

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 237**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/575** (2006.01)  
**C07K 14/605** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C12P 21/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06792022 .3**  
96 Fecha de presentación: **13.09.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1931705**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA AMIDACIÓN DE POLIPÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS BÁSICOS C-TERMINALES UTILIZANDO ENDOPROTEASAS ESPECÍFICAS.**

30 Prioridad:  
**27.09.2005 DE 102005046113**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2012**

73 Titular/es:  
**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH  
BRÜNINGSTRASSE 50  
65929 FRANKFURT AM MAIN, DE**

72 Inventor/es:  
**RISSOM, Sebastian;  
HABERMANN, Paul;  
SALAGNAD, Christophe;  
ZOCHER, Frank y  
LANDRIC-BURTAİN, Laure**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 237 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la amidación de polipéptidos con aminoácidos básicos C-terminales utilizando endoproteasas específicas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de péptidos di o polibásicos amidados C-terminales, en particular aquéllos con la actividad biológica de GPL-1 y sus análogos o derivados.

10 La estabilidad, la disponibilidad biomédica y la duración de la actuación de péptidos y proteínas relevantes desde el punto de vista farmacéutico dependen en gran medida de la naturaleza del extremo N-terminal o bien C-terminal de la molécula. El semiperiodo de vida de biomoléculas está influenciado claramente por prolongación C-terminal en aminoácidos básicos. Se pueden conseguir actividades farmacéuticas especialmente buenas cuando en la prolongación C-terminal en más de un aminoácido básico, el aminoácido C-terminal extremo en un aminoácido amida.

15 La fabricación de tales sustancias activas a base de péptido, cuando los péptidos son suficientemente pequeños, se puede realizar directamente a través de una síntesis química completa de acuerdo con un protocolo de síntesis de Merrifield modificado. No obstante, resultan limitaciones cuando se necesita tal péptido en grandes cantidades. Así, por ejemplo, los aminoácidos que deben emplearse en la síntesis deben fabricarse en primer lugar y purificarse, para que sean adecuados a continuación después de modificación química en la síntesis del péptido como reactivos. Después de la eliminación de los grupos de protección al término de la síntesis, el péptido objetivo o bien el producto se puede purificar entonces y formular como producto farmacéutico. De acuerdo con la composición del péptido se pueden producir, además, durante la síntesis a través de efectos de proximidad rendimientos limitados, racemización o formación de productos secundarios debido a copulación deficiente en etapas de copulación individuales, con lo que se puede influir negativamente sobre el rendimiento total o la pureza del producto. Para la fabricación de cantidades mayores de sustancia valiosa, la síntesis total es demasiado costosa. Por lo tanto, sería deseable la fabricación a través de procedimientos alternativos, en particular biotécnicos.

20 Desde hace mucho tiempo se conocen enzimas que están en condiciones de amidar péptidos C-terminales. Estas enzimas llevan el nombre (Eipper y col. Mol. Endocrinol. Nov. 1987; 1(11): 777) de enzimas de alfa-amidación de peptidilglicina (Peptidylglycine-alpha-amidating-enzyme PAM). La fabricación y purificación de tales enzimas PAM son conocidas por el técnico y se describen en detalle (M. Nogudi y vol. Prot. Expr. Purif. 2003, 28: 293). Pero la fabricación es intensiva de costes con respecto a la fabricación de otras enzimas técnicas, como por ejemplo, tripsina o carboxipeptidasa.

25 Resulta una alternativa a la amidación 'in Vitro' por medio de PAM cuando se co-expresa la enzima con la proteína precursora a amidar en la misma célula huésped. Esto se consigue introduciendo una secuencia genética, que codifica una actividad PAM bajo el control de una secuencia de regulación específica del huésped en la célula huésped. Esta secuencia de expresión o bien puede estar incorporada de forma estable en la secuencia DNS cromosomal respectiva o bien puede estar presente en un segundo plásmido paralelamente al plásmido de expresión para la proteína objetivo, o puede estar integrada como segunda casilla de expresión sobre el mismo vector, o puede estar clonada en un apéndice de expresión policistrónico en fase con la secuencia genética, que codifica la proteína objetivo bajo el control de la misma secuencia promotora. Sin embargo, los rendimientos descritos son reducidos, de manera que solamente se puede conseguir la fabricación de cantidades mayores a través de volúmenes de fermentación correspondientes. Esto conduce a un gasto de purificación elevado intensivo de costes. Además, a amidación no se realiza cuantitativamente, de manera que la proteína valiosa amidada debe separarse de la proteína valiosa no amidada. Si se decide por un proceso de fabricación secretor (por ejemplo, Hong y col. Appl Biochem Biotechnol. 2003; 110, páginas 113-23), es un inconveniente que proteínas con término C polibásico no son secretadas o solamente en una medida muy reducida.

35 Otro método para la amidación se basa en la utilización de mecanismos de auto-disociación específicos de la proteína (Nottingham y col. Nature Biotech. Vol. 19, 974-977, 2001). Sin embargo, el control de esta reacción no es sencillo y se puede producir una transesterificación y, por lo tanto, la formación de productos no deseados.

40 Con respecto al rendimiento puede repercutir de manera desfavorable la porción relativamente grande de proteína de fusión.

45 Los procedimientos de amidación descritos anteriormente parten de un término C del péptido objetivo, prolongado en al menos un aminoácido glicina o de manera alternativa intein péptido. Pero los péptidos, que llevan C-terminal lisina, se pueden fabricar, cuando no contienen en el desarrollo siguiente de la secuencia ninguna lisina o arginina adicional, como estructura multímera, que se puede transformar a continuación a través de digestión con tripsina o enzimas similares a tripsina en el módulo monómero. De esta manera, se pueden conseguir rendimientos altos. Esto no es posible en el caso de los procedimientos descritos anteriormente.

50 Por lo tanto, los procedimientos de fabricación biotécnicos conocidos están unidos con inconvenientes y el cometido de fabricar péptidos o proteínas, que llenan en el término C más que un aminoácido básico lisina o arginina y están amidados en el término, en grandes cantidades económicamente, no se puede considerar suficientemente resuelto.

Resultaría un procedimiento de fabricación alternativo si se consiguiese fabricar una fase previa del péptido objetivo, acortada al menos en un aminoácido básico, en grandes cantidades y prolongarla a continuación en una semi-síntesis catalizada con enzima con lisinamida o bien argininamida.

5 Levin y col. (Biochemical Journal 63:308-16; 1956) describen la actuación de tripsina sobre lisinamida y diferentes poli-péptidos de lisinamida. Los resultados de los autores muestran que derivados de lisinamida bajo la influencia de tripsina no se pueden convertir en derivados de lisinamida de elevado peso molecular, puesto que la hidrólisis de las amidas formadas intermediarias en el ácido libre se realiza rápidamente en comparación con la reacción de copulación. De ello debe deducirse que los procedimientos semi-sintéticos catalizados con tripsina, que prevén la fabricación de péptidos con poli-lisinamida C-terminal o poli-arginamida o secuencias mixtas poli-Lys/Arg, no tienen éxito o solamente con rendimientos reducidos.

Ahora se ha encontrado un procedimiento químico de péptidos, que permite de manera sorprendente con altos rendimientos (es decir, > 30 %) la ligación catalizada con tripsina de aminoácidos básicos amidados, sus análogos o derivados, a péptidos, que presentan un aminoácido básico C-termina.

