

58900

Ref: D 11054/333702

27. NOV. 1987

Patente Nº 86233

1

5

- R E S U M O -

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA VARIANTE DA HIRUDINA"

10

A presente invenção refere-se ao processo de preparação de uma variante da hirudina compreendendo um ácido aminado diferente do ácido aminado da forma natural em posição 47 ou 63. O processo é caracterizado por compreender a fermentação de uma levedura previamente transformada quer por um plasmídeo quer por um bloco funcional de

15

ADN codificando para a variante da hirudina

20

25

30

35

58900

Ref: D 11054/333702

1

5

10

Descrição do objecto do invento  
que  
TRANSGENE S. A., sociedade anónima francesa, industrial, com sede em 16 rue Henri Regnault 92400 COURBEVOIE, França, pretende obter em Portugal, para: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA VARIANTE DA HIRUDINA"

15

O presente invento refere-se a um processo para a preparação de uma variante da hirudina.

20

Na literatura encontram-se descritas pelo menos 3 variantes da hirudina (Markwardt 1970; Petersen e al. 1976; Markwardt e Walsmann 1976; Chang 1983; Dodt e al. 1984, 1985, 1986; Harvey e al. 1986; patente francesa 84.04755).

25

As sequências comparadas dessas três variantes são apresentadas na figura 1.

A primeira variante, HV1, corresponde à hirudina que se isola do corpo da sanguessuga; a segunda, HV2 (Harvey e al. 1986) difere da primeira em 9 ácidos aminados; a terceira (Dodt e al. 1986) é indentica à HV2 até à serina 32 mas difere em 10 ácidos aminados na parte C-terminal, que compreende, ainda, um ácido aminado suplementar (ala63). Esta terceira variante será designada daqui em diante por HV3.

30

35

Estas sequências comportam 65 ou 66 ácidos aminados e podem ser considerados como dois dominios: uma parte terminal N- globular, que contem 3 pontos dissulfúricos e uma parte terminal C- ácida que apresenta uma homologia com o ponto de clivagem para a trombina na molécula de protrombina. Esta homologia permite pensar que a região que

1 rodeia a posição 47 poderia ser o ponto de fixação da hirudina na trombina.

5 Por outro lado, a hirudina natural contem uma tirosina sulfatada, na posição 63 (Chang, 1983). Esta tirosina sulfatada reencontra-se na posição 64 na variante HV3. Daqui em diante ela será designada como "posição 63" para todas as variantes, dado que a sua função é a mesma seja qual for a sua posição.

10 A análise comparada das sequências das variantes naturais da hirudina permite encarar, teoricamente, a criação de novas variantes onde se combinam diferentemente as características das moléculas naturais.

15 As HV1 e HV3 apresentam uma lisina na posição 47, situada entre duas prolinas, a qual é provavelmente responsável pelo bloqueamento da localização activa da trombina (Dodt e al. 1984 e 1985).

20 Como a HV2 não apresenta nenhum residuo básico nessa posição mas sim uma asparagina, parece desejável substituir aí uma lisina ou uma arginina para a tornar mais conforme com o que se espera de um inibidor da trombina (Chang 1985) ou ainda uma histidina que não é conforme com um bom substrato da trombina mas que poderia aumentar o poder inibidor da hirudina.

25 Por outro lado, a sulfatação da tirosina 63 constitui uma diferença entre a hirudina natural e a hirudina obtida por recombinação genética que poderia ter consequências sobre a sua actividade, como sugerem os estudos cinéticos de Stone e Hoftsteenge (1986).

30 Pode tentar imitar a proteína nativa substituindo-a tirosina por um resíduo ácido como glu ou asp.

35 O presente invento refere-se a um processo para a preparação das variantes da hirudina, caracterizadas por comportarem um ácido aminado diferente do ácido aminado

1

existente na forma natural nas posições 47 ou 63

Trata-se, de preferência, de uma variante das hidu-  
dinas HV1, HV2 ou HV3.

5

Entre as variantes em questão, devem citar-se:

- As variantes em que o ácido aminado Tyr<sup>63</sup> foi substituído  
por um resíduo ácido, particularmente Glu ou Asp;

10

- as variantes nas quais o ácido aminado na posição 47 da  
forma natural é substituído por uma Arg ou His;

15

- as variantes nas quais a Asn<sup>47</sup> da forma natural da HV2  
é substituído por uma Lys.

Devem referir-se particularmente as variantes prefe-  
ridas seguintes:

20

[Lys<sup>47</sup>]HV2

[Arg<sup>47</sup>]HV2

[His<sup>47</sup>]HV2

I

25

[Glu<sup>63</sup>]HV2

[Asp<sup>63</sup>]HV2

30

A variante referida no processo do presente invento,  
a saber (Lys<sup>47</sup>) HV2 | ou "rHV2-Lys 47" |, responde à for-  
mula seguinte:

35

1 ILE THR TYR THR ASP CYS THR GLU SER GLY GLN ASN LEU CYS  
LEU CYS GLU GLY SER ASN VAL GYS GLY LYS GLY ASN LYS CYS II  
5 ILE LEU GLI SER ASN GLY LYS GLY ASN GLN CYS VAL THR GLY  
GLU GLY THR PRO LYS PRO GLU SER HIS ASN ASN GLY ASP PHE  
GLU GLU ILE PRO GLU GLU TYR LEU GLN

10 As diferentes variantes que conservaram a Tyr<sup>63</sup> po-  
dem ser utilizadas sob forma sulfatada ou não. Esta sul-  
fatação pode ser obtida quimicamente ou por via biológica.

