD. Recentemente, a primeira estrutura de cristal de um
10 subgrupo de enzima B2 (CphA) foi solucionada por Garau et al. (2005). O
subgrupo B3 contém enzimas com estrutura multimérica (Walsh et al., 2005).
As metalo-beta-lactamases mostram um perfil de substrato de espectro am-
plo incluindo penicilinas e cefalosporinas, e elas são resistentes à ação dos
inibidores de beta-lactamase serina convencionais comuns, tais como sul-
15 bactâmico e tazobactâmico de ácido clavulânico. Além disso, ao contrário da
maioria das beta- lactamases serina, as metalo-beta-lactamases têm a ca-
pacidade de hidrolizar carbapenêmicos tais como meropenêmico e imipe-
nêmico. Diversos números de bactérias são conhecidos como produtores de
metalo-beta-lactamases. Elas são comumente expressas entre as *Entero-*
20 *bacteriae* genus (incluindo *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ci-
trobacter freundii*, *Shigella flexneri*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenobacteri-
um maltophilia*, *Acinetobacter* genus, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus cereus*,
Flavobacterium odoratum, e *Bacteroides fragilis* (Walsh et al., 2005).

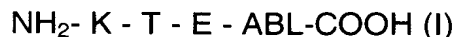
As beta-lactamases podem ser utilizadas como proteínas farma-
25 cêuticas para desativar beta-lactamases não absorvidas no trato gastrointes-
tinal, a fim de prevenir os efeitos adversos induzidos pela beta-lactamase
incluindo alterações microbióticas intestinais normais e o super- crescimento
das bactérias resistentes ao beta-lactama (WO93/13795, WO2004/016248).
Para uma terapia de beta-lactamase eficaz no trato do intestino delgado, a
30 enzima deve ser resistente à ação de proteases intestinais na presença de
ácidos biliares, e preservarem a atividade enzimática alta em uma faixa ampla
de pH (5,5-7,5).

A viabilidade da terapia de enzima alvejada em modelos de canino e camundongo foi demonstrada empregando uma beta- lactamase serina de *Bacillus licheniformis* durante a medicação de ampicilina parenteral (Harmoinen et al., 2004, Mentula et al., 2004, Stiefel et al., 2003). Entretanto, o perfil do substrato dessa enzima essencialmente limita seu uso como uma substância de fármaco uma vez que ela tem pouca capacidade de hidrolisar cefalosporinas, carbapenemas ou penicilinas na presença de inibidores beta-lactamase. Conseqüentemente, uma nova enzima beta- lactamase resistente à protease com amplo espectro beta-lactama é indispensável para prolongar o uso da terapia de beta-lactamase entre pacientes hospitalizados sob medicação intravenosa com vários beta-lactamas. As metalo-beta-lactamases são conhecidas por desativar vários tipos de beta-lactamas, e elas são resistentes aos inibidores de beta-lactamases serina. As cepas de *bacillus cereus* são conhecidas por produzir metalo-beta-lactamases que pertencem ao grupo B1. Uma amostra de metalo-beta- lactamase semipurificada recombinantemente produzida de um *Bacillus cereus* 98ME 1552 clínico isolado, demonstrou eliminar o supercrescimento de bactérias patogênicas em potencial em um modelo de camundongo (Stiefel et al, 2005). Entretanto, os presentes inventores descobriram que essa preparação de metalo-beta-lactamase continha uma mistura de variantes de beta-lactamase, que baixa seu valor como uma proteína farmacêutica, uma vez que as variações de uma substância de fármaco reduzem a robustez do processo de produção, aumentam as variações de batelada para batelada, tornam difíceis os testes clínicos, que naturalmente têm um impacto negativo sobre seu registro como um medicamento.

A presente invenção agora provê meios para reduzir a heterogeneidade do terminal de amino que descobriu-se estar associado com a produção recombinante de metalo-beta-lactamase. A invenção ainda provê metalo-beta-lactamases modificadas que podem ser produzidas em forma substancialmente pura, e que podem ser usadas na fabricação de composições farmacêuticas.

Sumário de Invenção

A invenção provê uma proteína metalo-beta-lactamase modificada que tem a fórmula geral:



em que

5

K é lisina

T é treonina

E é ácido glutâmico, e

10 Δ BL é uma proteína metalo-beta-lactamase que foi truncada na extremidade do terminal de amino, de maneira a deixar quatro cepas beta antes da primeira alfa-hélice da estrutura secundária prevista da dita proteína.

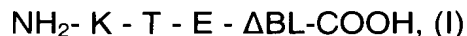
A invenção ainda provê uma molécula de nucleotídeo isolada compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando a dita proteína metalo-beta-lactamase modificada, como também um vetor de expressão
15 contendo a molécula de nucleotídeo, e uma célula hospedeira capaz de expressar a proteína metalo-beta-lactamase codificada pela molécula de nucleotídeo.

A invenção também provê uma proteína metalo-beta-lactamase modificada que tem a fórmula geral

20



em que E e Δ BL são como definido acima. A invenção ainda adicionalmente provê um método de preparar uma proteína metalo-beta-lactamase modificada, o dito método compreendendo fazer a cultura sa dita célula hospedeira, sob condições que permitam a expressão de uma metalo-beta-lactamase
25 que tem a fórmula geral:



em que

K é lisina

T é treonina

30

E é ácido glutâmico, e

Δ BL é uma proteína metalo-beta-lactamase que foi truncada na extremidade do terminal de amino de maneira a deixar quatro cepas beta-

antes do primeiro alfa-hélice da estrutura secundária prevista da dita proteína, e conduzindo a modificação pós-traducional, resultando em uma metalo-beta-lactamase modificada que tem a fórmula geral:



5 em que E e ΔBL são como definidos acima, e

opcionalmente, isolando e purificando a proteína pós-traducionalmente modificada obtida.

Como aspectos adicionais a invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo a proteína metalo-beta-lactamase de fórmula II,
10 uma metalo-beta-lactamase modificada de fórmula II, para uso como um medicamento, e o uso da metalo-beta-lactamase modificada de fórmula II para a fabricação de um medicamento para eliminar os efeitos adversos induzidos pelo antibiótico beta-lactama no trato intestinal.

Finalmente, a invenção provê um método de tratar os efeitos
15 adversos induzidos pelo antibiótico de beta-lactama no trato intestinal, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de metalo-beta-lactamase modificada de fórmula II, ou uma composição farmacêutica que a contém, para uma pessoa com necessidade da mesma. Modalidades específicas da invenção estão descritas nas reivindicações dependentes.

20 Outros objetivos, detalhes e vantagens da presente invenção se tornarão evidentes a partir dos desenhos a seguir, da descrição detalhada e dos exemplos.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra a sequência completa de nucleotídeos e a
25 sequência de aminoácidos deduzida do gene beta-lactamase de *B. cereus* 98ME1552.

A Figura 2 mostra a sequência completa de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos deduzida do gene beta-lactamase de *B. cereus* 98ME1552, derivadas do construto da expressão de pRSH315. O sítio de
30 clivagem dos resíduos de aminoácido 31 ao longo da sequência de sinal de *Bacillus amyloliquefaciens* está prevista para ocorrer entre alanina na posição -1 e glutamina na posição +1. A extensão de NH_2 -terminal de um NH_2 -

QAS-tripeptídeo, que é derivado de sítio de clonagem Hind III, está expressa em negrito.

A Figura 3 mostra a sequência completa de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos deduzida do gene beta-lactamase de *B. cereus* 98ME1552 derivadas do construto da expressão de pRSH318. A clivagem dos resíduos de um aminoácido 31, ao longo da sequência de sinal de *Bacillus amyloliquefaciens*, está prevista para ocorrer entre alanina na posição -1 e glutamina na posição +1. A extensão de NH₂-terminal de um NH₂-QAS-tripeptídeo que é derivado do sítio de clonagem Hind III e a inserção de KT estão apresentadas em negrito.