15 Además, se ha podido observar de manera sorprendente para el procedimiento de acuerdo con la invención que la introducción de grupos protectores (ver Pitraschke y col. Tetrahedron: Asymmetry 9. páginas 105 – 518), como por ejemplo –Boc (t-butiloxicarbonilo), –Z (Benziloxicarbonilo) o –DDZ (dimetilfenilpropiloxi-carbonilo) en los aminoácidos básicos amidados (lisinamida, argininamida) no conduce a una mejora de la reacción de ligación con respecto a la eficiencia y selectividad. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención ofrece la ventaja de que se puede prescindir del enmascaramiento con grupos protectores, con lo que se evitan pérdidas de rendimiento a través de la eliminación del grupo protector y la evacuación de reactivos tóxicos. De ello se deducen enormes ventajas de costes del procedimiento frente a la síntesis química total.

Thorkildsen y col. (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 307, Nº 2, 490-496, 2003) describen que el agonista ZP10A del receptor “Glucagon-Like Peptide 1” refuerza la expresión de insulina mRNA e impide la progresión de diabetes en ratones db/db.

25 En la patente europea Nº 0 490 249 se describe un procedimiento para la fabricación de Growth Hormone Releasing Factor GRF (1-44)-NH<sub>2</sub>, en el que se hace reaccionar GRG (1-43)-OH con Leu-NH<sub>2</sub> en presencia de tripsina.

Schellenberger y col. (Advances in the Biosciences, Vol. 65, 159.166, 1987) describen estudios para la caracterización de la especialidad de la subunidad-S’ de proteasas de serina en síntesis controladas cinéticamente.

30 Por lo tanto, un objeto de la invención es un procedimiento para la fabricación de péptidos di o polibásicos amidados C-terminales de la fórmula general I



en la que

AS significa un péptido caracterizado por la secuencia

35 HEGGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKK-NH<sub>2</sub>  
(SEQ ID Nº 1)

o

HEGGTFTSDL SKWMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKKR-NH<sub>2</sub>  
(SEQ ID Nº 4)

40 y

X significa lisina o arginina;

en la que un péptido caracterizado por la secuencia

HEGGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPSKK KKK  
(SEQ ID Nº 7)

45 se hace reaccionar con N-Arg-NH<sub>2</sub> o H-Lys-NH<sub>2</sub> en presencia de una enzima con la actividad biológica de tripsina, en la que la enzima tiene la capacidad de disociar un enlace de péptido C-terminal en aminoácidos básicos y, dado el caso, el compuesto obtenido de la fórmula I es purificado según la química de proteínas.

Además, un objeto de la invención es un procedimiento descrito anteriormente, en el que en el caso de la fabricación

del péptido caracterizado por la secuencia SEQ ID N° 1, la relación molar del péptido caracterizado por la secuencia SEQ ID N° 7 y H-Lys-NH<sub>2</sub> es 1 : 144 y en el caso de la fabricación del péptido caracterizado por la secuencia SEQ ID N° 4, la relación molar del péptido caracterizado por la secuencia SEQ ID N° 7 y H-Arg-NH<sub>2</sub> es 1 : 585.

Además, un objeto de la invención es un procedimiento descrito anteriormente, en el que

- 5 a) se expresa un péptido de fusión, que contiene un péptido caracterizado por la secuencia ID N° 7;
- b) el péptido caracterizado por la secuencia ID N° 7 es liberado por medio de disociación enzimática de dicho péptido de fusión;
- 10 c) el producto intermedio de la etapa b), dado el caso después de purificación según la química de proteínas, se hace reaccionar, en presencia de una enzima con la actividad biológica de tripsina con H-Lys-NH<sub>2</sub> o H-Arg-NH<sub>2</sub>; y
- d) dado el caso, el compuesto obtenido de péptidos caracterizado por las secuencias SEQ ID N° 1 ó 4 de la fórmula I es purificado según la química de proteínas y aislado.

Además, un objeto de la invención es un procedimiento descrito anteriormente, en el que dichos péptidos de la fórmula general I presentan la actividad biológica de GLP-1 o sus derivados o análogos.

- 15 Además, un objeto de la invención es un procedimiento descrito anteriormente, en el que la disociación desde la proteína de fusión se realiza por medio de enteroquinasa, Factor Xa, genenasa, trombina o tripsina.

Además, un objeto de la invención es un procedimiento descrito anteriormente, en el que la proteína de fusión se expresa en un sistema de expresión seleccionado a partir del grupo que contiene *E. coli*, *S. carnosus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae*.

- 20 En el sentido de la invención:

El concepto "análogo" de un aminoácido significa un aminoácido que existe en la naturaleza, que no está codificado en el código genético, pero que es adecuado para la incorporación en una cadena de péptidos. Ejemplos de análogos de un aminoácido son ornitina y citrulina, y también todos los demás aminoácidos que no existen de forma natural, que llevan en la cadena lateral cualquier función básica, como por ejemplo ácido 2.4-diaminobutánico; 3-metil-oritina; 4-metil-oritina, 5-amino-leucina; 4-amino-leucina; 3-amino-leucina; 5-amino-norleucina; 4-amino-norleucina; 3-amino-norleucina; 4-amino-norvalina; 3-amino-norvalina; 6-metil-lisina; 5-metil-lisina; 4-metil-lisina; 3-metil-lisina.

25

El concepto "derivado" de un aminoácido significa un aminoácido o un análogo de un aminoácido, que está sustituido por uno o varios grupos químicos. Ejemplos de tales grupos químicos son grupos de protección habituales en la química de péptidos, como -Boc (t-butiloxicarbonilo), -Z (benzilocarbonilo), -DDZ (dimetilfenilpropiloxi-carbonilo), -Fmoc (N-alpha-(9-fluorenilmetiloxicarbonilo), -2-bromo-Z, -2-cloro-Z, -Tfa (trifluoroacetilo), -nicotinoilo, -4-nitro-Z, 2-picolinoilo, -Tos (4-toluenosulfonilo), -For (formilo), -biotinilo, -dansilo, -Dnp (dinitrofenilo), -Mca (monocloracetilo) - Mtt (N-metiltritolilo), -Nde (N-1-(4-nitro-1,3-dioxindan-2-ilideno)etilo), -acetimidoilo, -acetilo, -miristoilo, -palmitoilo, N-litocolilo -  $\gamma$  - glutamilo o - $\omega$  - carboxiheptadecanoilo.

30

- 35 Además, tal grupo es un grupo C(O)-(C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>)alquilo, un grupo C(O)-(C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>)alquenoilo, un grupo C(O)-(C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>)alcandienilo, o un grupo C(O)-(C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>)alcantrienilo, en el que, si están presentes grupos alquilo, alquenoilo, alcandienilo y alcantrienilo, pueden estar ramificados o lineales. (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo significa un resto de hidrocarburo con 1, 2, 3, 4 5 ó 6 átomos de carbono. Ejemplo de restos (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo (1-metiletilo), n-butilo, isobutilo (2-metilpropilo), sec-butilo (1-metilpropilo), tert-butilo (1,1-dimetiletilo), n-pentilo, isopentilo, tert-pentilo, neopentilo, hexilo. (C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>)alquilo significa de manera correspondiente un resto hidrocarburo con 6 a 24 átomos de carbono. Los restos alquilo pueden ser lineales o ramificados. Como restos (C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>)alquilo son preferidos restos de ácido grado, por ejemplo hexilo, octilo, decanilo, undecanilo, dodecanilo, tridecanilo, tetradecanilo (miristilo), pentadecanilo, hexadecanilo, heptadecanilo, octadecanilo (estearilo), nonadecanilo, eicosanilo, dicosanilo, 9,11-dimetil-tridecanilo, 11-metil-tridecanilo.
- 40