15 Por consequência o presente invento abrange igualmen-  
te os processos biológicos e/ou químicos que permitem pre-  
parar as variantes acima mencionadas.

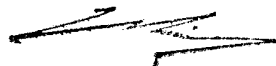
Com efeito, podem obter-se essas variantes por sin-  
tese e/ou por meio de técnicas conhecidas de manipulação  
genética.

20 Assim, por exemplo, a clonagem e a expressão das di-  
ferentes sequências codificantes para as HV1, HV2 e HV3,  
particularmente a HV2 e a obtenção das hirudinas correspon-  
dentes a partir de culturas de leveduras, foram descritas  
no pedido de patente EP-A-200 655.

25 As variantes de acordo com o invento podem ser obti-  
das por meio de técnicas equivalentes, depois de se terem  
modificado as sequências codificantes mencionadas anteri-  
ormente, por exemplo, por meio de mutagenese dirigida.

30 Particularmente, por mutagenese dirigida in vitro,  
constroem-se variantes em que a asparagina<sup>47</sup> é substituí-  
da por uma lisina, uma arginina ou uma histidina e em que  
a tirosina<sup>63</sup> é substituída por um ácido glutâmico.

35 Particularmente, é possível utilizar blocos de ex-  
pressão funcionais, como os descritos no pedido de paten-  
te EP-A-200 655 nos quais a sequência da hirudina é código  
para as variantes precedentes; esses blocos funcionais



1 de ADN podem ser transportados por um plasmideo vector.

Para dirigir a expressão e a secreção pela levedura dos genes correspondentes às diferentes variantes, estas  
5 são integradas num vector de levedura que compreende, de preferência, os seguintes elementos, que foram descritos no pedido de patente EP-A-200 655:

- a origem de replicação do plasmideo de levedura 2  $\mu$
- 10 - o gene *ura3*,
- uma origem de replicação no *E.coli* e um marcador de resistência a um antibiótico,
- um promotor de transcrição, a sequência "leader" e a sequência pre-pro do precursor do factor alfa, fundido em fase, a montante da sequência codificadora da variante da hirudina,
- 15 - o terminador de transcrição do gene PGK da levedura, que será colocado a jusante do gene da referida variante da hirudina.
- 20

O presente invento refere-se igualmente às leveduras transformadas por esses vectores ou por esse bloco funcional de ADN e sua aplicação à preparação das variantes da hirudina.

25 O presente invento refere-se particularmente a um processo para a preparação de uma variante da hirudina por meio da fermentação de uma levedura de acordo com o invento e recuperação da hirudina produzida no meio de cultura sob forma matura ou sob a forma de um precursor maturável  
30 in vitro.

As técnicas utilizadas já foram descritas mais pormenorizadamente nos pedidos de patente EP-A-200 655 e EP-87 401649.6

35 As variantes da hirudina assim obtidas podem ser

58900

Ref: D 11054/333702

1 utilizadas conforme é descrito no pedido de patente  
EP-A-200 655 como inibidores da trombina, tanto in vivo  
como in vitro.

5 Estas variantes podem utilizar-se, particularmente,  
em composições farmacêuticas, sós ou em combinação com ou-  
tros princípios activos, ou no quadro de testes ou de dia-  
gnósticos, in vitro ou in vivo. Neste último caso, pode  
10 ser interessante marcarem-se as variantes, por exemplo por  
meio duma marcação fluorescente, radioactiva, enzimática  
ou outra.

O presente invento é ilustrado pelos exemplos se-  
guíntes, com o auxílio da figura 1 que representa as se-  
quências de 3 variantes naturais da hirudina, a saber HV1,  
15 HV2 e HV3 e com o auxílio da figura 2, que representa a per-  
centagem de inibição da actividade proteolítica da trombi-  
na sobre o cromozima, em função dos volumes de sobrenadan-  
te das culturas de levedura que produzem a hirudina rHV<sub>2</sub>  
ou as suas variantes.

20 Exemplo I Construção de diferentes variantes de HV-2 por  
meio de mutagenese in vitro.

Para se efectuar uma mutagenese dirigida in vitro.  
o fragmento do ADN que se deseja modificar é clonado na  
forma replicativa de um fago simples brin; o genoma do  
25 fago recombinante é isolado e posto a hibridar com um oli-  
gonucleótido sintético que é portador da sequência modifi-  
cada. Este oligonucleótido serve de isco à síntese do ger-  
men complementar e o ADN, assim tornado duplamente germi-  
nado, é utilizado para transformar uma bactéria receptora  
30 que vai produzir um fago portador da mutação procurada  
(Zeoller e Smith, 1983)

O plasmideo pTG720, descrito na patente EP-A-158564  
é um vector de expressão da hirudina no E.coli. O plasmideo  
35 pTG730 foi derivado de pTG720 por acrescentamento de um pon-  
to EcoRI a jusante da sequência codificadora da hirudina. O  
ponto EcoRI permite recuperar a sequência codificante da

58900

Ref: D 11054/333702

1 hirudina por digestão EcoRI de uma parte, e ClaI de outra.