Descrição Detalhada da Invenção

Um preparado de metalo-beta-lactamase foi primeiro produzido em um sistema de produção de *Bacillus subtilis* contendo um construto de expressão do gene completo de metalo-beta-lactamase, codificando a enzima completa de metalo-beta. A análise de espectrometia de massa detalhada revelou que o preparado de metalo enzima incluiu vários números de variantes de enzima com sequências de terminal amino heterogêneo. Acredita-se que as variações nas sequências de terminação de amino são um resultado da modificação pós-traducional de proteases da célula hospedeira. As alterações observadas na sequência de aminoácido metalo enzima aumentou as variações de batelada para batelada de enzima que tinha sido produzida em um sistema de produção de *Bacillus subtilis* e, dessa maneira, em perspectiva reguladora reduz seu uso como uma proteína farmacêutica. Assim sendo, os meios biológicos moleculares para reduzir as variações observadas na sequência de terminal de amino da enzima metalo-beta-lactamase foram estudados.

Espera-se que a região do terminal de amino não tenha influência essencial sobre as propriedades catalíticas da enzima. Em adição, descobriu-se que a região do terminal de amino está exposta às modificações pós-traducionais de proteases no sistema de produção de *Bacillus subtilis* em que a proteína recombinante é secretada fora da célula bacteriana. A fim de reduzir essa micro-heterogeneidade na região de terminal de amino, a

sequência de nucleotídeos, que codifica essa região prevista, foi eliminada por um método de PCR. Entretanto, a mera eliminação por si mesma não levou a uma redução significativa da heterogeneidade do terminal de amino. Surpreendentemente, entretanto, a eliminação combinada com a inserção de um dipeptídeo, que foi projetada para atender a modificação pós-traducional, levou a uma única variante de metalo-beta-lactamase produzida com um terminal de amino igualmente modificado.

Essa invenção, de um modo geral, refere-se a uma beta-lactamase modificada útil como uma proteína farmacêutica, e também a um intermediário de beta-lactamase recombinante que é produzido pela truncamento e inserção de um dipeptídeo em seu terminal amino, resultando em números reduzidos de variantes de beta-lactamase. Essas modificações facilitam a produção recombinante da enzima em forma homóloga para uso como uma substância de fármaco em terapia com beta-lactamase para a eliminação de efeitos colaterais induzidos por beta-lactamas (cefalosporinas, carbapenemas, e penicilinas na presença ou ausência de inibidores beta-lactamase conhecidos tais como ácido clavulânico, sulbactâmico e tazobactâmico). Em particular, a invenção refere-se à modificação pós-traducional alvejada de metalo-beta-lactamase ativa, através de truncamento e inserção de um dipeptídeo na região de terminal amino, a fim de reduzir a heterogeneidade do terminal amino em um sistema de produção de *Bacillus subtilis*.

"Metallo-beta-lactamases", como usado aqui a seguir, refere-se à beta-lactamases de classe B, isto é, beta-lactamases que requerem pelo menos um íon de metal bivalente (Zn^{2+}) por atividade; e constituem o grupo 3 na classificação funcional de Bush-Jacoby-Madeiros (Bush, 1998). Com base nas similaridades estruturais na região que coordena a ligação de zinco, as metalo-beta-lactamases podem ser divididas em três subgrupos, B1, B2 e B3 (Galleni et al., 2001). Preferivelmente, a metalo-beta-lactamase da invenção pertence ao subgrupo B1. Esse subgrupo possui os resíduos chave de coordenação de zinco de três histidinas e uma cisteína. Mais detalhes sobre os subgrupos estão descritos na parte de antecedentes deste relatório.

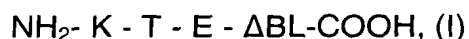
As metalo-beta-lactamases são membros de uma grande, diversificada, superfamília de proteínas que compartilham uma estrutura de $\alpha\beta/\beta\alpha$ similar de quatro camadas. A cadeia de polipeptídeos é dividida em dois domínios, que compreende filamentos e hélices na ordem a seguir: $\beta_i \beta_2 \beta_3$
 5 $\beta_4 \beta_5 \alpha_1 \beta_6 \alpha_2 \beta_7 \alpha_3$ e $\beta_8 \beta_9 \beta_{10} \beta_{11} \alpha_4 \beta_{12} \alpha_5$, respectivamente (Carfi et al., 1995 e 1998a, e Gallenr et al., 2001). As metalo-beta-lactamases da invenção são truncadas na extremidade do terminal de amino, antes do segundo filamento beta. Preferivelmente, elas são truncadas entre o primeiro e a segunda fita beta, e em particular imediatamente em frente do aminoácido E,
 10 entre o primeiro e a segunda fita beta, de acordo com a estrutura cristalográfica acima.

Garau et al., 2004 demonstraram um esquema de numeração padrão para beta-lactamases de classe B (BBL) por analogia à numeração de beta-lactamases de Ambler (ABL) para beta-lactamases de serina (Am-
 15 bler, 1980). O esquema de numeração de BBL é derivado de uma alinhamento estrutural de estruturas de raio X de metalo-beta-lactamases conhecidas, a fim de descobrir regiões conservadas entre vários grupos metalo beta-lactamase que têm grau de identidade de reboque no nível de sequências de aminoácidos primários. O estudo de Garau *et al*, revelou que o primeiro
 20 fragmento conservado, forma a segunda estrutura de lâmina beta em metalo beta-lactamase de *Bacillus cereus* BcII, demonstrado por Carfi et al. 1995, e Carfi et al., 1998a. Conseqüentemente, a lâmina β_1 de metalo beta-lactamase *S. cereus* parece não ser essencial para a função da enzima, porque ela não está presente em todos os grupos metalo beta-lactamase.
 25 Entretanto, a região de terminal de amino de todas as metalo beta-lactamases possui uma estrutura secundária de quatro lâminas beta, conservadas formando fragmentos antes do primeiro fragmento formador de alfa helix. Dessa maneira, o sítio de truncamento para a metalo beta-lactamase pode ser definido como deixando quatro lâminas beta antes da primeira alfa
 30 helix da estrutura secundária prevista independente da presença original de β_1 ou não.

No presente contexto, são usados os códigos de aminoácido

uma letra convencionais. Dessa maneira, A denota alanina, R denota arginina, N denota asparagina, D denota ácido aspártico, C denota cisteína, E denota ácido glutâmico, Q denota glutamina, G denota glicina, H denota histidina, I denota isoleucina, L denota leucina, K denota lisina, M denota metionina, F denota fenilalanina, P denota prolina, S denota serina, T denota treonina, W denota triptofano, Y denota tirosina, e V denota valina. As sequências de aminoácidos são mostradas com a terminação de amino à esquerda e a terminação de carboxila à direita. NH₂- e -COOH podem estar ou não indicados.

De acordo com uma modalidade da invenção a célula hospedeira é transformada com um vetor de expressão capaz de expressar uma beta-lactamase que tem a fórmula geral I:



em que K é lisina, T é treonina, E é ácido glutâmico, e ΔBL é uma proteína metalo- beta-lactamase que foi truncada na extremidade do terminal de amino, antes do segundo filamento beta da dita proteína, dessa maneira a proteína que tem a fórmula geral II:



é formada como um resultado da modificação pós- traducional da proteína de fórmula I. A proteína da fórmula geral I é convenientemente produzida por ligar uma sequência de DNA que codifica KT à uma sequência de DNA que codifica E - ΔBL , em que E - ΔBL é um *Bacillus* e em particular uma metalo-beta-lactamase *B. cereus* que foi truncada na extremidade do terminal de amino, antes do segundo filamento beta, imediatamente em frente a um resíduo de ácido glutâmico E. Em particular, o construto de nucleotídeo compreende os nucleotídeos sequenciais 94 - 756 de SEQ ID NO: 2.

O comprimento da região do terminal de amino sem estrutura rígida varia entre os grupos metalo-beta-lactamase e dentro de cada sub-classe. As metalo-beta-lactamases de *Bacillus spp* também possuem variações na sequência do terminal de amino, antes da segunda fita beta, mas a maioria das enzimas têm um ácido glutâmico (E) conservado na posição +12 (veja a Tabela 1). Conseqüentemente, a eliminação acoplada com a inser-

- ção de KT adjacente a E pode ser aplicada aos *Bacillus* metalo-beta-lactamases conhecidos, caso em que os primeiros aminoácidos de terminal amino onze são eliminados da extremidade de terminal N- da proteína de beta-lactamase madura de ocorrência natural. De acordo com uma modalidade específica da invenção, a beta-lactamase é truncada entre os aminoácidos KT e E, e especialmente entre VIKN e E₁ ou VMKN e E.

