



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

(11) PI 0014464-9 B1

(22) Data do Depósito: 15/09/2000

(45) Data de Concessão: 13/03/2018



(54) Título: PRECURSOR DE INSULINA HUMANA OU SEU ANÁLOGO, E SEU EMPREGO

(51) Int.Cl.: C07K 14/62; C12N 15/10; C12N 15/63; C12N 15/70

(30) Prioridade Unionista: 02/10/1999 DE 199 47 456.7

(73) Titular(es): SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

(72) Inventor(es): PAUL HABERMANN; JOHANN ERTL; JOHANNES MEIWES; GERHARD SEIPKE

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"PRECURSOR DE INSULINA HUMANA OU SEU ANÁLOGO, E SEU EMPREGO".

5 A presente invenção refere-se a um derivado sintético do peptídeo C de pró-insulina. Pró-insulina, contendo esse derivado, apresenta de diversas maneiras melhores propriedades do que a pró-insulina de macacos usual, particularmente o rendimento final dos respectivos derivados de insulina é aperfeiçoado pela preparação por técnica genética.

10 O número dos doentes de diabetes cresce continuamente no mundo todo. Proporcionalmente a isto, aumenta a necessidade de insulina ou derivados de insulina. Assim, existe a tarefa de otimizar o processo em questão tendo em vista o rendimento da substância ativa. No pedido de patente europeu EP-B1 0 489 780 é sugerido um processo para preparação de insulina ou derivados da mesma. Os vetores ali descritos servem para preparação de insulina humana com o plasmídeo pINT 90d ou como plasmídeos de partida para construção dos plasmídeos pINT302d descritos no pedido de patente europeu EP-A 0 821 006, que servem para preparação de um derivado de insulina His(B31) His (B32) Gly(A21), ou para
 15 construção do vetor pINT329d descrito no pedido de patente europeu EP-A 0 885 961, que serve para preparação do derivado de insulina Lys(B3) Glu(B29).

Verificou-se então que derivados de pró-insulina particularmente vantajosos são aqueles da fórmula I,

25
$$\text{Fus-B(1-30)-RDVP-Y}_n\text{-A(1-21)} \quad (\text{I});$$

sendo que:

Fus é uma fração de fusão opcionalmente disponível de qualquer sequência;
 B(1-30) é a cadeia B de insulina humana,
 30 Y representa uma cadeia de aminoácido, que termina

com um aminoácido básico no C terminal;

n é igual a 2 até 50 e indica o comprimento da cadeia de aminoácido Y; e

A(1-21) é a cadeia A de insulina humana,

5 e a cadeia A e/ou a B podem ser modificadas por troca de aminoácido, deleções e/ou adições. Surpreendentemente, são verificadas, assim, dependendo da composição da insulina de cadeias A ou B, diversas vantagens iguais e diferentes umas das outras.

Caso a cadeia humana B esteja vantajosamente ligada à cadeia humana A sobre o peptídeo C, então se origina uma pró-insulina, que se comporta em relação ao rendimento da expressão como pró-insulina do tipo selvagem, cujo processamento enzimático para insulina é mais facilmente controlável, de modo que não se origine nenhum traço perturbável de cadeia B prolongada por arginina, que precise ser separado na preparação de me-
15 dicamentos, através da qual ocorrem perdas de rendimento.

Caso uma cadeia B prolongada com di-histidina no C terminal seja ligada à cadeia A de insulina humana, que contém glicina na posição A21, com o peptídeo C de acordo com a invenção, verifica-se um aumento no rendimento da expressão em torno de 20% em comparação com os ren-
20 dimentos atingíveis com o plasmídeo pINT90d, e um rendimento quase cinco vezes maior do que aquele observado com o plasmídeo pINT 302d. Além disso, a condução do processamento enzimático é igualmente simplificada, como foi descrito anteriormente.