5 O fragmento ClaI-EcoRI cobre a totalidade da região codificadora da hirudina, menos alguns codons 5'- terminais. Este fragmento ClaI-EcoRI foi clonado entre os pontos AccI e EcoRI de um derivado do fago M13, chamado M13TG31 (Kieny e al., 1983). O fago derivado do M13TG131 e que compreen-

10 de esta sequência da hirudina é chamado M13TG1919. Sintetizaram-se três oligonucleótidos capazes, cada um deles, de se emparalharem com a sequência 5'-  
-GTACACCGAAACCCTGAAAG-3' do M13TG1919 com exceção da sua região central que corresponde à mutação desejada. As sequências desses oligonucleótidos são as seguintes:

15 TG435 5'-CTTTCAGGGTGCGGTGTAC-3'

TG436 5'-CTTTCAGGTTTCGGGTGTAC-3'

TG437 5'-CTTTCAGGGCGGGGTGTAC-3'

20 Estes oligonucleótidos foram concebidos para permitirem a substituição do codon AAC (Asn) do M13TG1919 por CAC (his) ou AAA (lys) ou CGC (arg) respectivamente.

25 120 picomoles de cada um dos oligonucleótidos foram fosforilados em 100 µl de meio reaccional e cerca de 20 picomoles de oligonucleótido fosforilado, foram hibridados com 1 picomole de ADN simples germen do fago M13TG1919 em 25 microlitros de tampão de hibridação.

30 Depois da hibridação, a mistura de ADNs foi submetida à acção da polimerase de Klenow e à ligase do fago T4. Cada uma das misturas assim tratadas serviu para transfectar a estirpe de E. coli 71/18 (mut L) sobre um tapete de bactérias indicadoras JM103 (Messing e al., 1981).

35 As células infectadas são distinguíveis por formarem zonas de crescimento mais lento; as colónias foram repicadas sobre meio completo e depois transferidas para papel

Whatman 540, tendo em vista uma crivagem das células que apresentam fagos mutados.

Essa crivagem é realizada por hibridação "in situ" com o oligonucleótido que serviu de isco anteriormente. Obtiveram-se assim três novos fagos que apresentam a sequência mutada que se procura:

M13TG1921 (asn<sup>47</sup> → arg), M13TG1924 (asn<sup>47</sup> → his), e  
M13TG1925 (asn<sup>47</sup> → lys).

Por outro lado, o mesmo tipo de experiência foi levado a efeito com um oligonucleótido TG434 de sequência 5'-ATTGTTAACTCTTCTTCTG-3'. Este oligonucleótido hibrida-se com a sequência 5'-CAGAAGAATATTTACAAT localizada na região 3' da sequência codificadora para a HV-2, com um triplete não emparelhado que se destina a substituir o codon TAT (tyr<sup>63</sup>) por GAG (glu). Obteve-se assim o fago mutado correspondente M13TG1922 (tyr<sup>63</sup> → glu).

Exemplo 2 Substituição do fragmento PstI-HindIII (0,6 kb) de pTG1828 pelo fragmento modificado.

O plasmideo pTG1828 (descrito no pedido de patente EP-87 401649.6) é portador da sequência codificadora da hirudina, precedida pelas sequências pre-pro do gene da feromona sexual alfa da levedura; O conjunto é colocado sob o controlo do promotor PGK. Para esta função entre as sequências pre-pro de MF $\alpha$  e hirudina, a proteína expressa segue o caminho normal de secreção e de maturação da levedura, de maneira que a hirudina processada e activa é encontrada no meio de cultura.

Este plasmideo foi retomado para exprimir as sequências de hirudina modificada, em vez da hirudina nativa.

A digestão por PstI e HindIII do pTG1828 liberta

cinco fragmentos com os tamanhos aproximados de 3,8, 1.9, 1.5, 1,1 e 0.6 Kb respectivamente. O último fragmento compreende a sequência fundida pre-pro-hirudina. Este fragmento não compreende senão uma única localização AccI e uma só localização EcoRI. A região delimitada por essas duas localizações compreende integralmente a sequência hirudina menos alguns codons 5'-terminais. O fragmento HindIII-PstI de 0.6 Kb foi introduzido entre as localizações HindIII e PstI de um vector que não apresenta nem localização EcoRI, nem localização AccI.

O plasmideo assim reconstituído (pTG1960) possui portanto uma localização AccI única e uma localização EcoRI única, localizadas respectivamente no início da sequência hirudina e a jusante desta. A digestão do pTG1960 por AccI e EcoRI, liberta um fragmento que compreende a quase totalidade da sequência da hirudina e o resto do plasmideo.

O grande fragmento de ADN extraído da sequência de hirudina é purificado sobre gel e misturado ao produto de digestão AccI-EcoRI da forma replicativa de cada um dos fagos modificados descritos no exemplo 1, tendo como finalidade reconstituir a fusão pre-pro-hirudina com as novas variantes HV-2 obtidas por mutagenese dirigida. Quatro novos plasmideos foram seleccionados: pTG1963 (asn<sup>47</sup> → arg), pTG1964 (tyr<sup>63</sup> → glu), pTG1965 (asn<sup>47</sup> → his) e pTG1966 (asn<sup>47</sup> → lys) que não diferem do pTG1960 senão pelos codons modificados.