Tabela 1. Comparação das sequências de terminal amino entre metallo-beta-lactamases de *Bacillus* sp e P2A.

Proteína	Cepa de <i>Bacillus</i>	Região do terminal de amino *
P2A	<i>S. cereus</i> 98ME1552	EQKLEQIVIKN ETGTISISQ LNK
Q2AJV1	<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4	EQKLEQKVIKN ETGTISISQ LNK
P10425	<i>Bacillus</i> sp. (cepa 170)	SQKVEQIVIKN ETGTISISQ LNK
Q734F3	<i>B. cereus</i> ATCC 10987	EQKLEQKVIKN EAGTISISQ LNK
P04190	<i>B. cereus</i> 569/H	SQKVEKTVIKN ETGTISISQ LNK
Q81AW2	<i>B. cereus</i> ATCC 14579 / DSM 31	SQKVEKTVIKN ETGTISISQ LNK
Q93T40	<i>B. anthracis</i> Sterne	ERKVEHKVIKN ETGTISISQ LNK
Q6SPY5	Resistente à penicilina <i>B. anthracis</i>	ERKVEHKVIKN ETGTISISQ LNK
Q4MXZ5	<i>B. cereus</i> G9241	SQKVEQKVMKN JAGTISISC 2LNK
P14488	<i>B. cereus</i> 5/B/6	ERTVEHKVIKN ETGTISISQ LNK
Q6H FY5	<i>S. thuringiensis</i> 97-27	ERTVEHKVIKN ITGTISISC 2 —LNK

- * As substituições de aminoácidos estão em negrito e o ácido glutâmico (E) conservador está sombreado. O primeiro filamento beta para as metalo-beta-lactamases é uma vez sublinhado, e o segundo filamento beta é sublinhado duas vezes.

- De acordo com a modalidade específica da invenção E - Δ BL tem pelo menos 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 % de identidade para a sequência de aminoácidos de resíduos de aminoácido sequencial 6-221 de SEQ ID NO: 3. A identidade da sequência pode ser determinada usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tools [Ferramentas de Pesquisa de Alinhamento Local Básico]) como descrito em Altschul et al ., 1997. Em particular E - Δ BL é uma forma truncada de uma metalo- beta-lactamase tendo a sequência descrita como SEQ ID NO: 1, ou uma variante ativa de beta- lacta-

mase ou fragmento da mesma. Ela pode por exemplo ser uma forma trunca-
da de metalo-beta-lactamase *B. cereus* BcII. Preferivelmente, E - Δ BL tem
uma extremidade de terminal de amino que corresponde aos resíduos de
aminoácidos 12-15, 12-19, ou 12-23 de SEQ ID NO: 1, com a adição de que
5 aquela do aminoácido na posição + 13 pode ser ou T (treonina) ou A (alani-
na).

Por uma sequência de aminoácidos que é uma "variante" de
uma sequência de aminoácidos específica se quer dizer uma sequência de
aminoácido que não é idêntica à sequência de aminoácidos específica, mas
10 contém pelo menos algumas trocas de aminoácidos, isto é, eliminações,
substituições, inversões, inserções etc. que não afetam essencialmente a
atividade biológica da proteína quando comparadas àquelas da sequência
de aminoácidos específica. Atividade biológica neste contexto refere-se à
atividade de beta- lactamase. Uma variante pode ser um polipeptídeo que
15 ocorre naturalmente, por exemplo, como uma variante alélica dentro do
mesmo filamento, espécie ou joelho, ou ela pode ter sido gerada por muta-
gênese.

Entende-se por "fragmento" como sendo parte de uma sequên-
cia de aminoácidos específica que é longa o suficiente para ter a atividade
20 biológica desejada, isto é, atividade de beta- lactamase. Em outras palavras
o fragmento pode ser, por exemplo, uma subsequência das beta-lactamases
especificamente descritas.

O construto de nucleotídeo que codifica NH_2 - K - T - E - Δ BL-
COOH pode ser inserido em um vetor de expressão, e transformado em uma
25 célula hospedeira. A célula hospedeira é depois cultivada sob condições que
permitem a modificação da expressão e pós- traducional da proteína em NH_2
- E - Δ BL-COOH, que dessa maneira pode ser obtida em forma substancial-
mente pura, que significa que pelo menos 90 %, e preferivelmente pelo me-
nos 95 %, em particular pelo menos 99 % de metalo-beta- lactamase está
30 presente em uma forma única como NH_2 - E - Δ BL-COOH. A modificação
traducional da proteína expressa, isto é, a clivagem do dipeptídeo KT é cata-
lisada pelas proteases do hospedeiro. O hospedeiro pode ser eucariótico ou

pró- cariótico, tal como uma célula bacteriana, levedo ou fungo. O hospedeiro bacteriano pode ser, por exemplo, *Escherichia coli*. Preferivelmente o hospedeiro pertence ao *Bacillus spp*, e em particular é *B. licheniformis* ou *B. subtilis*. De acordo com uma modalidade preferida, a NH₂ - K - T - E - ΔBL-COOH é expressa como uma proteína compreendendo um peptídeo de sinal, desse modo a proteína é secretada em meio de cultura, e o peptídeo de sinal é primeiro clivado, e depois o dipeptídeo. Outras mudanças menores tais como desamidação, oxidação, rompimento ou formação de ligação de dissulfeto, isomerização, succinimidação, ligação cruzada de não-dissulfeto, reação de Maillard, desglicosilação pode ocorrer na proteína durante o processo de produção ou armazenamento, e são aceitáveis desde que a atividade de beta-lactamase não seja afetada significativamente.

A beta-lactamase NH₂ - E - ΔBL-COOH modificada por qualquer bactéria capaz de produzir uma metalo-beta-lactamase. Tais bactérias são exemplos bactérias de *Enterobacteriae genus* (*Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cifrobacter freudii*, *Shigella flexneri*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenobacterium maltophila*, *Acinetobacter genus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus cereus*, *Flavobacterium odoratum*, and *Bacteroides fragilis*. Outras possíveis fontes são as espécies de *Aeromonas*, *Legionella* e *Stenotrophomonas*. A enzima é truncada na extremidade do terminal de amino e a proteína da enzima madura anterior ao segundo filamento beta em uma posição resultando em E como o aminoácido de terminal N-. Se não houver resíduo apropriado E na beta- lactamase bacteriana, somente a parte de ΔBL pode ser obtida da bactéria, dessa maneira um tripeptídeo KTE é acoplado na frente de ΔBL para formar a proteína NH₂ - K - T - E - ΔBL-COOH. Preferivelmente, a beta-lactamase modificada é derivada de *Bacillus*, e especialmente de *B. cereus*. Em particular ela é uma beta-lactamase *B. cereus* a partir da qual os primeiros aminoácidos de terminal N onze da proteína de beta- lactamase madura não modificada foi eliminada.

A beta-lactamase modificada da invenção pode ser misturada com quaisquer excipientes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis para formar uma composição farmacêutica. Uma quantidade eficaz de beta-

lactamase modificada de eliminação do efeito adverso de antibióticos de beta-lactama no intestino é depois administrada oralmente para uma pessoa que está sendo tratada com um ou mais antibióticos de beta-lactama. A preparação de beta-lactamase pode ser administrada antes, simultaneamente com, ou depois do tratamento antibiótico. Ela é insensível aos inibidores beta-lactamase serina, e pode dessa maneira ser usada para eliminar o antibiótico na presença e na ausência de tais inibidores.

A invenção é ilustrada pelos exemplos não limitantes a seguir. Deverá ficar entendido, entretanto, que as modalidades dadas na descrição acima e nos exemplos são para fins ilustrativos somente, e que diversas mudanças e modificações são possíveis dentro do escopo da invenção.