Caso ligue-se uma cadeia B modificada por Lys(B3) Glu(B29) com a cadeia A de insulina humana com o peptídeo C modificado, então ve-
25 rifica-se melhores propriedades de desdobramento do derivado de pró-insulina em comparação com a pró-insulina codificada a partir de pINT329d. O rendimento de proteína de fusão bruta é aumentado e atinge um nível igual ao que foi observado com o plasmídeo pINT90d. Além disso, a condu-
30 ção do processamento enzimático é simplificada.

Uma forma de execução particularmente vantajosa do novo peptídeo C novo é caracterizada pela seguinte sequência de aminoácidos:

CGCGATGTTCTCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGCGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTG
 R D V P Q V E L G G G P G A G S L Q P L -

GCGCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGC (SEQ ID NO.: 1)

A L E G S L Q K R (SEQ ID NO.: 2)

É igualmente indicada uma de muitas sequências de DNA possíveis, que codificam o peptídeo C indicado.

Um objeto da invenção é um precursor de insulina humana ou um análogo de insulina da fórmula I

5 Fus-B(1-30)-RDVP-Y_n-A(1-21) (I);

sendo que:

Fus é uma fração de fusão opcionalmente disponível de qualquer sequência;

B(1-30) é a cadeia B de insulina humana,

10 Y representa uma cadeia de aminoácido, que termina com um aminoácido básico no C-terminal;

n é igual a 2 até 50 e indica o comprimento da cadeia de aminoácido Y; e

A(1-21) é a cadeia A de insulina humana,

15 e a cadeia A e/ou a B podem ser modificadas por troca de aminoácido, deleções e/ou adições, particularmente onde Y_n representa os aminoácidos 5 até 35 do peptídeo C de insulina humana ou de macacos, de preferência onde Y_n representa os aminoácidos 11 até 35 de insulina humana.

20 Um outro objeto da invenção são precursores, como os supracitados, sendo que a cadeia B de insulina humana contém as modificações Lys (B3) Glu (B29), ou sendo que as cadeias B e A de insulina humana contêm as modificações His (B31) His (B32) Gly (A21).

Além disso, é objeto da invenção um DNA que codifica para um precursor, conforme acima descrito.

25 Igualmente é objeto da invenção um vetor, compreendendo um DNA, que codifica para um precursor como acima descrito, de preferência, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor de expressão apropriado

para a expressão em *E. coli*.

Um outro objeto da invenção é uma célula de *E. coli*, contendo um vetor conforme acima descrito.

Um outro objeto da invenção é um processo para preparação de
5 um precursor como acima descrito, sendo que:

- (a) é introduzido um DNA como acima descrito em um vetor como acima descrito;
- (b) o vetor de (a) é implantado em uma célula de *E. coli*;
- (c) a célula de *E. coli* de (b) contendo o vetor de (a) é utilizada
10 para a expressão; e
- (d) o precursor é isolado do resíduo de cultura.

Além disso, é objeto da invenção um processo para preparação de um DNA como descrito acima, sendo que:

- (a) partindo-se do cDNA humano ou da insulina de macacos,
15 esse DNA é gerado por meio de PCR e outras técnicas moleculares biológicas e
- (b) é isolado.

Um outro objeto da invenção é um processo para preparação de insulina humana, ou de um análogo de insulina, sendo que:

- (a) é preparado um precursor como descrito acima de acordo com o processo conforme acima descrito;
- (b) o precursor de acordo com (a) é dobrado sob condições apropriadas, de modo que as pontes dissulfeto podem se formar na insulina humana, e a fração de RDVP-Y_n e op-
25 cionalmente a fração de fusão Fus são removidas enzimaticamente; e
- (c) a insulina humana ou o análogo de insulina é purificado.

Um outro objeto da invenção é o emprego de um precursor conforme acima descrito para preparação de insulina ou de um análogo de insu-
30 lina, sendo que de preferência a preparação de insulina ou de um análogo de insulina ocorre de acordo com o processo supradescrito.

Além disso, é objeto da invenção o uso de um DNA como supra-

descrito para preparação de um precursor conforme supradescrito.

Também é objeto da invenção o emprego de um vetor como supradescrito para preparação de um precursor como supradescrito.