- 45 Además, tal grupo es un grupo C(O)-pentil-(C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)heteroaril-fenilo, C(O)-bifenilo o C(O)-terfenilo, en el que los grupos fenilo, bifenilo, terfenilo o heteroarilo no están sustituidos o están sustituidos con uno o dos grupos seleccionados del grupo ((C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alquilo o O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alquilo. En restos fenilo monosustituidos, el sustituyente se puede encontrar en la posición 2, en la posición 3 o en la posición 4. Fenilo sustituidos dos veces puede estar sustituido en posición 2,3, posición 2,4, posición 2,5, posición 2,6, posición 3,4 o posición 3,5. En restos fenilo sustituidos tres veces, los sustituyentes se pueden encontrar en posición 2,3,4, posición 2,3, 5, posición 2,4,5, posición 2,4,6, posición 2,3,6 o posición 2,4,5. Heteroarilo significa, por ejemplo, furanilo, tienilo, pirroloilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, piridilo, piracinilo, pirimidinilo, piridacinilo, indolilo, indazolilo, quinolilo, isoquinolilo, ftalacinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo o cinnolinilo.
- 50

El concepto "aminoácido básico" significa lisina, arginina o sus derivados o análogos como, por ejemplo, ornitina o

citulina, con preferencia lisina o arginina, en particular lisina. En este caso, lisina o arginina pueden ser derivados, en lugar del grupo carboxamida, por uno o varios de otro grupo reactivo, en particular seleccionados a partir del grupo de éster de aminoácido, éster de péptido, anhídrido y halogenuro y se pueden emplear de manera correspondiente en el procedimiento de acuerdo con la invención.

5 El concepto "enzima con actividad biológica de tripsina" significa, además de las tripsinas conocidas y disponibles en el comercio a partir de las fuentes convencionales como rata, buey, cerdo, hombre, perro, ratón, sus isoenzimas, derivados o variantes, también enzimas con propiedades bioquímicas muy afines como, por ejemplo, catepsina, tripsina de *Fusarium osyosporum* y de *Streptomyces* (*S. griseus*, *S. exoliatum*, *S. etythraeus*, *S. fradiae* y *S. albidoflavus*), triptasa, mastina, acrosina, calicreína, hepsina, prostasina I, lisilendopentidasa (Lys-C) y  
10 endoproteinasa-Arg-C (clostripaína).

En este caso, está claro para el técnico que esta enumeración no es exhaustiva y en el marco de la investigación biotecnológica se describen constantemente otras enzimas, isoenzimas, derivados o variantes, que se pueden disociar en aminoácidos básicos específicamente C-terminales. De manera alternativa, la especificidad de las  
15 enzimas se puede modificar a través de modificación o mutación química el péptido en el plano DNS (muteína). Además, la especificidad y la actividad de enzimas se pueden modificar claramente a través de la selección adecuada de las condiciones de reacción.

En la forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, se aprovecha la capacidad de microorganismos para fabricar péptidos heterólogos. A tal fin, la secuencia de péptido deseada se traduce a la  
20 secuencia DNS correspondiente, que se acopla a una secuencia promotora específica del huésped. En función de la estrategia de expresión se puede expresar en este caso el péptido objetivo de tal manera que se forma por las células, que permanecen intracelularmente, directa o indirectamente como péptido de fusión.

Si se selecciona una estrategia de fusión utilizando un péptido de fusión adecuado, entonces está claro para el técnico que los socios de la fusión deben estar unidos entre sí por medio de un miembro de puente, que permite la  
25 disociación específica de los socios de tal manera que el término-N deseado del péptido objetivo está presente después del procesamiento. En el sentido de la presente invención, el péptido objetivo es un compuesto de la fórmula II. Para la configuración de miembros de puente adecuados existen una pluralidad de posibilidades, que son conocidas por el técnico y que se amplían constantemente. Si se selecciona, por ejemplo, el aminoácido metionina, entonces es posible una disociación química con halógeno ciano. Si se selecciona, por ejemplo, como miembro de  
30 puente un pentapéptido de la secuencia DDDDK, entonces es posible una disociación con enteroquinasa. Si se selecciona, por ejemplo, la secuencia tetrapéptido, entonces se puede realizar la disociación a través del factor Xa. Con una configuración correspondiente se pueden utilizar para péptidos, cuyo término-N comienza con histidina, Generase® como enzima de procesamiento. Si el término-N se caracteriza por el dipéptido Gly-Ser, se puede seleccionar como miembro de puente el tetrapéptido LVPR, de manera que se obtiene un lugar de reconocimiento y lugar de disociación para trombina. Aunque se emplea una enzima con la actividad biológica de tripsina de acuerdo  
35 con la invención para la copulación del péptido, en principio ya en este lugar del procedimiento de acuerdo con la invención es posible el empleo de tal enzima. Así, por ejemplo, en primer lugar se puede utilizar tripsina en medio acuoso para la disociación de la parte de fusión del péptido de fusión, si se inserta lisina o arginina como miembro de puente entre la parte de fusión y el péptido objetivo.

Pero de manera alternativa también el péptido, cuando es compatible para exportación, se puede centrifugar en el  
40 medio de cultivo celular o bien en forma de un péptido de fusión o en su forma nativa. A tal fin, se pueden utilizar células huéspedes recombinantes, en particular aquéllas de microorganismos, con preferencia de bacterias o levaduras. Si se seleccionan células bacterianas como sistema de expresión, se tiene, además, la opción se centrifugar directamente el péptido objetivo o un péptido de fusión correspondiente, que comprende el péptido objetivo, es decir, en el sentido de la invención un compuesto de la fórmula II, en el periplasma o en el medio de  
45 cultivo. En este caso, está claro para el técnico que la exportación está limitada con frecuencia cuando el extremo C-terminal consta de más de un aminoácido básico.

A tal fin, en principio, el técnico conoce los organismos huésped y los métodos que están a su disposición (ver, por ejemplo, Gellissen, Gerd (ed.) *Production of Recombinant Proteins*, ISBN 3-527-31036-3). Éstos se pueden adquirir también en el comercio a partir de una pluralidad de proveedores. Como representantes se mencionan las Firmas  
50 New England Biolabs, Invitrogen y Roche. En las descripciones de los catálogos de tales Firmas se encuentran citas de la literatura, que proporcionan una visión de conjunto sobre la tecnología. En este caso está claro para el técnico que el espectro de los microorganismos que se pueden utilizar se amplía constantemente, lo mismo que el repertorio de los métodos biotecnológicos. También las formas de realización más especiales a este respecto son comprendidas por el objeto de la presente invención.

55 Como representación se mencionan a modo de ejemplo los siguientes sistemas huéspedes / vectores. Bacterias del tipo *E. coli*, *S. carnosus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas fluorescens* así como levaduras del tipo *K. lactis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae*.

No obstante, el técnico es consciente de que estos sistemas ejemplares conocidos ofrecen una pluralidad de posibilidades de variación, que resultan, por ejemplo de la selección de promotores adecuados o de otras

secuencias reguladoras de ácido nucleico, de las propiedades genéticas de la célula huésped y de los vectores utilizados (con ejemplo, con respecto al número de copias de DNS, de la selección del medio de selección, etc.).

De la misma manera, el técnico es consciente de que para cada péptido objetivo, en virtud de sus propiedades físico-químicas, debe adaptarse un procedimiento especial para la purificación, si éste debe prepararse en forma aislada. Esto se consigue, en principio, a través de la combinación adecuada de métodos de separación bioquímicos o bien biofísicos conocidos. En este caso está claro de la misma manera que, en virtud de los nuevos materiales (por ejemplo, para cromatografía), se abren constantemente nuevas posibilidades para conseguir o bien optimizar el éxito deseado de la purificación.

En el sentido de la presente invención, puede ser ventajosa la fusión del péptido precursor con una secuencia de péptido que permite, por ejemplo, una purificación cromatográfica de afinidad.