Exemplo 1. Materiais e métodos

Filamentos bacterianos e condições de crescimento

Os filamentos bacterianos e seus genótipos e fenótipos relevantes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Filamentos bacterianos e seus genótipos e fenótipos relevantes

Filamento	Genótipo relevante	Fenótipo relevante
<i>Bacillus subtilis</i> RS303	<i>trpC2, sigG::cat</i> (Δ <i>sigG</i>)	Triptofan Auxotrófico, Asporogênico
<i>Bacillus subtilis</i> IH6140	<i>sacA321</i>	Nível de exoprotease reduzido
<i>Bacillus subtilis</i> RS314	<i>trpC2, sigG::cat, (Δ <i>sigG</i>)</i> construto de expressão pRSH314 codificando a metalo-beta-lactamase truncada	Triptofan auxotro- fo, asporogênico, se- creta metalo-beta- lactamase
<i>Bacillus subtilis</i> RS315	<i>trpC2, sigG::cat, (Δ <i>sigG</i>)</i> construto de expressão pRSH315 codificando a metalo-beta-lactamase completa	Triptofan auxotro- fo, asporogênico, se- creta metalo-beta- lactamase
<i>Bacillus subtilis</i> RS315	<i>trpC2, sigG::cat, (Δ <i>sigG</i>)</i>	Triptofan auxotro-

Filamento	Genótipo relevante	Fenótipo relevante
	construto de expressão pRSH317 codificando a metalo-beta-lactamase truncada	fo, asporogênico, secreta metalo-beta-lactamase
<i>Bacillus cereus</i> 98ME1552		Multiresistente à vários beta-lactamas

As bactérias foram de um modo geral cultivadas em meio de Lúria complexa (5 gramas de extrato de levedo, 10 gramas de triptona e 10 gramas de cloreto de sódio por litro) suplementado com antibióticos apropriados como agentes de seleção em modo de frasco agitado a +37°C. Um meio de cultura sintética suplementado com antibiótico apropriado foi usado em fermentações. Um meio sintético modificado foi usado para gerar células de *Bacillus subtilis* adequadas. A composição detalhada desses meios está descrita no WO03/040352.

Técnicas de DNA

Técnicas convencionais de DNA incluindo, por exemplo, restrições, eletroforese e ligações de agarose gel, foram realizadas de acordo com Sambrook e Russell (2001). O DNA cromossomal foi isolado pelo método de Marmur (Marmur, 1961). O plasmídeo de DNA foi isolado por Midi Kit de plasmídeo Qiagen de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen Plasmid Purification Handbook, 1999), mas o tratamento de lisozima (1 mg/ml) foi adicionado ao protocolo a fim de degradar a camada de peptidoglicano. A lisozima foi suplementada para o tampão P1 e as células foram incubadas a 37°C por 30 minutos.

O PCR geralmente foi executado de acordo com os protocolos descritos no WO03/040352.

Caracterização da região de terminal de amino de várias formas de metalo-beta-lactamase

Para determinações da sequência de aminoácidos de terminal N- e espectrometria de massa, amostras de metalo-beta-lactamase purificadas foram submetidas à cromatografia de fase reversa e as enzimas foram

fracionadas em um gradiente linear de 0,1 % de TFA e 0,075 % de TFA- acetonitrila de 0% a 100 % por 60 minutos.

As sequências de terminal NH₂- de formas de metalo-beta-lactamase foram determinadas pela degradação Edman automática com um Applied Biosystems modelo 494A Proteína Sequenator.

As análises de massa das formas de metalo-beta-lactamase foram realizadas por um instrumento de tempo-de-vôo-tetrapolar (Q-TOF) híbrido. Supõe-se que as variantes de metalo-beta-lactamase provêm potenciais de ionização comparáveis que têm sido utilizadas nas avaliações de suas proporções relativas nas amostras. As sequências de nucleotídeos dos genes beta-lactamase foram determinadas pelo método de terminação de cadeia de dideoxi com um sequenciador de DNA automático.

Exemplo 2. A sequência completa de nucleotídeos de gene metalo-beta-lactamase de *Bacillus cereus* 98ME1552.

A determinação de gene completa que codifica metalo-beta-lactamase foi sequencialmente realizada usando técnicas de PCR e Vectorette. Parte do gene estrutural foi expandida através de PCR, com DNA cromossomal isolado de um *B. cereus* 98ME1552 como um gabarito, com os iniciadores projetados para hibridizar para a região de codificação de SQKVEKTVI (iniciador avançado) e região de c codificação de HTLDLL (iniciador reverso) do gene metalo-beta-lactamase de *Bacillus cereus* 569/H. Ambos os iniciadores também contêm os sítios de restrição Hind III. O fragmento de DNA amplificado (cerca de 700 pb) foi fragmentado com Hind III e ligado ao sítio Hind III de um vetor de secreção pKTH141. As células adequadas do *Bacillus subtilis* 1H6140 foram transformadas com uma mistura de ligação. Um clone que abriga um plasmídeo expressando metalo-beta-lactamase foi verificado seqüenciando o DNA. O plasmídeo foi chamado de pRSH314. Células adequadas de *B. subtilis* RS303, preparadas como descrito em WO03/04052, foram transformadas com pRSH314 tendo como resultado o filamento *B. subtilis* RS314.

A sequência completa de genes metalo-beta-lactamase foi determinada a partir de fragmentos de PCR obtidos empregando a técnica de

Vectorette a seguir: O DNA cromossomal do *Bacillus cereus* 98ME1552 foi fragmentado com enzima de restrição Hind III e ligado ao Vettorettell Hind III tratado. A biblioteca Vettorette obtida foi rastreada em uma reação de PCR através do emprego de MEBLSQ-F (S'-AGGAAATGTTGCGGATGC) ou
 5 MEBLSQ-R (S'-CCTTCGTTAATTTGTTATCCC) iniciando os iniciadores projetados a partir da sequência de DNA obtida de 700 pb de pRSH314.

O rastreamento de PCR da biblioteca Vettorette com o iniciador MEBLSQ-F gerou um fragmento de cerca de 1000 pb (fragmento MEBL1), e com o iniciador MEBLSQ-R um fragmento de cerca de 1100 pb (fragmento
 10 MEBL2). Ambos os fragmentos, MEBL1 e MEBL2, foram purificados com gel de agarose depois da eletroforese. A sequência de nucleotídeos de ambos os fragmentos foi determinada seqüenciando o DNA resultando no nucleotídeo completo do gene metalo-beta-lactamase de *B. cereus* 98ME1552. O nucleotídeo completo e a sequência de aminoácidos deduzida do gene me-
 15 talo-beta-lactamase *B. cereus* 98ME1552 é apresentada na Figura 1. A sequência de aminoácidos está também referida como SEQ ID NO: 1. A estrutura de leitura aberta codifica um polipeptídeo de aminoácido 257, cuja sequência de terminal amino (30 resíduos de aminoácidos) exhibe características típicas daquelas de um peptídeo bacteriano de sinal que alveja a secre-
 20 ção de proteína por toda a membrana citoplásmica, através de uma via secretora geral. O sítio de clivagem de peptidase de sinal previsto está depois de alanina, na posição de -30 (veja a Figura 1.). A massa molecular calculada e o valor de pi da proteína, de resíduos de aminoácidos 227 madura é 24 877,3 Da e 6,0, respectivamente. A sequência de metalo- beta-lactamase
 25 98ME1552 foi usada como um gabarito de pesquisa em uma pesquisa de BLAST a fim de identificar a proteína. A pesquisa de BLAST foi realizada usando a Rede de Serviços SIB BLAST do Instituto Suíço de Bioinformática (Swiss Institute of Bioinformatics) (<http://www.expasy.org/tools/blast/>). A pesquisa foi feita contra um banco de dados com base em UniProtKB Knowled-
 30 ge, usando o programa NCBI BLASTP 2.2.13 program (Altschul et al., 1997) com o algoritmo de BLOSUM62 e 11 pontos de intervalo para existência e 1 para prolongamento. A pesquisa de BLAST realizado com metalo- beta-

lactamase 98ME1552 deu a mais alta similaridade classificada com outras beta- lactamases de classe B do subgrupo B1. Como esperado, a beta- lactamase de 98ME1552 exibiu um alto grau de identidade (mais de 90 %) com outras beta- lactamases de *B.cereus*. De acordo com o alinhamento

5 estrutural de várias metalo- beta-lactamase de *B. cereus*, as substituições de aminoácidos em lactamase de *B. cereus* 98ME 1552 são prognosticadas para se localizarem em regiões não essenciais para a função da enzima.