Um outro objeto da invenção é o emprego de uma célula de *E. coli* como supradescrito para preparação de um precursor como supradescrito.

A invenção é minuciosamente esclarecida por meio dos exemplos, sem se limitar a eles.

Exemplo 1: Expressão de derivados pró-insulina

A expressão ocorre como descrito na EP-B1 0 489 780. Assim podem ser introduzidas modificações na fermentação em grandes volumes. Para comparação das taxas de expressão são mantidas sempre as mesmas condições.

Para a elaboração em escalas maiores é válida, em geral, a fórmula de fermentação, por exemplo, para um volume de 7,5 litros, tal como aqui descrita:

	Volume de Fermentação:	7,5 l
	Condições de esterilização:	121°C, 20 minutos, em pH 3,5, após esterilização com NH ₃ ajustado em 7,0.
20	Temperatura de fermentação:	37°C
	Regulagem do pH:	pH 7,0, ajuste com água amoniacal 25%.
	Velocidade de rotação:	1500 rpm
	Aeração:	15 NI/min (2 vvm)
25	Duração:	cerca de 24 horas
	Alimentação:	dosou-se glicose em uma concentração de 65% a um valor de OTR de 200 mmol ¹ h ⁻¹ com uma taxa constante de 12 gl ⁻¹ h ⁻¹ .
30	Pré-cultura:	uma cultura sob agitação foi injetada com uma ampola de semente e incubada por 3-4 horas a

O fermentador foi injetado com cerca de 40 ml de pré-cultura.

Indução:

A um A_{540} de ≥ 40 com 40 mg/l (300 mg/fermentador) de ácido indolpropionico dissolvido em cerca de 10 ml de uma solução aquosa de Na_2CO_3 (com 0,17 g de Na_2CO_3).

5

10 Aqui NL = litro normal, vvm = volume/volume/minuto e OTR = taxa de transferência de oxigênio.

Meios de fermentação:

	Número da fórmula GAI 100/95-000:	quantidade g/l
	Glicose-1-hidrato, D(+) min. 80%	44
15	Ácido cítrico-1-hidrato	3,48
	Sulfato de amônio min. 95%	6,0
	ácido fosfórico, orto, 85%	2,99
	potássio di-hidrogenofosfato	1,18
	Sulfato de sódio	3,0
20	Sulfato de magnésio-7-hidrato, mínimo 98%	2,0
	Sulfato de ferro(III) x H ₂ O	0,5
	Solução de elementos traço: RL 1/85-000	1,0 ml
	Tiamina - HCl	0,005
	Desmofen 3600	0,5
25	Solução de elementos traço:	
	RL 1/85-000	Quantidade g/l
	Sulfato de cobre(II) -5-hidrato	1,6
	Iodeto de potássio	4,0
	Molibdato de amônio-4-hidrato	8,0
30	Sulfato de manganês(II)-1-hidrato	12,3
	Sulfato de zinco - 7 -hidrato	16
	Ácido bórico	20

	Meio no balão de vidro com agitação:	Quantidade g/l
	Extrato de fermento	8,0
	Glicose	1,0
	NaCl	3,5
5	KH ₂ PO ₄	1,32
	K ₂ HPO ₄	3,68

Exemplo 2: Preparação de insulinas

A preparação de insulinas ocorre de acordo com processos conhecidos, como eles são descritos ou discutidos, por exemplo, na EP-B1 0 489 780 ou EP-A 0 885 961. Preferido para o dobramento e elaboração da respectiva proteína de fusão é o processo descrito na EP-B1 0 668 282 (vide exemplo 2). Desta forma, após o dobramento de acordo com a EP 0 288 809, a formulação pode ser filtrada antes de elaborações adicionais.

Exemplo 3: Construção do plasmídeo pINT358d que codifica a pró-insulina B-RDVP C₁₁₋₃₅-A humana derivatizada da cadeia C.

Para preparação do plasmídeo foram empregados os iniciadores Tir e Insu 11 descritos na EP-B1 0 489 780. Adicionalmente foram sintetizadas duas novas sequências de iniciador.