Para la configuración adicional de la invención se fabrican a modo de ejemplo derivados de extensina, como se conocen a partir del documento US2004/0106547. Tales péptidos derivados de extensina pueden jugar un papel importante en el desarrollo de medicamentos, en virtud de su acción reductora de azúcar en sangre, en el tratamiento de diabetes u otros trastornos del metabolismo. Por lo tanto, en el sentido farmacéutico es conveniente proporcionar tales péptidos en forma suficiente.

La solicitud de patente internacional WO 02/066628 describe un derivado de hirudina, que termina C-terminal con los aminoácidos Lys-Arg. El perfil activo antitrombótico se puede modificar porque se amida arginina C-terminal. A tal fin, la fase previa termina el Terminal C con lisina y lleva a cabo a continuación de acuerdo con la invención una reacción de copulación con argininamida, de manera que se obtiene el derivado de hirudina amidado. La fabricación de las fases previas se puede realizar como se describe en la solicitud a través de secreción de levadura. A tal fin, se prolonga a modo de ejemplo la secuencia genética descrita en el documento EP-A 0 324 712 para Leu-Hirudina en un codon para lisina y se prosigue, como se describe, por ejemplo, en la publicación de patente para la fabricación de la hirudina prolongada en lisina. De manera alternativa, se puede seguir también el camino de la secreción de la fase previa a través de bacterias. A tal fin, se utiliza, por ejemplo, la tecnología descrita en la solicitud de patente EP-A 1 216 259.

Los ejemplos siguientes sirven para la ilustración de la presente invención y de ninguna manera están concebidos como limitación con respecto a los objetos de la presente invención.

#### **Ejemplo 1: Síntesis de una secuencia DNS específica de E. coli que codifica AVE (1-43)**

En primer lugar, se fabricó la secuencia genética SEQ ID N° 6 que codifica el péptido AVE (1-43) (SEQ ID N° 7):

SEQ ID No. 6:

```
TTTTTTAAGCTTGCACGGTGAAGGTACCTTCACCTCCGA
GAAGAAGAAGCTGTTCTGTCTGTTTCATCGAATGGCTGAA
CCGGTGCTCCGCCCTTCGAAAAGAAGAAAAGTGATAA
CCGCACCTGGTCGACGAATTCAAA AAAA
```

SEQ ID No. 7:

```
HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
```

La síntesis de la secuencia genética se realizó por medio de tecnología PCR. A tal fin, se fabricaron las 5 imprimaciones siguientes por medio de síntesis química DNS. Esta síntesis se realizó por medio de Expedite™ DNS-Synthese-Systems (Fa. Applied Biosystems).

a) La imprimación zp5u tiene la secuencia (SEQ ID N° 8):

5'- TTTTTTAAGCTTGCACGGTGAAG – 3'

La SEQ ID N° 8 comprende el intervalo 1 a 23 de la trenza de sentido ('sense'). El triplete CAC codifica histidina como primer aminoácido del péptido objetivo.

b) La imprimación zp3a tiene la secuencia (SEQ ID N° 9):

5'- CTTCCATCTGTTTGGACAGGTCGGAGGTGAAGGTACCTTCACCGTGCAAG CTTAAAAA – 3'

La SEQ ID N° 9 comprende el intervalo 1-59 de la trenza inversa ('antisentido')

- c) La imprimación zp3b tiene la secuencia (SEQ ID N° 10):

5'- GGACGGACCACCGTTTTTCAGCCATTGATGAACAGACGAACAGCTTCTTCTCCATCTGTTTGGACA  
G- 3'

5 La SEQ IF N° 10 comprende el intervalo 40-108 de la trenza inversa ('antisentido').

- d) La imprimación zp3c tiene la secuencia (SEQ ID N° 11):

5'- CGTGCATGCTATTATCACTTTTTCTTTTTCGAAGGCGAGCACCGGAGGACGGACCACCGTTTTTC-3'

La SEQ ID N° 11 comprende el intervalo 91-159 de la trenza inversa ('antisentido').

10

El triplete antisentido CTT codifica el último aminoácido (AS43) del péptido objetivo.

- e) La imprimación zp3d tiene la secuencia (SEQ ID N° 12):

5'- TTTTTTGAATTCGTCGACCAGGTGCGGCCGCACGTGCATGCTATTATCACTT-3'

15

La SEQ ID N° 12 comprende el intervalo residual de la trenza inversa ('antisentido')

Con las imprimaciones se realizaron en secuencia 4 reacciones PCR en las condiciones estándar a 54°C. En la reacción 1 se emplearon, respectivamente, 100 nm de las imprimaciones zp3a y zp5u. El número de ciclos PCR era 5. En la segunda fase se convirtieron 1/40 de la reacción, respectivamente, con 100 ng de las imprimaciones zp5u y zp3b en 10 ciclos. En la reacción 3 se convirtieron en otros 10 ciclos 1/40 del producto de la reacción 2, respectivamente, con 100 ng de las imprimaciones zp5u y zp3c. Por último, se sintetizó en 25 ciclos PCR con 1/40 del rendimiento de la reacción 3 y las imprimaciones zp5u y zp3d el fragmento DNS deseado, cuya longitud fue controlada con electroforesis en gel. El fragmento DNS deseado fue purificado y fue transformado con las enzimas de restricción EcoR1 y a continuación con Hind3 de acuerdo con las indicaciones del fabricante (New England Biolabs).

20

25 En paralelo se convirtió DNS del plásmido pEC19 (New England Biolabs) con las enzimas EcoR1 y Hind3. Los fragmentos de los preparados de disociación fueron separados a través de un gel de agarosa al 1,2 % y a continuación se aisló el fragmentos del vector residual de pUC19 y el producto deseado de la reacción 4. Los fragmentos purificados fueron ligados entre sí en una reacción T4-ligasa durante la noche a 16°C. A continuación se transformaron células E. coli competentes (Stratagene, Cepa E. coli XL10 Gold), con el preparado de ligazón y se realizaron cultivos sobre placas de agar que contenían 25 mg/l de ampicilina. A partir de los clones individuales se aisló el plásmido DNS y se caracterizó por medio de análisis de secuencia DNS.

30

El plásmido DNS del fragmento deseado contenía la designación pSCHPUCZP1-43 y sirvió como material de partida para la fabricación detectores de expresión para la síntesis de los compuestos de la fórmula I en células E. coli K12.

### **Ejemplo 2: Construcción de un vector de expresión para AVE (1-43)**

35 El documento US 5496924, cuyo contenido se incluye de esta manera expresamente en la presente solicitud a través de referencia, propone un sistema de expresión, que permite expresamente la fabricación de proteínas de fusión cortadas a medida. La ventaja del sistema reside en que se pueden fabricar proteínas de fusión con una porción de lastre pequeña. El sistema de expresión se utiliza a modo de ejemplo en la solicitud. Si se fusionan las secciones de la secuencia A—B sobre la secuencia de reconocimiento de enteroquinasa DDDDK con AVE (1-43), entonces se obtiene una proteína de fusión, con la siguiente secuencia genética y de aminoácidos (SEQ ID N° 13 y

40 N° 14):

SEQ ID No. 13:

5'-GGAAACAGAATTCATGGCGCCGACCTCTTCTTCTACC  
CAACTGGAACACCTGCTGCTGGACCTGCAGATGATCCT  
ACAAAAACCCGAAACTGACGCGTATCGACGATGACGAT  
CTTCACCTCCGACCTGTCCAAACAGATGGAAGAAGAAG  
GAATGGCTGAAAAACGGTGGTCCGTCCTCCGGTGCTCC  
AAAAAGTGATAATAGCATGCACGTGCGGCCGCAAGCTT

Los codones ATG y AAG marcan el primero y el último aminoácido del péptido de fusión.