Exemplo 3. Clonagem e expressão do gene metalo- beta-lactamase de *B.cereus* 98ME 1552 no *Bacillus subtilis*

10 Com base nas sequências de DNA obtidas a partir dos iniciadores da biblioteca de Vectors, novos iniciadores, BLC1-F (5'-CGCGAAGCTTCCGAACAAAAGCTAGAGCAAATAGTAATC), e BLC1-R (5'-GCCGAAGCTTTTATTTTAATAAATCCAATGTATGTAAAAGTAATCCC)

15 foram projetados para gerar um inserção de DNA codificando a metalo-beta-lactamase completa em PCR. Os iniciadores também carregaram sítios de Hind III- em suas extremidades e o DNA cromossomal purificado *B. cereus* 98ME1552 foi usado como um gabarito. O fragmento de PCR ampliado de cerca de 0,7 kb foi fragmentado com Hind III, e ligado ao sítio Hind III de um

20 vetor de secreção pKTH141. Células de *Bacillus subtilis* RS303 adequadas foram transformadas pela mistura de ligação. Um clone positivo foi designado RS315 e o construto de expressão de abrigo foi chamado de PRSH315.

O construto de expressão pRSH315 foi isolado e a região de inserção foi sequenciada. O nucleotídeo e as sequências de aminoácidos

25 deduzidos do gene de metalo-beta-lactamase clonado eram idênticos àqueles determinados pela biblioteca Vectors. A sequência de DNA determinada revelou na fusão de estrutura entre a sequência de nucleotídeos codificando uma sequência longa de sinais de aminoácidos 31 de *Bacillus amylo-liquefaciens* alfa amilase, o sítio de clonagem Hind III e o gene de metalo-

30 beta-lactamase *B.cereus* 98ME1552 completo (veja a Figura 2.). Existe o prognóstico da peptidase de sinal cortar a ligação de peptídeo entre alanina (A) na posição de -1 e glutamina (Q) na posição de +1. A metalo- beta-

lactamase madura possui uma extensão de terminal NH_2 - de um tripeptídeo NH_2 -QAS- que é derivado do sítio de clonagem Hind III no construto da expressão. Em consequência, com base na sequência de aminoácido deduzida a metalo-beta- lactamase modificada madura é compreendida de 230
5 resíduos de aminoácidos.

Exemplo 4. Determinação da sequência de aminoácidos do terminal de amino de variantes metalo-beta-lactamase obtidas a partir de um sistema de produção de *Bacillus subtilis*

Para uma caracterização adicional, a metalo-beta- lactamase
10 recombinante foi produzida em cultivos realizados em frasco de agitação ou fermentação, usando um meio de crescimento sintético. A metalo-beta-lactamase foi eficazmente secretada em uma sobrenadante de cultura. A enzima foi purificada a partir da sobrenadante de cultura concentrada por cromatografia de troca de íons. A atividade de enzima foi observada em du-
15 as frações separadas. Frações de enzima purificada foram submetidas para a sequência de terminal NH_2 -, e análise de espectrometria de massa. As análises revelaram que ambas as frações compreendem formas de enzimas com terminação de amino heterogêneo. As várias formas de enzima e suas proporções relativas são apresentadas na Tabela 3. Em relação à sequência
20 de aminoácidos deduzidos, todas as formas de enzima têm eliminações de vários comprimentos em suas regiões de terminal NH_2 -. Em geral, o octapeptídeo NH_2 -QASEQKLE parece estar eliminado em todas as formas de enzima. Além disso, a menor forma de enzima na fração 2 não tem um pentapeptídeo adicional IVIKN-. A micro-heterogeneidade observada na região
25 de terminal NH_2 - pode ser explicada como modificações pós-traducionais causadas pela ação de várias proteases de célula hospedeira.

Tabela 3. Sequências de terminal de amino deduzidas e determinadas e massa molecular determinada de formas metalo-beta-lactamase truncadas

Fun- ção de N:o	Sequência de aminoá- cido de terminal NH_2 deduzida	Sequência de a- minoácido de ter- minal NH_2 deter- minada	Propor- ção re- lativa de formas	Massa deter- minada (kDa)
-----------------------	--	--	---	------------------------------------

			de en- zima em fra- ções (%)	
	NH ₂ - QASEQKLEQIVIK- NETGTI			
1		NH ₂ -IVIKNETGTI	100	24.122
2		NH ₂ -NETGTI	60	23.668
2		NH ₂ -ETGTI	40	23.554

Exemplo 5. Construção de forma metalo- beta-lactamase eliminada de *Bacillus cereus* 98ME1552 e suas variantes de terminal amino em um sistema de produção de *Bacillus subtilis*

A fim de tentar reduzir a heterogeneidade de terminal IMH2- a
 5 sequência de DNA que codifica a região variável de NH₂-EQKLEQIVIKN do
 gene de metalo-beta- lactamase foi deletado por PCR. O gene completo me-
 talo-beta-lactamase de *B. cereus* 98ME1552 foi usado como um gabarito em
 PCR com um iniciador dianteiro hibridizando para uma sequência de codifi-
 cação de ETGTISISQ, e um iniciador reverso hibridizando para uma se-
 10 quência de codificação de GLLLHTLDLLK seguida por uma tradução de um
 códon de terminação TAA. Ambos os iniciadores conduziram sítios Hind III.

O fragmento de PCR obtido de cerca de 0,7 kb foi clonado em
 um sítio Hind III do vetor de secreção pKTH141 e o filamento de *B.subtilis*
 RS303 adequada foi transformado pela mistura de ligação. A eliminação do
 15 terminal NH₂- foi verificada por sequenciamento do DNA do gene metalo-
 beta-lactamase inserido do construto de expressão isolado de um clone po-
 sitivo. O filamento transformador foi chamado de *Bacillus subtilis* RS317 e o
 construto de expressão foi chamado de pRSH317.

A metalo-beta-lactamase truncada foi produzida em um hospe-
 20 deiro de produção de *Bacillus subtilis*, e a enzima foi purificada a partir da
 sobrenadante de cultura empregando cromatografia de troca de íon da qual

- a enzima ativa foi depurada como uma fração única. A fração de enzima foi submetida ao sequenciamento de aminoácido de terminal NH_2 - e análise de massa molecular. Os resultados observados (na Tabela 4) mostraram que a metalo-beta-lactamase truncada também apareceu como uma proteína com uma terminação de amino heterogênea. A principal variante de enzima possui uma sequência de terminal de amino idêntica àquela da sequência de aminoácidos deduzida incluindo o sítio Hind III codificando a iniciação de QAS-tripeptídeo. Uma variante menor foi encontrada como tendo uma eliminação de um QA- dipeptídeo. Devido ao bloqueio do terminal de amino, nenhuma sequência de aminoácido foi recebida de uma variante. O bloqueio do terminal de amino é provável que seja o resultado de ciclização de resíduo de glutamina para formar um resíduo de piroglutamila durante o processo de produção. Para concluir, a eliminação do terminal amino não reduz fundamentalmente a micro-heterogeneidade do terminal amino.
- 15 Tabela 4. Sequências de terminal amino determinadas e massas moleculares de formas de metalo-beta-lactamase truncadas

Função de N:º	Sequência de aminoácido de terminal NH_2 deduzida	Sequência de aminoácido de terminal NH_2 determinada	Proporção relativa de formas de enzima em frações (%)	Massa determinada (kDa)
	NH_2 -QASETGTISI			
1		a. forma cíclica de glutamina → sem sequência de aminoácido		a. 23.823
		b. NH_2 -QASETGTISI	b. 90	b. 23.840
		c. NH_2 -SETGTISI	c. 10	c. 23.641

Exemplo 6. Construção de metalo- beta-lactamase de *Bacillus cereus* 98ME1552 truncado possuindo uma inserção de sequência codificando KT

A fim de evitar a modificação pós-traducional, um truncamento molecular de metalo-beta-lactamase foi projetado para compreender a eliminação da sequência de DNA codificando a região de NH₂-EQKLEQIVIKN junto com a inserção de uma sequência codificando o dipeptídeo KT, localizado diretamente a jusante do sítio de clonagem 3'- Hind III.