O iniciador PINT358fIII tem a seguinte sequência:

5'-CCC AAG ACC CGC GAT GTT CCT CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT-3' (SEQ ID NO.:3)
B28 B29 B30 Arg Asp Val Pro C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C18 (SEQ ID NO.: 4)

O iniciador PINT358revII tem a sequência:

5'-CAGCTCCACCTGAGGAACATCGCGGGTCTTGGGTGTGTAG-3' (SEQ ID NO.:5)

Com o DNA do plasmídeo pINT90d como matriz, é realizada uma reação de PCR com os pares de iniciadores Tir/PINT358 revII e Insu 11/PINT358fIII correspondentes à EP-B1 0 489 780. Alíquotas dos produtos de ambas as reações são combinadas e juntamente com o par de iniciadores Tir/Insu 11, são submetidos a uma terceira reação de PCR. O produto dessa reação é duplamente digerido com as enzimas Sall/NcoI e o produto dessa digestão com restrição é inserido após à purificação no DNA do vetor aberto com o NcoI/Sall do plasmídeo pINT91D igualmente descrito na EP-B1 0 489 780. O plasmídeo assim construído apresenta a denominação pINT358d. A estrutura é confirmada por meio de análise de sequência de

DNA. Células de *E. coli* competentes são transformadas com o DNA do plasmídeo. A expressão da pró-insulina em bactérias ocorre de acordo com o exemplo 1. Após o dobramento de acordo com o exemplo 2 ocorre a transformação enzimática da pró-insulina em insulina e purificação posterior de acordo com a EP-B1 0 347 781. Assim, em comparação com o processo derivado de pINT90d, na etapa da cromatografia por troca iônica, pode ser adicionalmente detectado um subproduto, já que esse não está contaminado com insulina Arg(B31).

Exemplo 4: Construção do plasmídeo pINT362d para preparação de pró-insulina Lys(B3)Glu(B29) - RDVP-C₁₁₋₃₅

Para construção do plasmídeo são necessários DNA dos plasmídeos pINT329d e pINT358d como matriz e o iniciador Tir e Insu 11. Adicionalmente dois novos iniciadores Salfoward e 329 rev são sintetizados.

O iniciador Salfoward tem a sequência:

5'-TACACACCCGAGACCC**GCGATGTTCTCAGG**-3' (SEQ ID NO.:6)

Aqui o pedaço marcado em negrito representa a sequência que hibridiza com o plasmídeo pINT358d, enquanto que a parte restante é homóloga às sequências do pedaço codificador da cadeia B do plasmídeo pINT329d.

O Iniciador 329rev tem a seguinte sequência:

5'-CCTGAGGAACATC**GCGGGTCTCGGGTGTGTAG**-3' (SEQ. ID NO.: 7)

Assim, o trecho em negrito marca a região, que é homóloga à cadeia anti-sentido, que forma a extremidade da cadeia B, e o triplete descreve a arginina no plasmídeo pINT329d. A sequência restante hibridiza com o plasmídeo pINT358d. Duas reações de PCR são realizadas. Assim o DNA do plasmídeo pINT 329 d serve como matriz para o par de iniciador DNA Tir/329rev e pINT 358d como matrizes para o par Salfoward/ Insu 11.

Ambas as reações resultam em fragmentos, que se sobrepõem à sequência do iniciador Salfoward. Assim ambos os fragmentos são unificados em uma terceira reação de PCR e são acrescentados com o auxílio do iniciador Tir e Insu11 em uma sequência de DNA, que codifica os análogos de insulina. Esse produto de reação é dissociado com as enzimas de

restrição NcoI/Sall e em seguida inserido no fragmento do vetor pINT91d aberto por Sall/NcoI. As células competentes da cepa de *E. coli* K12 MM 294, são transformadas com uma respectiva reação de ligação. O DNA do plasmídeo é isolado e caracterizado por transformantes. O plasmídeo corre-

5 to possui a denominação pINT362d.

Após a expressão verifica-se um rendimento bruto comparável a pINT90d de proteína de fusão. Entretanto o rendimento dobrado verificado em comparação a pINT329d é cerca de 40 % melhor.