Estas sequências que são portadoras dos codons modificados podem ser recuperados sob a forma de fragmentos PstI-HindIII para serem reclonados no vector pTG1828 no lugar do fragmento PstI-HindIII original.

Obtiveram-se assim 4 novos plasmideos : pTG1977 (asn<sup>47</sup> → arg), pTG1978 (tyr<sup>63</sup> → glu), pTG1979 (asn<sup>47</sup> → his) e pTG1980 (asn<sup>47</sup> → lys) que não diferem do pTG1828 descrito mais acima senão pelas mutações criadas

in vitro.

Exemplo 3 Transformação do TGY1sp<sup>4</sup> pelas ADNs de pTG1977, pTG1978, pTG1979 e pTG1980.

As células de *S.cerevisiae* TGY1sp<sup>4</sup> (Mat<sup>+</sup> ura<sup>3</sup>. - 251.373.382 his<sup>3</sup>.11.15) foram transformadas pelas ADNs de pTG1977, pTG1978, pTG1979 e pTG1980. Em cada um dos casos obteve-se um transformador ura<sup>+</sup>.

Têm-se portanto quatro estirpes TGY1sp<sup>4</sup> pTG1977, TGY1sp<sup>4</sup> pTG1978, TGY1sp<sup>4</sup> pTG1979 e TGY1sp<sup>4</sup> pTG1980. Comparou-se as produções de hirudina dessas quatro estirpes e do TGY1sp<sup>4</sup> pTG1828.

Inseminaram-se 20 ml de cultura (YNBG + casaminoácidos 0,5 %) a DO<sub>660</sub> 0,02 com cada estirpe. Após 48 horas de agitação a 30°C, as culturas são centrifugadas (5000 rpm, 5 min) e os sobrenadantes são doseados. Uma cultura de TGY1sp<sup>4</sup> pTG881 (plasmídeo que não é portador de sequência codificadora para a HV-2) é utilizada como controlo.

A actividade dos sobrenadantes brutos é medida pelo seu efeito inibidor sobre a actividade da trombina (actividade proteolítica sobre um substrato sintético, o cromozima TH - Boehringer Mannheim). A percentagem de inibição em função dos volumes de sobrenadante é dada pela figura 2.

Constata-se que o efeito inibidor produzido pelas variantes arg<sup>47</sup> e lys<sup>47</sup> é pelo menos igual ao da HV2 nativa. As variantes glu<sup>63</sup> e his<sup>47</sup> são ligeiramente menos inibidoras do que a HV-2.

Exemplo 4 Inibição da actividade da trombina

Para melhor pôr em evidência o interesse das variantes da hirudina que são objecto do presente invento, particularmente quanto à sua utilização farmacêutica, os exem

plos comparativos seguintes ilustram as propriedades inibidoras em relação à trombina da variante HV<sub>2</sub> e de duas outras variantes da forma HV<sub>2</sub>, em que o ácido aminado na posição 47 é substituído por uma Arg ou uma Lys, todas obtidas por meio de ADN recombinante.

Para estudar a cinética de inibição da trombina para essas variantes, utilizam-se as teorias dos inibidores de grande afinidade, tal como ela é descrita em WILLIAMS J.W. e MORRISON J.F. Methods in Enzymology 63 p.437-467, 1979, uma vez que a hirudina é um inibidor reversível da trombina.

As variantes da hirudina utilizadas são purificadas a 95 % e a trombina humana pura de Sigma apresenta uma percentagem de actividade medida por titulação da localização activa, que se situa para lá de 92 %. A concentração da trombina humana é a mesma para todas as medições, ou seja  $5,5 \cdot 10^{-9}M$ . O meio é um tampão PIPES de sódio 0,05 M, pH 7.9, KCl 0,18 M e PEG 0,1 % a 37 °C. O substrato da trombina é o cromozima PL de Boehringer. Respeita-se um tempo de incubação prévia de 2 minutos para a trombina e a hirudina, depois a reacção é desencadeada com o substrato.

O quadro seguinte recapitula os valores determinados experimentalmente da quantidade de hirudina necessária para inibir 95 % de uma mesma quantidade de trombina humana ( $5,5 \cdot 10^{-9}M$ ).

Quantidade para atingir 95% de inibição da trombina

|                                   | ( $10^{-9}M$ ) |
|-----------------------------------|----------------|
| HV <sub>2</sub> Lys <sup>47</sup> | 7.6            |
| HV <sub>2</sub> Arg <sup>47</sup> | 8.5            |
| HIV 2                             | 32,2           |

1 Parece portanto que são necessárias cerca de 4 vezes  
menos quantidades de hirudina HV<sub>2</sub>Arg<sup>47</sup> e HV<sub>2</sub> Lys<sup>47</sup> para  
inibir uma mesma quantidade de trombina humana do que de  
5 hirudina HV<sub>2</sub>.

As variantes propostas apresentam portanto proprie-  
dades inibidoras que são nitidamente melhoradas.

