



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

(11) (21) **PI 0400735-2 A**

(22) Data de Depósito: 23/03/2004
(43) Data de Publicação: 01/11/2005
(RPI 1817)



(51) Int. Cl.⁷.:
C12N 15/70
C07H 21/04

(54) Título: **MÉTODO PARA CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO POLIPEPTÍDEO AMILÓIDE DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS**

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Dahabada Helena José Lopes, Sérgio Teixeira Ferreira, Mari Cleide Sogayar, Theri Leica Degaki, Christian Colin

(74) Procurador: Armenio dos Santos Evangelista

(57) Resumo: "MÉTODO PARA CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO POLIPEPTÍDEO AMILÓIDE DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS". Método para clonagem e expressão do polipeptídeo das ilhotas pancreáticas (IAPP) maduro humano sob a forma recombinante, utilizando um sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli* baseado no promotor LacI-T7 RNA polimerase, no qual um fragmento de DNA que contém a sequência que codifica o peptídeo maduro de IAPP é amplificado por transcrição reversa e reação em cadeia da DNA polimerase (RT-PCR) a partir de RNA total derivado de ilhotas pancreáticas humanas, clonado em vetor de expressão como descrito acima e expresso em bactérias, e método de purificação empregando-se as etapas de lise das células, centrifugação do meio e resuspensão do precipitado em presença de agente desnaturante, centrifugação da solução, remoção do material insolúvel, coleta e filtração do sobrenadante clarificado, ligação da proteína a coluna de afinidade contendo íons metálicos imobilizados, clivagem com protease e eluição da rh-IAPP em forma purificada.

Relatório descritivo da Patente de Invenção “MÉTODO PARA CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO POLIPEPTÍDEO AMILÓIDE DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS”.

5 Refere-se a presente invenção a um método para clonagem, expressão e purificação do polipeptídeo amilóide das ilhotas pancreáticas humanas (IAPP), mais especificamente a um método para clonagem, expressão e purificação do polipeptídeo das ilhotas pancreáticas (IAPP) madura humana sob a forma recombinante, utilizando um sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli*
10 baseado no promotor LacI-T7 RNA polimerase.

Estado da Arte

A deposição de proteínas na forma de agregados amilóides insolúveis nos
15 tecidos é uma característica comum em um grande número de importantes doenças humanas, incluindo as doenças de Alzheimer, de Parkinson e de Huntington, o diabetes mellitus tipo II e as encefalopatias espongiiformes transmissíveis (Stefani, M. & Dobson C.M. (2003). *Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution*. J. Mol. Med. 81, 678-699). Estes depósitos amilóides de
20 origem protéica resultam da polimerização de peptídeos e ou proteínas que agregam formando folhas β -antiparalelas cruzadas. Por mecanismos que não são ainda completamente compreendidos, a deposição amilóide conduz a disfunções e à morte das células, levando, com isto, a danos severos ao tecido ao qual a
25 doença está relacionada (Stefani, M. & Dobson C.M. (2003). *Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution*. J. Mol. Med. 81, 678-699).

Os depósitos amilóides formados pelo polipeptídeo amilóide das ilhotas pancreáticas (IAPP) estão presentes em mais de 95% dos pacientes acometidos
30 pelo diabetes mellitus do tipo II (DMTII), e acredita-se que sua abundância está diretamente correlacionada com a patogênese (Westermarck, P.; Wernstedt, C.; Wilander, E.; Hayden, D.W.; O'Brien, T.D. & Johnson, K.H. (1987). *Amyloid fibrils*