A estrutura da proteína de fusão codificada por pINT362d é como

10 se segue:

MATTSTGNSAR FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPET RDVPQVELGGGPG

Fração de fusão

Cadeia B

Cadeia C

AGSLQPLALEGSLQKR GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO.: 8)

Cadeia C (continuação)

Cadeia A

Exemplo 5: Construção do plasmídeo pINT349d para prepara-

15 ção de Pró-insulina His(B31), His (B32) Gly(A21) - RDVP-C₁₁₋₃₅

Primeiramente é preparado o plasmídeo pINT140d, cujo DNA codifica o análogo de insulina, Gly (A21)- insulina.

Para tanto são necessários dois oligonucleotídeos para emprego em uma reação de PCR como iniciador:

20 Oligonucleotídeo Tir é empregado como "sentido" e o oligonucleotídeo 140 drev é empregado como iniciador "antissentido":

140drev 5' - AAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTA -3' (SEQ ID NO.: 9)

Stop Stop Gly Cys Tyr
A21A20 A19

Ambos os iniciadores são empregados com uma PCR padrão de reação com DNA do plasmídeo pINT90d. O produto de reação respectivamente de acordo com a EP-B1 0 489 780 é reagido com as enzimas de res-

25 trição NcoI e Sall e em seguida empregado no respectivo vetor pINT69d aberto. Forma-se o plasmídeo pINT140d que é reisolado após transformação em *E. coli* K12 MM294 e é caracterizado por meio de análise de restrição e de sequência.

Partindo do DNA do plasmídeo pINT140d são realizadas duas

reações de PCR. A primeira reação utiliza o iniciador Tir e como iniciador reverso PINT349a com a seguinte sequência:

Val Gln Pro Val Asp Arg His His Thr Lys Pro Thr Tyr (SEQ ID NO.: 10)
 5'-CACCTGAGGAACATCGCGGTGGTGGGTCTTGGGTGTGTAG-3'
 (SEQ ID NO.: 11)
 C12 C11 * * * * B30 B29 B28 B27 B26

Aqui as sequências marcadas com estrelas denominam os códons para os aminoácidos recentemente introduzidos.

5 A segunda reação de PCR é realizada com os iniciadores Inu11 e PINT349b. O iniciador PINT349b tem a sequência:

Pro Lys Thr His His Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu (SEQ ID NO.: 12)
 5'-ACCCAAGACCCACCAACCGCGATGTTCTCAGGTGGAGCTG-3'
 (SEQ ID NO.: 13)
 B28 B29 B30 * * * * C11 C12 C13 C14

Da posição 34 até a posição 1 da sequência de DNA o iniciador é complementar a pINT349a. Portanto, os produtos de reação das duas reações de PCR podem ser inseridos ao fragmento de DNA em uma terceira
 10 reação de PCR com o iniciador Tir e Inu11, que codifica o derivado de pró-insulina desejado. O produto dessa reação é, conforme descrito, reagido com as enzimas NcoI e Sall e introduzido neste fragmento de vetor pINT91d aberto com as enzimas e transformados com *E. coli* K12. Após a caracterização do plasmídeo a partir de transformantes, construções de plasmídeo
 15 verdadeiras obtêm a denominação pINT349d.

Ao se exprimir a proteína de fusão, então mostra-se um visível aumento dos rendimentos da proteína de fusão. O rendimento é surpreendentemente cerca de 20% maior do que o atingido com pINT90d, e é cerca de 5 vezes maior do que o atingido com plasmídeo pINT30d. A taxa de do-
 20 bramento é assim comparável com a taxa atingida da pré-pró-insulina de macacos, codificada de pINT90d.

REIVINDICAÇÕES

1. Precursor de insulina humana ou de um análogo da insulina, caracterizado pelo fato de ser aquele definido pela SEQ ID No. 8.

2. Emprego de um precursor de insulina humana ou de um análogo da insulina, como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser na preparação de insulina ou de um análogo de insulina.

5