Um gene de metalo-beta-lactamase modificado foi criado como no Exemplo 5, exceto para o iniciador anterior, que continha uma sequência de DNA codificando KT. O fragmento de PCR foi cortado com Hind III e ligado ao sítio Hind III do vetor de secreção pKTH141, e as células *B. subtilis* RS303 adequadas foram transformadas pela mistura de ligação. A sequência correta de nucleotídeos do gene metalo-beta-lactamase modificado no construto da expressão foi confirmado sequenciando o DNA. Um clone positivo foi chamado de *Bacillus subtilis* RS318, e o construto da expressão foi chamado de pRSH318. O nucleotídeo e a sequência de aminoácido deduzida da beta-lactamase de *B. cereus* 98ME1552 derivados de pRSH318, são apresentados na Figura 3, e descritos como SEQ ID NO:2 e 3, respectivamente.

A metalo-beta-lactamase truncada foi produzida, purificada e analisada como descrito anteriormente. A metalo enzima ativa truncada foi depurada da coluna como um pico único. A fração única continha metalo-beta-lactamase que possuía um resíduo de ácido glutâmico de terminal amino homólogo (NH₂-E; veja a Tabela 5). Por conseguinte, a inserção do dipeptídeo KT- conduz à modificação pós- traducional resultando em uma sequência de aminoácido de terminal amino uniforme. A metalo-beta-lactamase truncada foi chamada de proteína P2A.

Tabela 5. Sequências de terminal amino deduzidas e determinadas, e a massa molecular determinada da forma de metallo-beta-lactamase truncado

Função de N:o	Sequência de aminoácido de terminal NH ₂ deduzida	Sequência de aminoácido de terminal NH ₂ determinada	Proporção relativa de formas de enzima em frações (%)	Massa determinada (kDa)

	NH ₂ - QASKTETGISI			
1.		a. NH ₂ -ETGISI	a. 100	a. 23554

Exemplo 7. Parâmetros de enzima cinética metalo-beta- lactamase P2A

A diversidade das propriedades catalíticas da enzima P2A foi estudada com vários tipos de beta-lactamas, incluindo a família da penicilina com e sem inibidores beta-lactamase serina, cefalosporinas de segunda e terceira geração, e carbapenemas (meropenema). Os parâmetros de enzima cinética k_{cat} e K_m foram determinados a partir das variações iniciais pelo *plot* de Hanes. As reações foram realizadas em 10 mM de tampão de fosfato, pH 7,0 a 30°C. A cubeta de reação (um mL) continha cerca de 5 pmols de enzima em todas as reações exceto 1,7 pmol de enzima no ensaio de meropenema. A hidrólise de vários substratos de beta-lactamas foi espectrofotometricamente registrada em um comprimento de onda específico para cada substrato.

Os valores para parâmetros cinéticos diferentes (k_{cat} , K_m e k_{cat}/K_m) que representam valores médios obtidos a partir de três medidas independentes estão reportados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de parâmetro cinético para metalo-beta-lactamase P2A

Antibiótico	A proteína P2A		
	K_m (microM)	K_{cat} (1/s)	K_{cat}/K_m (M ⁻¹ x s ⁻¹)
Amicilina	942	1114	1.18x10 ⁻⁶
Ampicilina-sulbactam (Unasym)	1104	1251	1.15x10 ⁻⁶
Amoxicilina	716	980	1.37x10 ⁻⁶
Amoxicilina-ácido clavulânico (Augmentin)	717	990	1.38x10 ⁻⁶
Piperacilina	372	1049	2.82x10 ⁻⁶
Piperacilina-tazobactam (Tazocin)	412	1098	2.67x10 ⁻⁶
Cefuroxima	27	221	7.99x10 ⁻⁶
Cefotaxima	66	479	7.28x10 ⁻⁶

Ceftriaxona	68	95	1.40×10^{-6}
Meropenem	410	480	1.17×10^{-6}

Exemplo 8. Estabilidade da proteína P2A em quimo ileal de ser humano

A resistência às proteases intestinais é um dos fatores mais importantes que afetam a aplicabilidade da proteína P2A como uma substância de fármaco na terapia de beta-lactamase alvejada no intestino delgado. A suscetibilidade da metalo-beta-lactamase para a ação de proteases do intestino delgado foi testada adicionando várias quantidades de enzima ativa em tubos que consistem o quimo ileal do ser humano. A hidrólise da metalo-beta-lactamase foi monitorada medindo a atividade de beta-lactamase de amostras ileais em vários pontos do tempo. O Meropenemo foi empregado como substrato nos ensaios da atividade.

Os resultados obtidos a partir de quatro experimentos independentes e os valores médios são expressos na Tabela 7. A enzima P2A parece ser uma proteína estável, que foi depurada no quimo ileal humano com uma média de vida de 55 minutos (valor médio). Variações altas de médias de vida foram observadas entre os vários experimentos. Entretanto, a média de vida de P2A no quimo do intestino delgado de ser humano tem sido avaliada para ser adequada à aplicação bem sucedida da terapia da enzima P2A para a eliminação da reação adversa induzida por beta-lactama residual nos tratos intestinais.

Tabela 7. Média de vida (*in vitro*) da metalo-beta-lactamase P2A no quimo ileal de ser humano.

Experimento nº	Média de vida (minutos)	Valor médio ($\pm$ SD)
1	60	55 ± 25
2	80	55 ± 25
3	20	55 ± 25
4	60	55 ± 25

Referências

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST e PSI-BLAST: a men generati-

- on of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Ambler, R.P. 1980. The structure de beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 289:321-331.
- Bush, K. 1998. Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clin. Infect. Dis.* 32: 271-276.
- 5 Carfi A, Duee E, Galleni M, Frere JM, and Dideberg O. 1998a. 1.85 Å resolution structure of the zinc (II) beta-lactamase from *Bacillus cereus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 54:313-323.
- Carfi A, Duee E, Paul-Soto R, Galleni M, Frere JM, and Dideberg
 10 O. 1998b. X-ray structure of the ZnII beta-lactamase from *Bacteroides fragilis* in an orthorhombic crystal form.. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 54:45-57.
- Carfi, A., Pares, S., Duee, E., Galleni, M., Duez, C, Frere, J.M., e Dideberg O. 1995. The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from
 15 *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J.* 14:4914-4921.
- Concha, N.O., Janson, C.A., Rowling, P., Pearson, S., Cheever, CA, Clarke, B.P., Lewis, C, Galleni, M., Frere, J.M., Payne, D.J., Bateson, J.H., and Abdel-Megurd, S.S. 2000. Crystal structure of the MPI metallo beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercapto-
 20 carboxylate inhibitor: building determinants of a potent broad-spectrum inhibitor. *Biochemistry.* 39:4288-4298.
- Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G.M., Spencer, J., Dideberg, O., e Frere, J.M. 2001. Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. Metallo-beta-lactamases para beta-lactamases classe B.
 25 *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:660-663
- Garau, G., Garcia-Saez, I., Bebrone, C, Anne, C, Mercuri, P., Galleni, M., Frere, J.M., and Dideberg, O. 2004. Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemo-*
 ther. 48:2347-2349. of Garau, G., Bebrone, C, Anne, C, Galleni, M., Frere,
 30 J.M., Dideberg, O. 2005. A metallo-beta-lactamase in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol.* 345:785-795.

Harmoinen, J., Mentula, S., Heikkilä, M., van der Rest M., Rajala-Schultz, P.J., Donskey, C.J., Frias, R., Koski, P., Wickstrand, N., Jousimies-Somer, H., Westermarck, E., Lindevall, K. 2004. Oral Targeted Recombinant Beta-Lactamase Prevents Ampicillin-Induced Selective Pressure on the Gut Microbiota: A Novel Approach to Reduce Antimicrobial Resistance Antimicrob. Agents and Chemotherapy. 48: 75-79.

Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organism. J. Mol. Biol, 3: 208-218.