in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islets cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3381-3385; Lorenzo, A.; Razzaboni, B.; Weir, G.C. & Yankner, B.A. (1994). *Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus.* Nature 368, 756-60). Os modelos experimentais de camundongos transgênicos que expressam IAPP humana (h-IAPP) exibem um fenótipo de diabetes que está associado diretamente com a deposição tecidual do h-IAPP em uma forma amilóide (Soeller, W.C.; Janson, J.; Hart, S.E.; Parker, J.C.; Carty, M.D.; Stevenson, R.W.; Kreutter, D.K. & Butler, P.C. (1998). *Islet amyloid-associated diabetes mellitus in obese A(vw)/a mice expressing human IAPP.* Diabetes 47, 743-750). *In vitro*, IAPP exibe uma forte tendência a agregar em fibras amilóides, seguindo uma cinética consistente com um mecanismo dependente de nucleação para a polimerização (Krampert, M.; Bernhagen, J.; Schmucker, J.; Horn, A.; Schmauder, A.; Brunner, H.; Voelter, W. & Kapurniotu, A. (2000). *Amyloidogenicity of recombinant human pro-islet amyloid polypeptide (ProlAPP).* Chem. Biol. 7, 855-871; Padrick, S.B. & Miranker, A.D. (2002). *Islet amyloid: Phase partitioning and secondary nucleations are central to the mechanism of fibrillogenesis.* Biochemistry 9, 4694-703).

O polipeptídeo amilóide das ilhotas pancreáticas (IAPP), ou amilina, é um polipeptídeo composto de 37 (trinta e sete) resíduos de aminoácidos, que apresenta homologia significativa com as seqüências de aminoácidos dos peptídeos relacionados com o gene da calcitonina (CGRPs). Ambos possuem o mesmo número de aminoácidos, além de possuírem uma ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína nas posições 2 (dois) e 7 (sete), e são amidados na extremidade carboxi terminal. A IAPP é sintetizada, processada no complexo de Golgi, armazenada no interior dos grânulos secretores e, finalmente, liberada na circulação juntamente com a insulina pelas células β pancreáticas, em resposta às elevações nos níveis de glicose plasmática (Kapurniotu, A. (2001). *Amyloidogenicity and cytotoxicity of islet amyloid polypeptide.* Biopolymers 60, 438-459). Este polipeptídeo vem sendo considerado como o terceiro hormônio regulador do metabolismo de carboidratos no fígado e músculo esquelético

(Hayden, M.R. & Tyagi, S.C. (2001). "A" for amylin and amyloid in type 2 diabetes mellitus. *J. Pancreas* 2, 129-139).

No homem, o gene que codifica para IAPP está localizado no braço menor do cromossomo 12 (doze), sendo transcrito como um fragmento de aproximadamente 1,5 kb cujo produto é um peptídeo precursor de 89 (oitenta e nove) aminoácidos (Sanke, T.; Bell, G.I.; Sample, C.; Rubenstein, A.H. & Steiner, D.F. (1988). *An Islet Amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing*. *J. Biol. Chem.* 263 (33): 17243-17246; Krampert, M.; Bernhagen, J.; Schmucker, J.; Horn, A.; Schmauder, A.; Brunner, H.; Voelter, W. & Kapurniotu, A. (2000). *Amyloidogenicity of recombinant human pro-islet amyloid polypeptide (ProlAPP)*. *Chem. Biol.* 7, 855-871). Assim como outros peptídeos secretados, IAPP é sintetizada como uma grande molécula precursora, denominada pré-pró-polipeptídeo amilóide pancreático (preproIAPP). Tanto os possíveis papéis fisiológicos destes precursores quanto os mecanismos envolvidos no processamento da preproIAPP e do pró-polipeptídeo (proIAPP) na formação do polipeptídeo pancreático maduro ativo são ainda muito pouco conhecidos (Nishi, M.; Sanke, T.; Seino, S.; Eddy, R.L.; Fan, Y.S.; Byers, M.G.; Shows, J.B.; Bell, G.I. & Steiner, D.F. (1989). *Human islet amyloid polypeptide gene: complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and evolutionary history*. *Mol. Endocrinol.* 3, 1775-17810).