SEQ ID N° 14:

5 MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKÑTRI DDDDKHGEGT FTSDLSKQME EEAVRLFIEW  
LKNGGPSSGA PPSKKKKK

La fabricación de la secuencia genética codificadora se realizó por medio de tecnología PCR. A tal fin se sintetizaron las siguientes imprimaciones:

1) Imprimación psw3\_zpcolf (SEQ ID N° 15):

5'-CGTATCGACGATGACGATAAACACGGTGAAGGTACCTTC-3'

10 La secuencia de la imprimación cubre en este caso el lugar de reconocimiento de la enteroquinasa y el comienzo de la secuencia codificadora de AVE<sub>1-43</sub>.

2) Imprimación psw3\_zpcolrev (SEQ ID N° 16):

5'-GTGTTTATCGTCATCGTCGATACGCGTCAGTTTCGC-3'

15 La secuencia corresponde en este caso a una secuencia sintética derivada de interleuquina 2, que cubre, de acuerdo con la Tabla I del documento US5496924, los aminoácidos 34-38 así como 2/3 del codón para el aminoácido metionina. El resto de la secuencia de imprimación se solapa con la imprimación psw3\_zpcoli.

3) pBprimef1 (SEQ ID N° 17):

5'-TGAGCGGATAACAATTTACACAC-3'

20 La imprimación se hibridiza aguas arriba con la interfaz Eco RI, que está contenida en el plásmido pK50 (ver la figura 33 del documento US5496924).

4) psw3\_ave\_1-43\_rev con la interfaz Hind3 (SEQ ID N° 18):

5'-TTTTTTAAGCTTGCGGCCGCACGTGCTATTACTT

25 Se realizaron dos PCR en paralelo. Una fue realizada sobre DNS del plasmado pK50 con la pareja de imprimaciones pBprimef1 y psw3\_zpcolrev a 50°C y la otra reacción fue realizada con la pareja de imprimaciones psw3\_zpcolf y psw3\_ave\_1-43\_rev a 54°C sobre DNS del plásmido pSCHPUCZP1-43. Los rendimientos de las PCR se reunieron después de la separación electroforética en gel, se mezcló, respectivamente, una parte alícuota en la relación 1:1 y a continuación se hicieron reaccionar con una tercera PCR con la pareja de imprimaciones pBprimef1 y psw3\_ave\_1-43\_rev. El rendimiento de la PCR se hizo reaccionar con las enzimas EcoR1 y Hind3 y se introdujo en el plásmido pK50 abierto paralelamente con estas enzimas en una reacción de T4-ligasa. Células competentes E. coli BL21 fueron transformadas con la mezcla de ligación y se prepararon cultivos en placas sobre agar selectivo, que contenía 25ml/l de ampicilina. De algunos clones se re-aisló plásmido DNS y se analizó por medio de PCR u análisis siguiente de la secuencia DNS. Los plásmidos correctos recibieron el nombre pBZP43. Se verificaron clones E.Coli BL21:pBZP43 para la expresión de la proteína de fusión. Esto se realizó de manera similar al ejemplo 14 de la patente US5496924. Los productos de expresión fueron analizados por espectrometría de masas y sobre SDS-PAGE y se determinó el término N por medio de análisis de la secuencia de proteína. Se seleccionó un clon  
35 adecuado para la fermentación de cantidades mayores de material.

### Ejemplo 3: Construcción de un vector de expresión para AVE (1-39)

El plásmido pBZP43 sirve como plantilla para la reacción PCR, que se realiza con las imprimaciones pBprimef1 (ejemplo 2) y psw3\_ave\_39rev. El producto de la PCR se hizo reaccionar con las enzimas de restricción EcoRI y



NorI de acuerdo con las indicaciones del fabricante de la enzima y se insertó en una reacción de T4 – ligasa en el plásmido pBZP43 abierto en la EcoRI/NotI. Se obtuvo el plásmido pBZP39, con el que se prosiguió, como se describe en el ejemplo 2.

psw3\_ave\_39rev (SEQ ID N° 19):

5' - TTTTTCGCGGCCGCACGTGCATGCTATTATCATTTCGAAGGCGGAGCACC-3'

El triplete TTT codifica lisina en posición 39.

#### **Ejemplo 4: Construcción de un vector de expresión para ave (1-38-Arg)**

El plásmido pBZP43 sirve como plantilla para la reacción PCR, que se realiza con las imprimaciones pBprimef1 (ejemplo 2) y psw3\_ave\_38rev. El producto de la PCR se hizo reaccionar con las enzimas de restricción EcoRI y NorI de acuerdo con las indicaciones del fabricante de la enzima y se insertó en una reacción de T4 – ligasa en el plásmido pBZP43 abierto en la EcoRI/NotI. Se obtuvo el plásmido pBZP38arg, con el que se prosiguió, como se describe en el ejemplo 2.

Imprimación: psw3\_ave38\_argrev 8SEQ ID N° 20):

5' - TTTTTCGCGGCCGCACGCATGCTATTATCATACGCGAAGGCGGAGCACCG-3'

15 El triplete AGC codifica arginina en posición 39.

#### **Ejemplo 5: Fermentación de las cepas construidas en los ejemplos 2 a 4**

La fermentación se realizó con desviaciones reducidas como se describe en la solicitud de patente alemana DE 10 2004 058306.4, ejemplo 2. Células E. coli BL21, transformadas con diferentes vectores de plásmidos que codifican derivados (proteína de fusión) del péptido objetivo, fueron cultivadas en medio de sal mineral o medio complejo (ver ejemplo 1) a 30°C o 37°C y un valor pH de 7,0 en un fermentador. El ajuste del valor pH se realizó con una solución  $\text{NH}_4^+$  (26 % en agua). La ventilación del cultivo se aseguró a través de una estrategia de regulación, que contenía el oxígeno disuelto en el caldo de cultivo constantemente a 30 %. Para Procesos Fed Batch en medio de sal mineral se agregó a la fase Batch una solución de glucosa (60 % peso/vol) (8 g/L/h hasta 26g/L/h). La inducción de la expresión de la proteína se realizó a través de la adición de IPTG (1 – 4 mM concentración final (f.c.)). La duración de tiempo de la inducción fue de 6 a 8 horas. La expresión de las proteínas objetivo se verificó a través de electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

La expresión de proteína de fusión de fases previas AVE en E. coli BL21/pBZP43 se realizó como se describe a continuación:

30 A partir de un cultivo duradero almacenado a -80°C de células E. coli BL21 se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  de suspensión de células y se incubaron en 0,5 L de medio de cultivo previo a 37°C con agitación en el transcurso de 10 a 16 horas. El cultivo principal en el fermentador se incubó a una densidad de inoculación de 0,01 a 0,05  $\text{OD}_{600}$  con una cantidad correspondiente de pre-cultivo.

Medio de cultivo previo:

5g/L Bacto trypton

35 10 g/L extracto de levadura

5 g/L NaCl

Medio de cultivo principal:

Medio de sal mineral definido (medio mínimo) a base de glucosa como fuente de carbono (Jeffrey H. Millar: Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)).

40 Después del agotamiento de la glucosa presente inicialmente en el medio de cultivo principal, se agregó una solución de glucosa. La expresión de la proteína se indujo a través de la adición de IPTG (1 mM f.c.) y se observó la expresión de la proteína de fusión después de la inducción. Utilizando, por ejemplo, el sistema de análisis SDS-PAGE de la Firma Novex (NuPage® Novex 12 % sistema de gel, Invitrogen™) se analizaron de acuerdo con los datos del fabricante en la fermentación, respectivamente, 0,02  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de suspensión de células, que se extrajeron desde el fermentador en diferentes instantes del cultivo.