Mentula, S., Harmoinen, J., Koski, P., Westermarck, E., Huovinen, P., and Kõnonen, E. 2004. Inhibition of ampicillin-induced emergence of resistance in intestinal coliforms by targeted recombinant beta-lactamase. Int.J.Antimicrob.Agents. 24:555-561.

Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press Cold Spring Harbour, New York.

Stiefel, U., Pultz, N.J., Harmoinen, J., Koski, P., Lindevall, K., Helfand, M.S., Donskey, C.J. 2003. Oral beta-lactamase preserve colonization resistance of piperacilin-treated mice. J Infect Dis. 10: 1605-1609.

Stiefel, U., Harmoinen, J., Koski, P., Kaariainen, S., Wickstrand, N., Lindevall, K., Pultz, N.J., Bonomo, R.A., Helfand, M.S., and Donskey, C.J. 2005. Orally administered recombinant metallo-beta-lactamase preserves colonization resistance of piperacilin-tazabactam-treated mice. Antimicrob. Agents Chemother.49: 5190-5191.

Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., and Nordmann, P. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 18:306-325

Listagem de Sequência

<110> Terapias IPSAT
 <120> Beta-lactamase modificada e método para sua preparação
 <130> 2061011
 5 <160> 3
 <170> PatentIn versão 3.2
 <210> 1
 <211> 257
 <212> PRT
 10 <213> Bacillus cereus
 <220>
 <221> mat_peptídeo
 <222> (31)..(257)
 <400> 1
 15 Met Lys Lys Asn Thr Leu Leu Lys Leu Gly Val Cys Val Ser Leu Leu
 -30 -25 -20 -15
 Gly Ile Thr Gln Phe Val Ser Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Gln
 -10 -5 -1 1
 Lys Leu Glu Gln Ile Val Ile Lys Asn Glu Thr Gly Thr Ile Ser Ile
 20 5 10 15
 Ser Gln Leu Asn Lys Asn Val Trp Val His Thr Glu Leu Gly Tyr Phe
 20 25 30
 Asn Gly Glu Ala Val Pro Ser Asn Gly Leu Val Leu Asn Thr Ser Lys
 35 40 45 50
 25 Gly Leu Val Leu Val Asp Ser Ser Trp Asp Asn Lys Leu Thr Lys Glu
 55 60 65
 Leu Ile Glu Met Val Glu Lys Lys Phe Gln Lys Arg Val Thr Asp Val
 70 75 80
 Ile Ile Thr His Ala His Ala Asp Arg Ile Gly Gly Ile Thr Ala Leu
 30 85 90 95
 Lys Glu Arg Gly Ile Lys Ala His Ser Thr Ala Leu Thr Ala Glu Leu
 100 105 110

```

Ala Lys Asn Ser Gly Tyr Glu Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gln Thr Ile
115              120              125              130
Thr Ser Leu Lys Phe Gly Asn Thr Lys Val Glu Thr Phe Tyr Pro Gly
              135              140              145
5  Lys Gly His Thr Glu Asp Asn Ile Val Val Trp Leu Pro Gln Tyr Gln
              150              155              160
Ile Leu Ala Gly Gly Cys Leu Val Lys Ser Ala Glu Ala Lys Asp Leu
              165              170              175
Gly Asn Val Ala Asp Ala Tyr Val Asn Glu Trp Ser Thr Ser Ile Glu
10  180              185              190
Asn Val Leu Lys Arg Tyr Gly Asn Ile Asn Ser Val Val Pro Gly His
195              200              205              210
Gly Glu Val Gly Asp Lys Gly Leu Leu Leu His Thr Leu Asp Leu Leu
              215              220              225
15  Lys
    <210>  2
    <211>  759
    <212>  DNA
    <213>  Bacillus cereus
20  <220>
    <221>  sig_ peptideo
    <222>  (1)..(93)
    <220>
    <221>  CDS
25  <222>  (1)..(756)
    <220>
    <221>  mat_peptideo
    <222>  (94)..(756)
    <400>  2
30  atg att caa aaa cga aag cgg aca gtt tcg ttc aga ctt gtg ctt atg
    48
    Met Ile Gln Lys Arg Lys Arg Thr Val Ser Phe Arg Leu Val Leu Met

```

```

      -30              -25              -20
tgc acg ctg tta ttt gtc agt ttg ccg att aca aaa aca tca gcg caa
96
Cys Thr Leu Leu Phe Val Ser Leu Pro Ile Thr Lys Thr Ser Ala Gln
5  -15              -10              -5              -1  1
gct tcc aaa aca gag acg gga acc att tca ata tct cag tta aac aag
144
Ala Ser Lys Thr Glu Thr Gly Thr Ile Ser Ile Ser Gln Leu Asn Lys
      5              10              15
10 aat gta tgg gtt cat acg gag tta ggt tat ttt aat gga gaa gca gtt
192
Asn Val Trp Val His Thr Glu Leu Gly Tyr Phe Asn Gly Glu Ala Val
      20              25              30
15 cct tcg aac ggt cta gtt ctt aat act tct aaa ggg cta gta ctt gtt
240
Pro Ser Asn Gly Leu Val Leu Asn Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Val
      35              40              45
20 gat tct tct tgg gat aac aaa tta acg aag gaa cta ata gaa atg gta
288
Asp Ser Ser Trp Asp Asn Lys Leu Thr Lys Glu Leu Ile Glu Met Val
50              55              60              65
gaa aag aaa ttt cag aag cgc gta acg gat gtc att att aca cat gcg
336
Glu Lys Lys Phe Gln Lys Arg Val Thr Asp Val Ile Ile Thr His Ala
25              70              75              80
cac gct gat cga att ggc gga ata aca gcg ttg aaa gaa aga ggc att
384
His Ala Asp Arg Ile Gly Gly Ile Thr Ala Leu Lys Glu Arg Gly Ile
      85              90              95
30 aaa gcg cat agt aca gca tta acc gca gaa cta gca aag aac agt gga
432
Lys Ala His Ser Thr Ala Leu Thr Ala Glu Leu Ala Lys Asn Ser Gly

```

```

      100              105              110
tat gaa gag ccg ctt gga gat tta caa aca att acg agt tta aag ttt
480
Tyr Glu Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gln Thr Ile Thr Ser Leu Lys Phe
5      115              120              125
ggc aat aca aaa gta gaa acg ttc tat cca ggg aaa gga cat aca gaa
528
Gly Asn Thr Lys Val Glu Thr Phe Tyr Pro Gly Lys Gly His Thr Glu
130              135              140              145
10    gat aat att gtt gtt tgg ttg cca caa tat caa att tta gct gga ggc
576
Asp Asn Ile Val Val Trp Leu Pro Gln Tyr Gln Ile Leu Ala Gly Gly
      150              155              160
tgt tta gta aaa tct gcg gaa gct aaa gat tta gga aat gtt gcg gat
15    624
Cys Leu Val Lys Ser Ala Glu Ala Lys Asp Leu Gly Asn Val Ala Asp
      165              170              175
gcg tat gta aat gaa tgg tct aca tcg att gag aat gtg ctg aag cga
672
20    Ala Tyr Val Asn Glu Trp Ser Thr Ser Ile Glu Asn Val Leu Lys Arg
      180              185              190
tat gga aat ata aat tcg gta gta cct ggt cat gga gaa gta gga gac
720
Tyr Gly Asn Ile Asn Ser Val Val Pro Gly His Gly Glu Val Gly Asp
25    195              200              205
aag gga tta ctt tta cat aca ttg gat tta tta aaa taa
759
Lys Gly Leu Leu Leu His Thr Leu Asp Leu Leu Lys
210              215              220
30    <210> 3
      <211> 252
      <212> PRT