Este polipeptídeo tem sido descrito recentemente como o polipeptídeo mais amiloidogênico conhecido (Kayed, R.; Bernhagen, J.; Greenfield, N.; Al-Abed, Y.; Teichberg, S.; Frank, R.W.; Voelter, W. & Bucala, R. (1999). *Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro*. *J. Mol. Biol.* 287, 781-796). Porém, os determinantes moleculares do processo de agregação da IAPP ainda não foram completamente elucidados, razão pela qual a caracterização detalhada das suas propriedades moleculares e conformacionais, assim como dos mecanismos da formação amilóide, se tornam fundamentais.

Desde sua descoberta em 1987, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos na busca de análogos deste polipeptídeo que possam ser utilizados no tratamento de pacientes acometidos pelo diabetes mellitus tipo I, ou

seja, pacientes que sofrem um processo de destruição auto-imune das células β secretoras de insulina e de IAPP e que, por conseguinte, não apresentam secreção destes hormônios (Bailey, C.J. (2001). *New pharmacologic agents for diabetes*. Curr. Diab. Rep. 1 (2): 119-26). Em 1997, foi desenvolvido por uma

5 companhia farmacêutica (Amylin Pharmaceuticals, San Diego, USA) um primeiro análogo sintético de IAPP, denominado amlintide, para o tratamento de pacientes diabéticos do tipo I. Porém, tal qual o IAPP, este análogo agregava formando material amilóide. Por este motivo, foi desenvolvido um novo análogo com três

10 modificações pontuais de aminoácidos, que passou a ser chamado de pramlitide (USAN council. List No. 392. *New names. Amlintide*. (1997). Clin. Pharmacol. Ther. 61, 500.; Kleppinger, E.L. & Vivian, E.M. (2003). *Pramlintide for the treatment of diabetes mellitus*. Ann Pharmacother. 37 (7-8), 1082-9). Desde

então, este análogo sintético vem sendo comercializado para o uso no controle do diabetes mellitus tipo I e II, em conjunto com a terapia insulinêmica. Os primeiros

15 resultados da utilização de pramlitide em humanos mostraram que a administração deste análogo de IAPP parece ser efetiva em diminuir os níveis de hemoglobina A glicada-c (HbA1c) e em prevenir o ganho de peso, quando comparado somente com a reposição de insulina (Hayden, M.R. & Tyagi, S.C. (2001). "A" for amylin and amyloid in type 2 diabetes mellitus. J. Pancreas 2, 129-

20 139). Outros resultados indicam também que a administração deste análogo de IAPP em combinação com insulina tem se mostrado efetiva no controle dos níveis de glicose pós-prandial, através do decréscimo da ingestão de alimentos, da redução na taxa de esvaziamento gástrico e da supressão da secreção de glucagon (Kleppinger, E.L. & Vivian, E.M. (2003). *Pramlintide for the treatment of*

25 *diabetes mellitus*. Ann Pharmacother. 37 (7-8), 1082-9). Outros análogos da IAPP vêm sendo desenvolvidos e alguns se encontram em fase de testes para comercialização (Baron, A.D.; Kim, D. & Weyer, C. (2002). *Novel peptides under development for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus*. Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord. 2 (1): 63-82). Deve-se ressaltar, ainda,

30 que a reposição hormonal tem sido uma prática cada vez mais utilizada no tratamento de deficiências endócrinas.

Várias são as patentes relacionadas de forma geral com o assunto. Entretanto, nenhuma delas trata da clonagem, expressão e purificação da IAPP humana na forma recombinante. Dentre tais patentes, podem ser citadas as seguintes patentes americanas: 5,116,948, que relata a preparação do polipeptídeo associado às ilhotas (IAPP) através da purificação de amilóides isolados de mamíferos e através da síntese química, assim como a preparação de anticorpos para IAPP; 5,124,314, que relata composições farmacêuticas contendo amilina ou peptídeos relacionados ao gene da calcitonina no tratamento do diabetes mellitus; 5,175,145, que diz respeito ao tratamento do diabetes mellitus com agonistas da amilina; 5,266,561, relacionada com o desenvolvimento de compostos e métodos para bloquear os efeitos da IAPP no desenvolvimento da patogênese do diabetes mellitus tipo II; 5,716,619, relativa à utilização de anticorpos para amilina no tratamento do diabetes mellitus tipo II; e 6,610,824, relacionada com a preparação por síntese química e o uso de análogos do agonista de amilina.