10 Exemplo 5 Estudo farmacológico preliminar de duas varian-  
tes da hirudina recombinante rHV2 e rHV2-Lys 47 comparadas  
com a heparina "standard"

1 - Finalidade do estudo

15 Avaliar duas variantes de hirudina recombinante rHV2  
(ou HV2) e rHV2-Lys 47 (ou Lys<sup>47</sup> HV2) e comparar a sua  
eficácia antitrombótica à da heparina "standard". Estas  
duas variantes são desprovidas de sulfatação pós-transcri-  
cional do agrupamento Tyr 63.

20 2 - Condições experimentais

a) A actividade antitrombinica específica (trombinas  
humana e bovina) das duas hirudinas recombinantes em soro  
fisiológico, é determinada pela inibição da actividade pro-  
25 teolítica da trombina sobre o cromozima.

b) A actividade anticoagulante das duas hirudinas é com-  
parada in-vitro no plasma de ratos e de coelhos, por meio  
do prolongamento do tempo de trombina e o efeito anti-IIa  
30 é medido pelo método cromogénico.

c) A cinética de desaparecimento plasmático da hirudi-  
na, após injeção por via i.v. de um comprimido solúvel,  
é seguida pela medição do efeito anti-IIa com o auxilio  
35 do tempo de trombina e pelo método cromogénico por meio  
de curvas de calibragem.

1 d) As concentrações plasmáticas obtidas depois de decorridos 30 minutos de perfusão continua i.v. no coelho, são determinadas por intermédio das mesmas técnicas.

5 e) A actividade antitrombótica das duas variantes da hirudina e da heparina "standard" é estudada no modelo de Wessler em coelho e rato, com a tromboplastina como agente trombogénico e no modelo de estase, no coelho (Fareed).  
10 As drogas são administradas em perfusão continua no coelho e em comprimido diluído i.v. no rato.

Os modelos utilizados são os seguintes:

#### Modelo de Wessler no coelho

15 Coelhos machos da raça New Zealand, que pesavam de 2,5 a 3 kg, foram utilizados neste estudo. Após anestesia por meio de injeção intravenosa de pentobarbital sódico (30 mg/kg), a carótida esquerda foi canulada e as duas veias  
20 jugulares foram isoladas; duas ligaduras frouxas foram colocadas sobre cada uma delas, a 2,5 cm uma da outra. Os coelhos receberam a seguir, ou soro fisiológico, ou soluções de hirudina ou de heparina, em perfusão continua durante 30 minutos, a um débito de 2,5 ml/hora. Dois minutos  
25 antes do fim de perfusão, foram realizadas pré-extrações arteriais a fim de se determinarem as taxas dos anti-coagulantes do plasma. Um minuto antes do final da perfusão, foi injectada tromboplastina humana (Manchester Comparative Reagents Ltd), estandardizada segundo o processo de  
30 M. Buchanan, numa dosagem de 600  $\mu$ /kg durante exactamente 30 segundos, na aorta, via carótida. Trinta segundos mais tarde, a perfusão foi suspensa e uma estase sanguínea foi realizada por meio do aperto das ligaduras dos dois segmentos  
35 venosos durante 15 minutos. As jugulares foram abertas e os trombos extraídos, lavados em soro fisiológico e pesados após tamponamento sobre papel de filtro.

58900

Ref: D 11054/333702

1

Modelo de Wessler no rato

5

Foram utilizados ratos machos Sprague-Dawley (CD-COBS) que pesavam cerca de 300 g cada. Após anestesia com pentobarbital sódico por via iop. (30 mg/kg) e laparotomia mediana, a veia cava inferior foi desembaraçada na extensão de 1 cm a partir da passagem renal. Duas ligaduras flexíveis foram colocadas a 0,7 cm de distancia uma da outra.

10

15

20

Os produtos a testar, diluidos no soro fisiológico, foram injectados por comprimido solúvel i.v. a 1 ml/kg 5 min 40 s ou 1 min (heparina) antes da realização da estase venosa. Quarenta segundos antes dessa estase, um agente trombogéneo (tromboplastina de coelho E. Dade) foi injectado a uma dosagem de 25 mg/ml/kg na veia do pênis, muito exactamente em 30 segundos. Dez segundos depois do fim da injeccção, foi estabelecida uma estase apertando-se as duas ligaduras, primeiro a proximal, depois a distal. A estase foi mantida durante 10 minutos, depois o trombo foi extraído, imerso numa solução de citrato a 0,38 %, seca sobre papel mata-borrão e pesado no dia seguinte após uma secagem de uma hora a 50° C.

Modelo de trombose por estase sanguínea no coelho

25

30

35

Coelhos machos New Zealand pesando de 2,5 a 3 kg foram utilizados neste estudo. Após anestesia por via intravenosa com pentobarbital sódico (30 mg/kg), a carótida esquerda foi canulada e as duas veias jugulares foram isoladas; duas ligaduras frouxas foram colocadas em cada uma delas, separadas 2,5 cm uma da outra. Os coelhos receberam em seguida, ou soro fisiológico, ou soluções de hirudina ou de heparina em perfusão continua, durante 30 minutos, a um débito de 2,5 ml/hora. Dois minutos antes do fim da perfusão, efectuaram-se levantamentos arteriais para se determinarem as taxas dos anticoagulantes do plasma. Ao mesmo tempo que a perfusão era suspensa, foi estabele-

cida uma estase apertando-se as quatro ligaduras (primeiro a proximal e depois a distal). A estase foi mantida durante 2 horas, depois as jugulares foram abertas e os trombos extraídos lavados em soro fisiológico e pesados após tamponamento sobre papel de filtro.