#### **Ejemplo 6: Purificación de las proteínas de fusión fabricadas en el ejemplo 5**

1000 g de biomasa de una cepa E. coli recombinante fueron resuspendidos en 1000 ml de tampón Tris (50 mM Tris/HCl, pH 7,4). La disgregación de las células se realizó a través de homogeneización a alta presión dos veces (homogeneizador de alta presión Rannie 1000 bares). A través de la adición de benzonasa (1000 U/L) y cloruro de

magnesio (10 mM) se llevó a cabo la digestión del DNS genómico en el transcurso de 1,5 horas. La purificación de la proteína de fusión se realizó a través de cromatografía de lecho expandido. A tal fin, se diluyó el homogeneizado celular en 10 litros con tampón (50 mM Tris/HCl, pH 7,4) y se aplicó directamente sobre una columna de cromatografía equilibrada con tampón (50 mM Tris/HCl, pH 7,4) (Streamline SP XL, GE Healthcare). Después de la aplicación de las muestras se llevó a cabo una etapa de lavado con tampón de equilibrado (volumen de 6 columnas), seguido por otra etapa de lavado con tampón de alto contenido de sal al 7 % (50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 M NaCl). La elusión se realizó a través de aclarado con un volumen de 10 columnas de tampón de alto contenido de sal al 20 %. La verificación de la piletta de elusión se realizó a través de electroforesis en gel SDS (NuPage® Novex sistema de gel al 12 %, Invitrogen) y HPLC. La piletta de proteína de fusión se empleó después de la diafiltración en tampón de enteroquinasa (50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 50 mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>) para la reacción de disociación de proteasa. La disociación de las proteínas de fusión se realizó por medio de enteroquinasa (Invitrogen) en tampón de enteroquinasa (20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,4) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

#### **Ejemplo 7: Separación de los productos de disociación a partir de la reacción de disociación de enteroquinasa**

La separación de los productos de disociación se realizó de acuerdo con el ejemplo 6 de la solicitud de patente alemana DE 102004058306.4. Después de la disociación de las proteínas de fusión por medio de enteroquinasa se separaron los productos de disociación unos de los otros por medio de cromatografía de intercambio de iones (Source 30S, Amersham Biosciences). La densidad de los iones de la solución se llevó aproximadamente a 7 mS/cm a través de dilución con H<sub>2</sub>O. Después de cargar la solución de proteína en la columna previamente equilibrada (20 mM Tris/HCl, pH 7,4; ajustada con NaCl a una conductividad de aproximadamente 7 mS/cm), el material no ligado se eliminó por lavado con tampón al 15 % (20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 500 mM NaCl). La elusión de las fases previas de péptido AVE se realizó a través de la aplicación de un gradiente sobre 10 volúmenes de la columna sobre 100 % de tampón B. La identificación de las fracciones que contienen precursor AVE se realizó a través de electroforesis en gel SDS, HPLC y espectrometría de masas. Las fracciones correspondientes fueron purificadas, desalinizadas, y liofilizadas después de la eliminación del disolvente orgánico.

#### **Ejemplo 8: Copulación de péptido de AVE (1-39) con H-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>**

0,2 mg de AVE (1-39) (MW 4218; 0,047 μmol; 1 g/L concentración final) fueron pesados en un matraz de reacción de polipropileno de 1,5 mL. Se añadieron 11 μL de 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6; 60 μL de una solución de 129 g/L de H-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>.HCl en 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6 (contiene 7,75 mg de H-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>.HCl = 27,5 μmol = 585 mol H-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>.HCl por mol de AVE (1-39)) y 119 μL de DMF. La solución clara se atemperó a 12°C. La reacción se inició a través de la adición de 10 μL de una solución de 2 g/L de tripsina en agua (contiene 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-39)). La solución de reacción se incubó a 12 °C bajo agitación a 1000 min<sup>-1</sup>. Se extrajeron regularmente muestras para el control del proceso y se detuvo a través de dilución con 9 vol de una solución de 17 % de agua, 17 % de cetonitrilo y 64 % de ácido trifluoracético. El desarrollo de la reacción se siguió a través de LC-MS. Después de la consecución del rendimiento máximo se aciduló la reacción a través de la adición de ácido trifluoracético a un valor pH inferior a 2,5 y se purifico por cromatografía.

#### **Ejemplo 9: Copulación de péptido de AVE (1-43) con H-Lys-NH<sub>2</sub>**

3,85 mg de AVE (1-43) (MW 4731; 0,814 μmol; 20 g/L concentración final) fueron pesados en un matraz de reacción de polipropileno de 1,5 mL. Se añadieron 41 μL de una solución de 620 g/L de H-Lys-NH<sub>2</sub>.2HCl en 0,1 M tampón de sodio-acetato pH 5,8 (contiene 25,6 mg de H-Lys-NH<sub>2</sub>.2HCl = 117,5 μmol = 144 mol H-Lys-NH<sub>2</sub>.2HCl por mol de AVE (1-43)), 116 μL de DMF y 32 μL de 0,1 M tampón de sodio-acetato pH 5,6. La solución clara se atemperó a 12°C. La reacción se inició a través de la adición de 2,9 μL de una solución de 20 g/L de tripsina en agua (contiene 0,06 mg de tripsina = 0,015 g de tripsina por g de AVE (1-43)). La solución de reacción se incubó a 12 °C bajo agitación a 900 min<sup>-1</sup>. Se extrajeron regularmente muestras para el control del proceso y se detuvo a través de dilución con 9 vol de una solución de 17 % de agua, 17 % de cetonitrilo y 64 % de ácido trifluoracético. El desarrollo de la reacción se siguió a través de LC-MS. Después de la consecución del rendimiento máximo se aciduló la reacción a través de la adición de ácido trifluoracético a un valor pH inferior a 2,5 y se purifico por cromatografía.

#### **Ejemplo 10: Copulación de péptido de AVE (1-39) con H-Lys-NH<sub>2</sub>**

0,2 mg de AVE (1-39) (MW 4218; 0,047 μmol; 1 g/L concentración final) fueron pesados en un matraz de reacción de polipropileno de 1,5 mL. Se añadieron 11 μL de 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6; 60 μL de una solución de 100 g/L de H-Lys-NH<sub>2</sub>.2HCl en 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6 (contiene 6,0 mg de H-Lys-NH<sub>2</sub>.2HCl = 27,5 μmol = 585 mol H-Lys-NH<sub>2</sub>.2HCl por mol de AVE (1-39)) y 119 μL de DMF. La solución clara se atemperó a 12°C. La reacción se inició a través de la adición de 10 μL de una solución de 2 g/L de tripsina en agua (contiene 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-39)). La solución de reacción se incubó a 12 °C bajo agitación a 1000 min<sup>-1</sup>. Se extrajeron regularmente muestras para el control del proceso y se detuvo a través de dilución con 9 vol de una solución de 17 % de agua, 17 % de cetonitrilo y 64 % de ácido trifluoracético. El desarrollo de la reacción se

siguió a través de LC-MS. Después de la consecución del rendimiento máximo se aciduló la reacción a través de la adición de ácido trifluoracético a un valor pH inferior a 2,5 y se purificó por cromatografía.

#### **Ejemplo 11: Copulación de péptido de AVE (1-39) con H-Arg-NH<sub>2</sub>**

5 0,2 mg de AVE (1-39) (MW 4218; 0,047  $\mu$ mol; 1 g/L concentración final) fueron pesados en un matraz de reacción de polipropileno de 1,5 mL. Se añadieron 11  $\mu$ L de 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6; 60  $\mu$ L de una solución de 113 g/L de H-Arg-NH<sub>2</sub>·2HCl en 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6 (contiene 6,77 mg de H-Arg-NH<sub>2</sub>·2HCl = 27,5  $\mu$ mol = 585 mol H-Arg-NH<sub>2</sub>·2HCl por mol de AVE (1-39)) y 119  $\mu$ L de DMF. La solución clara se atemperó a 12°C. La reacción se inició a través de la adición de 10  $\mu$ L de una solución de 2 g/L de tripsina en agua (contiene 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-39)). La solución de reacción se incubó a 12 °C bajo  
10 agitación a 1000 min<sup>-1</sup>. Se extrajeron regularmente muestras para el control del proceso y se detuvo a través de dilución con 9 vol de una solución de 17 % de agua, 17 % de cetonitrilo y 64 % de ácido trifluoracético. El desarrollo de la reacción se siguió a través de LC-MS. Después de la consecución del rendimiento máximo se aciduló la reacción a través de la adición de ácido trifluoracético a un valor pH inferior a 2,5 y se purificó por cromatografía.