Pelo exposto acima, depreende-se que, até o presente momento, só é possível obter o polipeptídeo amilóide das ilhotas pancreáticas (IAPP), ou amilina, através da síntese química ou através da purificação de placas amilóides purificadas de pâncreas humano *post mortem* ou de insulinomas (tumor de células β).

A síntese química de peptídeos amiloidogênicos é freqüentemente difícil (Nilsson, M.R.; Nguyen, L.L. & Raleigh, D.P. (2001). *Synthesis and purification of amyloidogenic peptides*. Anal. Biochem. 288, 76-82) e a produção da maioria deles, incluindo IAPP, em sua forma recombinante ainda não foi relatada. Um estudo recente desenvolvido por Krampert e colaboradores (Krampert, M.; Bernhagen, J.; Schmucker, J.; Horn, A.; Schmauder, A.; Brunner, H.; Voelter, W. & Kapurniotu, A. (2000). *Amyloidogenicity of recombinant human pro-islet amyloid polypeptide (ProlAPP)*. Chem. Biol. 7, 855-871; Sanke, T.) relatou a expressão recombinante de prolAPP humano ligado a uma cauda de poli-histidina. No entanto, esse produto é significativamente menos amiloidogênico do que IAPP nativo. Um outro estudo recente descreveu a expressão e a purificação de IAPP recombinante fusionado à proteína ligadora de maltose (MBP), porém este

mesmo estudo falhou nas tentativas de expressar IAPP maduro humano intacto (Mazor, Y.; Gilead, S.; Benhar, I. & Gazit, E. (2002). *Identification and characterization of a novel molecular-recognition and self-assembly domain within the islet amyloid polypeptide*. J. Mol. Biol. 322, 1013-1024).

5 A síntese química de peptídeos amiloidogênicos é dificultada pela propensão à agregação. Além disto, o custo da produção de proteínas amiloidogênicas através de síntese química é usualmente alto. A síntese destes peptídeos e proteínas nem sempre pode ser feita de forma totalmente automatizada. Muitas etapas do processo de síntese química são feitas de forma
10 manual, requerendo, com isto, disponibilidade tanto de pessoal treinado quanto de recursos materiais.

Por outro lado, a extração de placas amilóides de pâncreas humanos ou de insulinomas é bastante dificultada por entraves éticos, por dificuldades técnicas em se obter o tumor, além de ser de rendimento baixo e com um grau de
15 pureza nem sempre satisfatório.

Assim, o desenvolvimento de métodos eficientes, de baixo custo e bom rendimento, para a produção destes peptídeos e proteínas amiloidogênicas, em forma recombinante representa um grande avanço no campo da biotecnologia. Em particular, a possibilidade de obtenção de IAPP com mutações pontuais de
20 resíduos relevantes no processo de agregação desta proteína permitirá um sem-número de investigações em se tratando dos aspectos moleculares do processo de agregação.

Além disso, a produção de IAPP recombinante permitirá também o desenvolvimento de análogos recombinantes de IAPP, que poderão ser utilizados
25 na reposição deste hormônio em pacientes diabéticos dos tipos I e II que fazem uso regular da terapia insulinêmica.

De forma inédita no estado da arte, a presente invenção descreve a clonagem, expressão e a purificação de IAPP madura humana sob a forma recombinante, utilizando, para isto, um sistema de expressão heteróloga em
30 bactéria *Escherichia coli* baseado no promotor LacI-T7 RNA polimerase.