### 3 - Resultados

a) Para uma preparação de solução-mãe com uma concentração de 1 mg/ml, a actividade antitrombinica especifica das duas variantes da hirudina, em relação à das trombinas humana e bovina, encontra-se expressa no quadro 1 que segue:

#### Quadro 1

|                        | r HV2  | rHV2-Lys 47 |
|------------------------|--------|-------------|
| Para a trombina humana | 14 800 | 19 000      |
| Para a trombina bovina | 15 500 | 19 200      |

(resultados esperados  
para a trombina humana) (13 300) (16 000)

A actividade antitrombinica específica da hirudina variante rHV2 é de +/-15 000 ATU/mg e de +/- 19 000 ATU/mg para a variante rHV2-Lys 47.

Estas actividades específicas são superiores às esperadas. A actividade específica é idêntica para as trombinas humana e bovina.

b) A actividade anticoagulante no plasma do rato e do coelho determinada pelo tempo de trombina é equivalente para as concentrações fracas das duas hirudinas. A variante rHV2-Lys 47 é nitidamente superior para as concentrações mais elevadas. A quantidade de trombina residual no plasma do rato e do coelho, determinada por substrato cromogénio é comparável, após reunião das duas hirudinas até

58900

Ref: D 11054/333702

60 ATU/ml. Para neutralizar ainda mais os vestígios de trombina residual, a variante rHV2-Lys 47 é mais eficaz. Isto reflete a diferença dos Ki.

c) A cinética de desaparecimento plasmático das duas hirudinas após injeção por via i.v. de comprimido solúvel, é comparável para a determinação por método cromogénico, mas ligeiramente diferente para a determinação pelo tempo de trombina (quadro 2). As hirudinas desaparecem segundo dois expoentes. Uma primeira fase (distribuição) com um  $t_{1/2 \alpha}$  de cerca de 3 minutos, que reduz de 60 % a primeira quantidade inicial em 5 minutos para as duas hirudinas; uma segunda fase (eliminação) com um  $t_{1/2 \beta}$  de 16 minutos para a rHV2-Lys 47 e de 28 minutos para a rHV2 se se considerar o tempo de trombina e de 28 e 30 minutos, respectivamente, se se utilizar o método cromogénio. A heparina "standard" desaparece de acordo com uma única fase exponencial ( $t_{1/2} = 9$  min).

Quadro 2 : Meia-vida em minutos das hirudinas, após injeção IV de comprimido solúvel no coelho.

| Método      | $t_{1/2 \alpha}$ |     | $t_{1/2 \beta}$ |    |
|-------------|------------------|-----|-----------------|----|
|             | TT               | SC  | TT              | SC |
| rHV2        | 2,5              | 3,0 | 28              | 28 |
| rHV2-Lys 47 | 1,8              | 3,0 | 16              | 30 |

TT : tempo de trombina

SC : substrato cromogénio

d) As concentrações plasmáticas das duas variantes da hirudina obtidas após 30 minutos de perfusão contínua i.v. no coelho, estão em relação linear com as doses perfundidas.

## e) Efeitos antitrombóticos

|    |   |             |                      |                              |       |     |   |
|----|---|-------------|----------------------|------------------------------|-------|-----|---|
| 5  | : | Produtos    | Coelho i.v. perfusão | Rato i.v.comprimido soluvel: | :     |     |   |
|    | : |             | ug/kg/h              | ug/kg                        | :     |     |   |
|    | : | WESSLER     | ESTASE               | WESSLER                      | :     |     |   |
|    | : |             |                      | -5min 40s                    | -1min | :   |   |
|    | : |             |                      |                              |       | :   |   |
| 10 | : |             |                      |                              |       | :   |   |
|    | : | rHV2        | 375                  | --                           | 240   | -   | : |
|    | : | rHV2-Lys 47 | 20                   | 47                           | 160   | -   | : |
|    | : | Héparina    | 110                  | 110                          | 160   | 110 | : |
| 15 | : | Standard    |                      |                              |       |     | : |
|    | : |             |                      |                              |       |     | : |

Com base nestes resultados farmacológicos preliminares, parece que em perfusão contínua no coelho, a variante da hirudina recombinante rHV2-Lys 47 tem uma actividade antitrombótica superior à da rHV2 e à da heparina. A farmacocinética das duas variantes da hirudina é idêntica.

Exemplo 6 Comparação entre a relação actividade antitrombótica/risco hemorrágico da hirudina rHV2-Lys 47 e a heparina "standard"

Os estudos realizados mostram que o risco hemorrágico no coelho ou o alongamento do tempo de sangramento no rato, tratados com a rHV2-Lys 47, são inferiores aos dos tratados com a heparina "standard", referindo-se, para cada uma das espécies, doses equi-activas num modelo de trombose.