#### **Ejemplo 12: Copulación de péptido de AVE (1-43) con H-Arg-NH<sub>2</sub>**

15 0,25 mg de AVE (1-43) (MW 4731; 0,047  $\mu$ mol; 1,1 g/L concentración final) fueron pesados en un matraz de reacción de polipropileno de 1,5 mL. Se añadieron 11  $\mu$ L de 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6; 60  $\mu$ L de una solución de 113 g/L de H-Arg-NH<sub>2</sub>·2HCl en 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6 (contiene 6,77 mg de H-Arg-NH<sub>2</sub>·2HCl = 27,5  $\mu$ mol = 585 mol H-Arg-NH<sub>2</sub>·2HCl por mol de AVE (1-43)) y 119  $\mu$ L de DMF. La solución clara se atemperó a 12°C. La reacción se inició a través de la adición de 10  $\mu$ L de una solución de 2 g/L de tripsina en agua (contiene 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-43)). La solución de reacción se incubó a 12 °C bajo  
20 agitación a 1000 min<sup>-1</sup>. Se extrajeron regularmente muestras para el control del proceso y se detuvo a través de dilución con 9 vol de una solución de 17 % de agua, 17 % de cetonitrilo y 64 % de ácido trifluoracético. El desarrollo de la reacción se siguió a través de LC-MS. Después de la consecución del rendimiento máximo se aciduló la reacción a través de la adición de ácido trifluoracético a un valor pH inferior a 2,5 y se purificó por cromatografía.

#### **Ejemplo 13: Copulación de péptido de AVE (1-38)-Arg con H-Lys-NH<sub>2</sub>**

25 0,2 mg de AVE (1-38)-Arg (MW 4246; 0,047  $\mu$ mol; 1 g/L concentración final) fueron pesados en un matraz de reacción de polipropileno de 1,5 mL. Se añadieron 11  $\mu$ L de 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6; 60  $\mu$ L de una solución de 100 g/L de H-Lys-NH<sub>2</sub>·2HCl en 0,1 M tampón de piridina-acetato pH 5,6 (contiene 6,0 mg de H-Lys-NH<sub>2</sub>·2HCl = 27,5  $\mu$ mol = 585 mol H-Lys-NH<sub>2</sub>·2HCl por mol de AVE (1-38)-Arg) y 119  $\mu$ L de DMF. La solución clara se atemperó a 12°C. La reacción se inició a través de la adición de 10  $\mu$ L de una solución de 2 g/L de tripsina en agua (contiene 0,02 mg de tripsina = 0,002 g de tripsina por g de AVE (1-38)-Arg). La solución de reacción se incubó a 12 °C bajo agitación a 1000 min<sup>-1</sup>. Se extrajeron regularmente muestras para el control del proceso y se detuvo a través de dilución con 9 vol de una solución de 17 % de agua, 17 % de cetonitrilo y 64 % de ácido trifluoracético. El desarrollo de la reacción se siguió a través de LC-MS. Después de la consecución del rendimiento máximo se aciduló la reacción a través de la adición de ácido trifluoracético a un valor pH inferior a 2,5 y se purificó por cromatografía.

#### **Ejemplo 14: Copulación de péptido de AVE (1-43) con H-Lys-(Boc)-NH<sub>2</sub>**

35 20 mg de AVE (1-43) (MW 4731; 1,058  $\mu$ mol; 20 g/L concentración final) fueron pesados en un matraz de reacción de polipropileno de 2 mL. Se añadieron 370  $\mu$ L de una solución de 482 g/L de H-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>·HCl en 0,1 M tampón de sodio-acetato pH 5,5 (contiene 155 mg de H-Lys-(Boc)-NH<sub>2</sub>·HCl = 550  $\mu$ mol = 130 mol H-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>·HCl por mol de AVE (1-43)), 600  $\mu$ L de DMF. La solución clara se atemperó a 12°C. La reacción se inició a través de la adición de 30  $\mu$ L de una solución de 3,3 g/L de tripsina en agua (contiene 0,1 mg de tripsina = 5 mg de tripsina por g de AVE (1-43)). La solución de reacción se incubó a 12 °C bajo agitación a 1000 min<sup>-1</sup>. Se extrajeron regularmente  
40 muestras para el control del proceso y se detuvo a través de dilución con 9 vol de una solución de 17 % de agua, 17 % de cetonitrilo y 64 % de ácido trifluoracético. El desarrollo de la reacción se siguió a través de LC-MS. Después de la consecución del rendimiento máximo se aciduló la reacción a través de la adición de ácido trifluoracético hasta una concentración final de 50 % (v/v). De esta manera se detuvo la reacción y al mismo tiempo se eliminó cuantitativamente el grupo protector Boc. El producto de reacción se purificó por cromatografía.

#### **Ejemplo 15: Purificación de los derivados de AVE**

45 La mezcla de reacción de las reacciones de copulación se separó a continuación a través de cromatografía RP con Amberchrom CG300 XT 20 como material de soporte y el péptido objetivo amidado se aisló a partir de la fracción de eluato correspondiente a través de una etapa de intercambio de iones con Source 30S como soporte. Después de la desalinización sobre columnas de Amberchrom, el producto está presente para la formulación como medicamento. La identidad de la estructura del producto se verificó por medio de analítica MALDI-MS y RMN.

55

**Ejemplo 16: Fabricación de Leu-Hirudin<sub>1-65</sub> Lys – Arg-NH<sub>2</sub>**

El ejemplo 1 de la solicitud de patente EP-A 1 216 259 describe la fabricación de un plásmido de expresión, que permite la secreción de Leu\_hirudin en sobrenadantes bacterianos. El ADN del plásmido se emplea como plantilla en una PCR estándar. Como imprimación precursora se utiliza en la reacción la secuencia smompaf2 descrita en el ejemplo. Como contra imprimación se utiliza el oligonucleótido hit\_lys66\_rev (SEQ ID N°:21), que presenta la siguiente secuencia:

5' – TTTTAAAGC TTCTATTATTTCTGAAGGTA TTCCTCAGGG – 3'

Hind3

En este caso, el codon subrayado codifica lisina. Desde la posición 22 hasta la posición 40 (extremo), la secuencia es complementaria a la sección de secuencia 178 – 195 de la secuencia representada en la Tabla 1 de la solicitud EP-A 1 216 259.

Como se describe en el ejemplo, se realizó la PCR, se digirió el producto con las enzimas de restricción EcoR1 y Hind3 y se insertan en el vector pJF118 correspondientemente abierto. Después de la caracterización se transformó el ADN como en el ejemplo 11 de la solicitud de patente EP-A 1 216 259 según E. coli K12 y se expresó y se purificó el producto intermedio. A continuación se realizó de acuerdo con el ejemplo 13 de la presente solicitud, de acuerdo con las molaridades, la transformación con argininamida en Leu-Hirudin<sub>1-65</sub> Lys – Arg-NH<sub>2</sub>. Si se lleva a cabo la expresión directamente en la cepa MC1061 utilizada como cepa huésped intermedia, entonces se encuentra producto también en el espacio periplasmático. Esto hace necesario para el aislamiento del producto intermedio una disgregación celular de acuerdo con métodos conocidos como etapa adicional de procesamiento.