As propriedades amiloidogênicas e o potencial citotóxico de IAPP recombinante humana (rh-IAPP) foram caracterizados usando uma variedade de

métodos bioquímicos e biofísicos, incluindo espalhamento de luz em ângulo reto, medidas de fluorescência de tioflavina T, microscopia eletrônica de transmissão e ensaios de citotoxicidade utilizando culturas de ilhotas pancreáticas humanas. Além da aplicação para IAPP, os métodos descritos na presente invenção
5 podem, ainda, ser úteis na expressão e purificação de outras proteínas ou peptídeos amiloidogênicos de difícil obtenção através de síntese química.

Descrição da Invenção

10 Para efeito de ilustração, o método de clonagem e expressão, bem como o método de purificação objetos do presente pedido serão descritos utilizando-se os exemplos e figuras a seguir.

Clonagem de IAPP humana madura – Um fragmento de DNA de 151-pb que contém a seqüência que codifica o peptídeo maduro de IAPP foi amplificado
15 por transcrição reversa e reação em cadeia da DNA polimerase (RT-PCR), conforme a figura 1, a partir de 5 μ g de RNA total derivado de ilhotas pancreáticas humanas purificadas na Unidade de Ilhotas Humanas (UIPI) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O RNA total foi purificado, após o processo de lise celular, com tiocianato de guanidina e β -mercaptoetanol,
20 seguido de ultracentrifugação em colchão de cloreto de céσιο (Chirgwin, J.M.; Przybyla, A.E.; Mc Donald, R.J. & Rutter, W.J. (1979). *Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease*. *Biochemistry* 18, 5294-9). A transcrição reversa foi realizada com SuperScript II (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante, utilizando olinucleotídeos iniciadores
25 (“primers”) de oligo dT. A amplificação do fragmento de interesse foi realizada através da reação de PCR utilizando a enzima Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen), seguindo o programa que contém uma etapa desnaturante de 95 °C por 1 minuto, seguida por 35 ciclos de incubação a 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos e um passo final de extensão de 5
30 minutos a 68 °C. Os iniciadores de transcrição nos sentidos senso (IAPP-F) e antisenso (IAPP-R), que correspondem aos terminais 5' e 3' da seqüência que codifica para o polipeptídeo maduro humano de IAPP (IAPP-F: 5'-AGA TCT GGG