Depósito das estirpes representativas do presente invento

As estirpes seguintes foram depositadas na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de Institut Pasteur, 28 Rue du Docteur Roux, Paris (15), em 6 de

1

Novembro de 1986:

5

TGY1sp<sup>4</sup> pTG1977 (HV2-Arg<sup>47</sup>) sob o nº I-621

TGY1sp<sup>4</sup> pTG1980 (HV2-Lys<sup>47</sup>) sob o nº I-622

A estirpe de referência tinha sido depositada em 6 de Junho de 1986:

10

TGY1sp<sup>4</sup> pTG1828 sob o nº I-569

#### REFERÊNCIAS

15

Chang, J.Y. FEBS Letters 164, 307-313 (1983).

Chang, J.Y. Eur. J. Biochem. 151, 217-224 (1985)

Dodt, J., Mueller, H.P., Seemüller, U & Chang, J.Y. FEBS Letters 165, 180-184 (1984).

20

Dodt, J., Seemuller, U., Maschler, R. & Fritz, H. Biol.Chem. Hoppe-Seyler 366, 379-385 (1985).

Dodt, J., Machleidt, W., Seemuller, U., Maschler, R. & Fritz, H. Biol. Chem. Hopps-Seyler 367, 803-811 (1986).

25

Harvey, R.P., Degryse, E., Stefani, L., Schamber, F., Cazenave, J.P., Courtney, M., Tolstoshev, P. & Lecocq.

J.P. Proc. Natl. Acad. Sci: USA 83, 1084-1088 (1986).

Kieny, M.P., Lathe, R. & Lecocq. J.P. Gene 26, 91-99 (1983).

30

Krajewski, T. & Blombäck, B. Acta Chemica Scandinavica 22, 1339-1346 (1968).

Markwardt, F. Methods Enzymol. 19, 924-932 (1970).

Messing, J., Crea, R., Seeburg, P.H. Nucl. Ac. Res. 9, 309 (1981).

35

Petersen, T.E., Roberts, H.R., Sottrup-Jensen, L. & Magnusson, S. Protides, Biol., Fluids, Proc. Colloq.23, 145-149 (1976).

1 Stone, S.R. & Hofsteenge, J. Biochem. 25, 4622-4628 (1986).  
Zoller, M.J. & Smith M.N. Methods in Enzymol. 100, 469  
5 (1983).

O depósito do primeiro pedido para o invento acima  
descrito foi efectuado em França em 1 de Dezembro de 1986,  
sob o nº. 86 16723

10 - R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1ª. - Processo para a preparação de uma variante da  
hirudina caracterizado por compreender os seguintes passos:  
15 síntese, hemi-síntese e/ou manipulação genética.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1 carac-  
terizado por compreender a fermentação de uma levedura pre-  
viamente transformada quer por um plasmídeo que possui:

20 - a extremidade inicial de replicação do plasmídeo de levedura 2µ,

- o gene *ura 3*

- uma extremidade de replicação em *E. coli* e um marcador  
de resistência a um antibiótico

25 - um promotor de transcrição, a sequência principal e a  
sequência pre-pro do precursor do factor alfa, fundido  
em fase, a montante da sequência codificante da varian-  
te da hirudina

30 - a extremidade final de transcrição do gene PGK da levedura  
que será colocada a jusante do gene do referido va-  
riante, quer por um bloco funcional de ADN codificando  
para a referida variante da hirudina.

35 3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ca-  
racterizado por se preparar uma variante da hirudina que  
compreende um ácido aminado diferente do ácido aminado da  
forma natural em posição 47 ou 63.

58900

Ref: D 11054/333702

1

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por o ácido aminado Tyr na posição 63 na forma natural ser substituído por um resíduo ácido Glu ou Asp.

5

5ª. - Processo de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado por se preparar uma variante da hiru-  
dina HV1, HV2, HV3.

10

6ª. - Processo de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado por o ácido aminado na posição 47 na forma natural ser substituído por Arg ou His.

7ª. - Processo de acordo com as reivindicações 1 a 5 caracterizado por o ácido aminado 47 da forma natural de HV2, Asn ser substituído por Lys.

15

8ª. - Processo de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado por se preparar uma variante da hiru-  
dina de entre o grupo:

(Lys<sup>47</sup>) HV2

20

(Arg<sup>47</sup>) HV2

(His<sup>47</sup>) HV2

(Glu<sup>63</sup>) HV2

(Asp<sup>63</sup>) HV2

25

9ª. - Processo de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado por se preparar uma variante da hiru-  
dina possuindo a sequência:

30

ILE THR TYR THR ASP CYS THR GLU SER GLY GLN ASN LEU CYS LEU  
CYS GLU GLY SER ASN VAL CYS GLY LYS GLY ASN LYS CYS ILE LEU  
GLY SER ASN GLY LYS GLY ASN GLN CYS VAL THR GLY GLU GLY THR  
PRO LYS PRO GLU SER HIS ASN ASN GLY ASP PHE GLU GLU ILE PRO  
35 GLU GLU TYR LEU GLN

58900

Ref: D 11054/333702

1

10\*. - Processo de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado por se preparar uma variante da hidrudina sulfatada ou não.

5

Lisboa, 27. NOV. 1987

10

Por TRANSGENE S.A.