**Ejemplo 17: Análisis de reacciones de copulación de péptido en derivados de AVE**

El seguimiento analítico de las reacciones de copulación según los ejemplos 8-14 se realizó a través de RP-HPLC en una columna Symmetry 300 150x4,6 mm, 5 µm de Waters. Como eluyente sirvió 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (eluyente A) y acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico (eluyente B). Se eluyó en un gradiente lineal en el transcurso de 15 minutos de 20 a 50 % B a una temperatura de las columnas de 60°C y un caudal de flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a 215 nm. Habitualmente se inyectan 5 µL de una muestra de reacción diluida 1:25. Los derivados de AVE desprotegidos se detectaron con tiempos de retención entre 7 y 120 min.

# ES 2 373 237 T3

004837DE.APP

## PROTOCOLO DE SECUENCIA

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> Procedimiento para la amidación de polipéptidos con aminoácidos básicos C-terminales utilizando  
5 endoproteasas específicas

<130> DE 2005/042

<140>

10 <141>

<160> 21

<170>

15

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:

Derivado de extendina-4

25 <400> 1

His Gly Glu Thr Phe Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Pro Ser

20 25 30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys

35 40

<210> 2

<211> 40

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:

Derivado de extendida-4

5 <400> 2

His Gly Glu Thr Phe Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Pro Ser

20 25 30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys

35 40

<210> 3

<211> 40

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:

20 Derivado de extendida-4

<400> 3

His Gly Glu Thr Phe Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

25 Glu Ala Val Arg Leu Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Pro Ser

20 25 30

004837DE.APP

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Arg

36 40

30

<210> 4

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:

Derivado de extendida-4

<400> 4

His Gly Glu Thr Phe Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

5            1                    5                            10                                    15

Glu Ala Val Arg Leu Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Pro Ser

                          20                            25                                    30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys lys Lys arg

                          37                            40

10

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:

Derivado de extendida-4

20 <400> 5

His Gly Glu Thr Phe Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

          1                    5                            10                                    15

Glu Ala Val Arg Leu Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Pro Ser

                          20                            25                                    30

25 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Arg Lys

                          38                            40

<210> 6

<211> 192

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: gen para

35                    Secuencia ID Nº 7

ES 2 373 237 T3

<400> 6  
tttttaagc ttgcacgggt aaggtagctt cacctccgac ctgtccaaac a  
agaagctgtt cgtctgttca tcgaatggct gaaaaacggt ggtccgtcct c  
gccttcgaaa aagaagaaaa agtgataata gcatgcacgt gcggccgcac c  
aattcaaaaa aa

<210> 7

<211> 44

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:

Derivado de extendina-4

10

<400> 7

His Gly Glu Thr Phe Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Pro Ser

15

004837DE.APP

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys

35 40

20 <210> 8

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: imprimación

<400> 8

tttttaagc ttgcacgggt aaf 23

30

<210> 9

<211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia artificial



ES 2 373 237 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: imprimación

5 <400> 9

cttccatctg tttggacagg tcggaggtga aggtaccttc accgtgcaac cttaaaaa 59

<210> 10

<211> 69

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: imprimación

15

<400> 10

ggacggacca ccgttttca gccattgat gaacagacga acagcttctt cttccatcth 60  
tttggacag

20 <210> 11

<211> 69

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: imprimación

<400> 11

cgtgcatgct attatcactt tttctctt ttcgaaggcg gagcaccgaa ggacggacca 60

30 ccgttttc

<210> 12

<211> 52

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: imprimación

<400> 12

tttttgatt tcgctgacca ggtgcggccg cacgtgcatg ctattatcac tt 52

5

<210> 13

<211> 314

004837DE.APP

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: gen para  
secuencia ID N° 14

<400> 13

ggaaacagaa ttcattggcgc cgacctcttc ttctaccaaa aagctcaact gc  
cacctgctgc tggacctgca gatgatcctg aacggatca acaactacaa aa  
ctgacgcgta tcgacgatga cgataaacac ggtgaaggta ccttcacctc cc  
aaacagatgg aagaagaagc tgttcgtctg ttcattcgaat ggctgaaaaa cc  
tcctccggtg ctccgccttc gaaaaagaag aaaaagtgat aatagcatgc ac  
gcaagcttaa aaaa

15

<210> 14

<211> 88

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:  
Proteína de fusión

25 <400> 14

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu

1 5 10 14

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

30 Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Ile Asp Asp Asp Asp Lys Hly Glu

35 40 45

Gly Thr Phe Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val

50 55 60



<210> 18

<211> 41

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: imprimación

10 <400> 18

ttttaagc ttgcggccgc acgtcatgc tattatcact t 41

<210> 19

<211> 50

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: imprimación

20

<400> 19

tttttgagg ccgcacgtgc atgctattat cattcgaag gccggagcacc 50

<210> 20

25 <211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: imprimación

<400> 20

tttttgagg ccgcacgtgc atgctattat catacggaa gccggagcac 52

35 <210> 21

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: imprimación

5

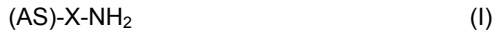
<400> 21

tttttaagc ttctattatt tctgaaggta ttctcaggg

40

**REIVINDICACIONES**

1.- Procedimiento para la fabricación de péptidos di o polibásicos amidados C-terminales de la fórmula general I



en la que

5 AS significa un péptido caracterizado por la secuencia  
 HGEGGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPSKK KKKK-NH<sub>2</sub>  
 (SEQ ID N° 1)

o

10 HGEGTFTSDL SKWMEEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPSKK KKKR-NH<sub>2</sub>  
 (SEQ ID N° 4)

y

X significa lisina o arginina;

en la que un péptido caracterizado por la secuencia

15 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPSKK KKK  
 (SEQ ID N° 7)

se hace reaccionar con N-Arg-NH<sub>2</sub> o H-Lys-NH<sub>2</sub> en presencia de una enzima con la actividad biológica de tripsina, en la que la enzima tiene la capacidad de disociar un enlace de péptido C-terminal en aminoácidos básicos y, dado el caso, el compuesto obtenido de la fórmula I es purificado según la química de proteínas.

20 2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en el caso de la fabricación del péptido caracterizado por la secuencia SEQ ID N° 1, la relación molar del péptido caracterizado por la secuencia SEQ ID N° 7 y H-Lys-NH<sub>2</sub> es 1 : 144 y en el caso de la fabricación del péptido caracterizado por la secuencia SEQ ID N° 4, la relación molar del péptido caracterizado por la secuencia SEQ ID N° 7 y H-Arg-NH<sub>2</sub> es 1 : 585.

3.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que

- 25 a) se expresa un péptido de fusión, que contiene un péptido caracterizado por la secuencia ID N° 7;
- b) el péptido caracterizado por la secuencia ID N° 7 es liberado por medio de disociación enzimática de dicho péptido de fusión;
- c) el producto intermedio de la etapa b), dado el caso después de purificación según la química de proteínas, se hace reaccionar, en presencia de una enzima con la actividad biológica de tripsina con H-Lys-NH<sub>2</sub> o H-Arg-NH<sub>2</sub>; y
- 30 d) dado el caso, el compuesto obtenido de péptidos caracterizado por las secuencias SEQ ID N° 1 ó 4 de la fórmula I es purificado según la química de proteínas y aislado.

4.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la disociación desde la proteína de fusión se realiza por medio de enteroquinasa, Factor Xa, genenasa, trombina o tripsina.

35 5.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la proteína de fusión se expresa en un sistema de expresión seleccionado a partir del grupo que contiene E. coli, S. carnosus, Salmonella, Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens. K. lactis, P. pastoris, Schizosaccharomyces pombe y S. cerevisiae.