```

<213> Bacillus cereus
 <400> 3
 Met Ile Gln Lys Arg Lys Arg Thr Val Ser Phe Arg Leu Val Leu Met
 -30 -25 -20
 5 Cys Thr Leu Leu Phe Val Ser Leu Pro Ile Thr Lys Thr Ser Ala Gln
 -15 -10 -5 -1 1
 Ala Ser Lys Thr Glu Thr Gly Thr Ile Ser Ile Ser Gln Leu Asn Lys
 5 10 15
 Asn Val Trp Val His Thr Glu Leu Gly Tyr Phe Asn Gly Glu Ala Val
 10 20 25 30
 Pro Ser Asn Gly Leu Val Leu Asn Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Val
 35 40 45
 Asp Ser Ser Trp Asp Asn Lys Leu Thr Lys Glu Leu Ile Glu Met Val
 50 55 60 65
 15 Glu Lys Lys Phe Gln Lys Arg Val Thr Asp Val Ile Ile Thr His Ala
 70 75 80
 His Ala Asp Arg Ile Gly Gly Ile Thr Ala Leu Lys Glu Arg Gly Ile
 85 90 95
 Lys Ala His Ser Thr Ala Leu Thr Ala Glu Leu Ala Lys Asn Ser Gly
 20 100 105 110
 Tyr Glu Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gln Thr Ile Thr Ser Leu Lys Phe
 115 120 125
 Gly Asn Thr Lys Val Glu Thr Phe Tyr Pro Gly Lys Gly His Thr Glu
 130 135 140 145
 25 Asp Asn Ile Val Val Trp Leu Pro Gln Tyr Gln Ile Leu Ala Gly Gly
 150 155 160
 Cys Leu Val Lys Ser Ala Glu Ala Lys Asp Leu Gly Asn Val Ala Asp
 165 170 175
 Ala Tyr Val Asn Glu Trp Ser Thr Ser Ile Glu Asn Val Leu Lys Arg
 30 180 185 190
 Tyr Gly Asn Ile Asn Ser Val Val Pro Gly His Gly Glu Val Gly Asp
 195 200 205

Lys Gly Leu Leu Leu His Thr Leu Asp Leu Leu Lys

210

215

220

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína metalo-beta-lactamase modificada, caracterizada pelo fato de que apresenta a fórmula geral:



5 na qual

K é lisina

T é treonina

E é ácido glutâmico, e

10 ΔBL é uma proteína metalo-beta-lactamase que foi truncada na extremidade do terminal de amino de maneira a deixar quatro filamentos beta- antes da primeira alfa-hélice da estrutura secundária predita da dita proteína.

2. Molécula de nucleotídeo isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína metalo-beta-lactamase como definida na reivindicação 1.

3. Molécula de nucleotídeo de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que compreende nucleotídeos sequenciais 94-756 de SEQ ID NO:2.

4. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que contém a molécula de nucleotídeo como definido na reivindicação 2.

5. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de ser capaz de expressar a proteína metalo-beta-lactamase codificada pela molécula de nucleotídeo como definida na reivindicação 2.

6. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que secreta a dita proteína metalo-beta-lactamase.

7. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizada pelo fato de que é *Bacillus spp*, especialmente *B. licheniformis* ou *B. subtilis*.

8. Proteína metalo-beta-lactamase modificada, caracterizada pelo fato de que apresenta a fórmula geral



na qual

E é ácido glutâmico, e

5 Δ BL é uma proteína metalo-beta-lactamase que foi truncada na extremidade do terminal de amino de maneira a deixar quatro filamentos beta-antes da primeira alfa-hélice da estrutura secundária prevista da dita proteína.

9. Proteína metalo-beta-lactamase de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que pertence ao subgrupo metalo-beta-lactamases B1.

10 10. Proteína metalo-beta-lactamase de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a beta-lactamase truncada é derivada de *Bacillus spp.*, e especialmente de *B. cereus*.

15 11. Proteína metalo-beta-lactamase de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que E - Δ BL é derivado eliminando os aminoácidos do terminal de amino onze de uma metalo-beta-lactamase madura.

20 12. Proteína metalo-beta-lactamase de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a sequência E - Δ BL tem pelo menos 80 % de identidade para a sequência de resíduos de aminoácidos seqüenciais 6-221 de SEQ ID NO:3.

20 13. Proteína metalo-beta-lactamase de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a sequência E - Δ BL é uma forma truncada de uma metalo-beta-lactamase que tem a sequência descrita como SEQ ID NO:1, ou uma variante ativa de beta-lactamase ou fragmento da mesma.

25 14. Proteína metalo-beta-lactamase de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que E - Δ BL é derivado pela truncamento de uma metalo-beta-lactamase entre os aminoácidos KN e E.

30 15. Método para preparar uma proteína metalo-beta-lactamase modificada, caracterizado pelo fato de que compreende fazer a cultura de uma célula hospedeira como definida na reivindicação 5 sob condições que permitem a expressão de uma metalo-beta-lactamase que apresenta a fórmula geral:

NH_2 - K - T - E - $\Delta\text{BL-COOH}$,

na qual

K é lisina

T é treonina

5 E é ácido glutâmico, e

ΔBL é uma proteína metalo-beta-lactamase que foi truncada na extremidade do terminal de amino de maneira a deixar quatro filamentos beta- antes da primeira alfa-hélice da estrutura secundária prevista da dita proteína, e conduzir a modificação pós-traducional resultando em uma metalo-beta-lactamase modificada que apresenta a fórmula geral:

NH_2 - E - $\Delta\text{BL-COOH}$,

na qual E e ΔBL são como definido acima, e

opcionalmente isolando e purificando a proteína modificada pós-traducionalmente obtida.

15 16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a proteína metalo-beta-lactamase é expressa em uma forma que compreende uma sequência de sinal, de maneira que a proteína é secretada a partir da célula hospedeira.

20 17. Método de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que a proteína é produzida em *Bacillus spp.* Especialmente em *B. licheniformis* ou *S. subtilis*.

18. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender a proteína metalo- beta-lactamase modificada como definida na reivindicação 8.

25 19. Proteína metalo-beta-lactamase modificada de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de ser usada como um medicamento.

30 20. Uso da proteína metalo-beta-lactamase modificada como definida na reivindicação 8, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para eliminar os efeitos adversos induzidos pelo antibiótico beta-lactama no trato intestinal.

21. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo

fato de que o antibiótico beta-lactama é selecionado a partir do grupo que consiste em cefalosporinas, carbapenemas e penicilinas, cujo antibiótico é para ser eliminado na presença ou ausência de um inibidor contra beta-lactamases serina,

5 22. Método para tratar os efeitos adversos induzidos por antibiótico beta-lactama no trato intestinal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz da proteína metalo-beta-lactamase modificada como definida na reivindicação 8, ou uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 18 para uma pessoa com necessidade
10 da mesma.

23. Método para a produção de uma preparação homogênea de enzima metalo-beta-lactamase, caracterizado pelo fato de que compreende

a) preparar um constructo de expressão que expressa uma proteína que apresenta a fórmula geral: NH_2 - K - T - E - ΔBL -COOH, na qual K
15 é lisina, T é treonina, E é ácido glutâmico, e ΔBL é uma proteína metalo-beta-lactamase que foi truncada na extremidade do terminal de amino de maneira a deixar quatro filamentos beta-antes da primeira alfa-heliz da estrutura secundária prevista da dita proteína,

b) transformar uma célula hospedeira bacteriana com o dito
20 constructo de expressão; e

c) isolar a preparação homogênea de enzima metalo-beta-lactamase produzido pela dita célula hospedeira bacteriana, em que a dita preparação homogênea de enzima metalo-beta-lactamase produzida pela dita célula hospedeira bacteriana é mais homogênea do que uma preparação
25 ção de metalo-beta-lactamase não-truncada sobre condições similares a partir de uma célula hospedeira transformada com um constructo de expressão contendo um gene não-modificado que codifica a metalo-beta-lactamase.

RESUMO

Patente de Invenção **"BETA-LACTAMASE MODIFICADA E MÉTODOS PARA SUA PREPARAÇÃO"**.

5 A invenção refere-se a uma modificação pós-traducional alveja-
da de metalo-beta-lactamase, através do truncamento e inserção de um di-
peptídeo na extremidade do terminal de amino para reduzir a heterogenei-
zado do terminal de amino em um sistema de produção de DNA recombi-
nante. A proteína K-T-E- Δ BL é expressa e modificada pelas proteases hos-
pedeiras para E- Δ BL. Moléculas, vetores e hospedeiros de nucleotídeos a-
10 propriados são também descritos. E- Δ BL é útil em uma composição farma-
cêutica por tratar os efeitos adversos induzidos por antibiótico no intestino de
pacientes tratados com antibióticos beta-lactamas.