*Per'* O Agente Oficial

15

20

25

30

35

FIG.1

## SEQUÊNCIAS DE 3 VARIANTES NATURAIS DA HIRUDINA

|      | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13  | 14  | 15  |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1HV1 | VAL | VAL | TYR | THR | ASP | CYS | THR | GLU | SER | GLY | GLN | ASN | LEU | CYS | LEU |
| 2HV2 | ILE | THR | TYR | THR | ASP | CYS | THR | GLU | SER | GLY | GLN | ASN | LEU | CYS | LEU |
| 3HV3 | ILE | THR | TYR | THR | ASP | CYS | THR | GLU | SER | GLY | GLN | ASN | LEU | CYS | LEU |

| 16  | 17  | 18  | 19  | 20  | 21  | 22  | 23  | 24  | 25  | 26  | 27  | 28  | 29  | 30  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CYS | GLU | GLY | SER | ASN | VAL | CYS | GLY | CLN | GLY | ASN | LYS | CYS | ILE | LEU |
| CYS | GLU | GLY | SER | ASN | VAL | CYS | GLY | LYS | GLY | ASN | LYS | CYS | ILE | LEU |
| CYS | GLU | GLY | SER | ASN | VAL | CYS | GLY | LYS | GLY | ASN | LYS | CYS | ILE | LEU |

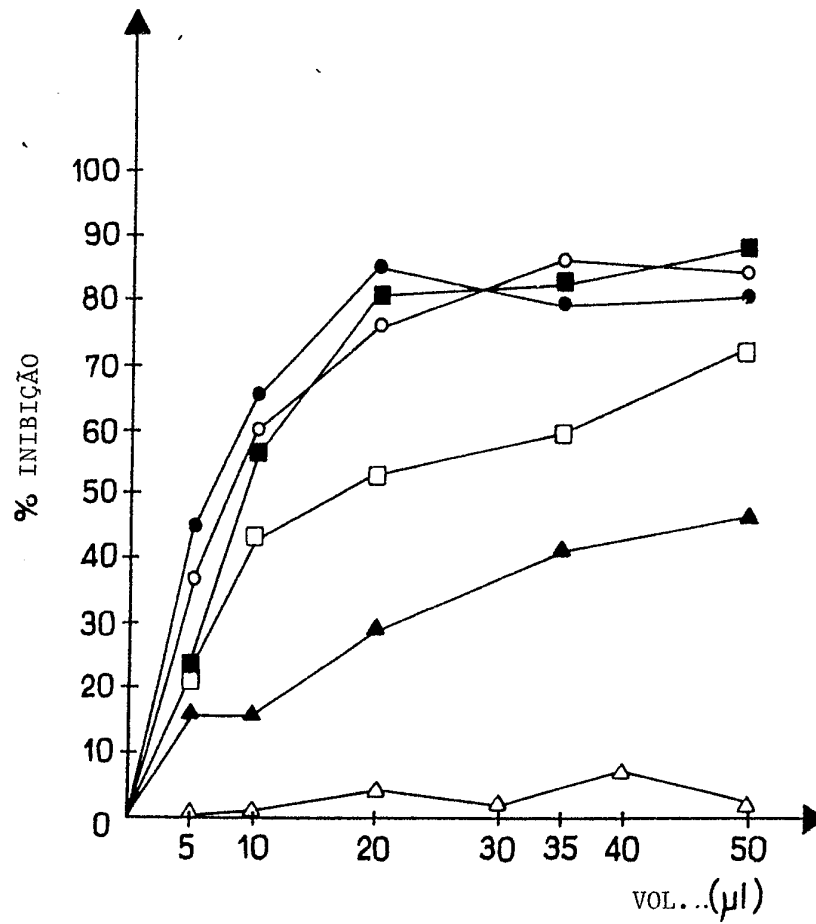
| 31  | 32  | 33  | 34  | 35  | 36  | 37  | 38  | 39  | 40  | 41  | 42  | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GLY | SER | ASP | GLY | CLU | LYS | ASN | GLN | CYS | VAL | THR | GLY | GLU | GLY | THR | PRO | LYS |
| GLY | SER | ASN | GLY | LYS | GLY | ASN | GLN | CYS | VAL | THR | GLY | GLU | GLY | THR | PRO | ASN |
| GLY | SER | CLN | GLY | LYS | ASP | ASN | GLN | CYS | VAL | THR | GLY | GLU | GLY | THR | PRO | LYS |

| 48  | 49  | 50  | 51  | 52  | 53  | 54  | 55  | 56  | 57  | 58  | 59  | 60  | 61  | 62  | 63  | 64  | 65  | 66 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| PRO | GLX | SER | HIS | ASN | ASP | GLY | ASP | PHE | GLU | GLU | ILX | PRO | GLU | CLU | TYR | LEU | CLN |    |
| PRO | GLU | SER | HIS | ASN | ASN | GLY | ASP | PHE | GLU | GLU | ILX | PRO | GLU | CLU | TYR | LEU | CLN |    |
| PRO | GLN | SER | HIS | ASN | GLN | GLY | ASP | PHE | GLU | PRO | ILX | PRO | GLU | ASP | TYR | ASP | GLU |    |

ALA

63

1. segundo DODT e outros FEBS LETTERS 1984 165, 180-183.
2. segundo HARVEY e outros Proc. Natl. Acad. EUA 1986 83, 1084-1088
3. segundo DODT e outros Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1986 367, 803-811



● pTG1828  
■ pTG1980  
○ pTG1977  
□ pTG1978  
▲ pTG1979  
△ pTG881

FIG. 2