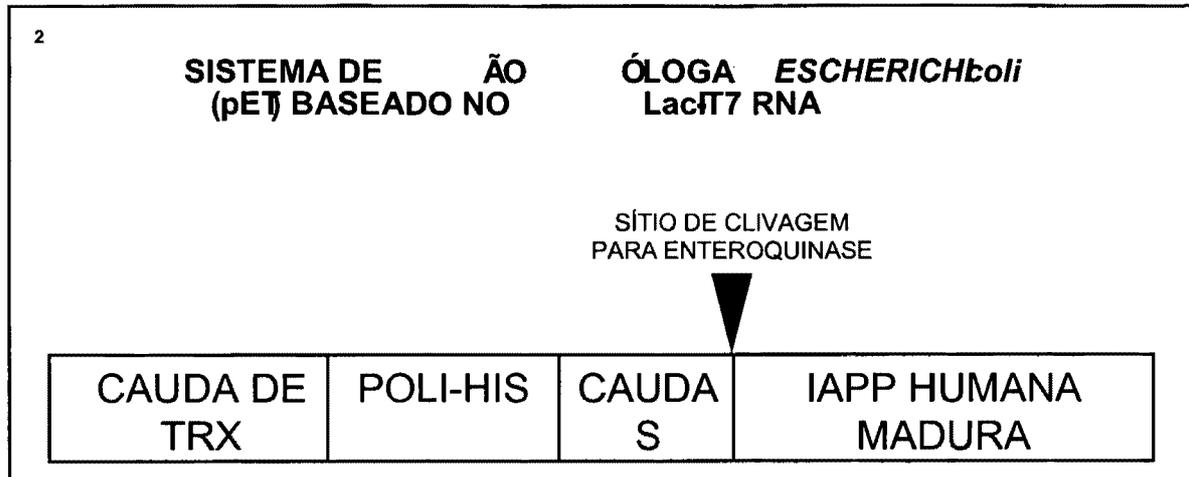


Figura 2

5 Expressão em bactéria e purificação – O plasmídeo de pET32a-IAPP contendo a proteína de fusão de IAPP foi usado para a transformação de células BL21(DE3)pLysS competentes através de eletroporação. Estas células foram crescidas a 37 °C em um bioreator em 1 litro de meio Super Broth (20 g de triptona, 12 g de extrato de levedura, 5 ml de NaOH, 5 g de NaCl) contendo

10 ampicilina (150 µg por ml). Quando a densidade óptica (D.O.) em 600 nm alcançou 0.6 (~ 1.7 x 10⁸ células/ml), foi adicionado isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM. Após 6 horas da indução a 37 °C, o meio foi centrifugado a 5.000 x g a 4 °C por 30 minutos e o precipitado foi resuspendido em 500 ml de tampão contendo 20 mM Tris-HCl, 500

15 mM NaCl, 1 mM imidazol, pH 7.4. As células foram então lisadas em um sonicador (Vibracell 72412; Bioblock, Illkirch, France) a 20 kHz, usando uma sonda de 19 mm, através de 10 pulsos de 1 minuto no gelo, com intervalos de 2 minutos entre os pulsos. O material foi mantido no gelo durante toda a etapa de lise. A suspensão foi centrifugada a 18.000 x g a 4 °C por 40 minutos para

20 separar os corpos de inclusão que contêm IAPP. O precipitado foi resuspendido em 250 ml do mesmo tampão contendo 6 M de uréia e incubado durante a noite a 4 °C para a solubilização dos corpos de inclusão. Para remover todo o material insolúvel restante, a amostra foi centrifugada a 39.000 x g a 4 °C por 20 minutos.

O sobrenadante clarificado foi coletado, filtrado através de uma membrana com poros de 0,45 μm e foi usado para a purificação de IAPP em uma coluna de cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados, usando o ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) acoplado a agarose e carregado com níquel (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), em presença de 6 M de uréia.

A coluna de Ni-NTA (de 1 ml de capacidade) foi lavada com três volumes do tampão descrito acima, na ausência de uréia, seguido por três lavagens com o mesmo tampão contendo 6 M de uréia, usando um fluxo de 1 ml por min. A coluna foi, então, carregada com o sobrenadante filtrado contendo IAPP humana recombinante (rh-IAPP), utilizando um fluxo de 0.25 ml por min. Após o carregamento, a coluna foi lavada com 3 volumes do tampão de lavagem (20 mM de Tris-HCl, 500 mM de NaCl, 5 mM de imidazol, pH 7.4) contendo 6 M de uréia. A uréia foi removida lentamente, utilizando um gradiente descontínuo de 6 a 0 M de uréia, no mesmo tampão de lavagem. A rh-IAPP foi clivada com enteroquinase dentro da coluna para remover as caudas de poli-histidina e tioredoxina. Para tanto, uma unidade internacional (U.I.) de Ek foi introduzida na coluna em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl e 10 mM de CaCl_2 , pH 8,0, e a reação de clivagem foi realizada por 18 horas a 25 °C. A rh-IAPP purificada foi eluída em uma solução de 50 % (V/V) de 2-2-2-trifluoroetanol (TFE) diluído no tampão de clivagem. A concentração das frações puras de rh-IAPP foi determinada através da medida de absorvância a 280 nm, considerando para o cálculo um coeficiente de extinção molar de 1,330 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Sistemas de eletroforese – A análise das frações obtidas em várias etapas do processo de expressão e purificação foi realizada usando o protocolo de eletroforese em gel em presença de duodecil-sulfato de sódio poliacrilamida (SDS-PAGE) (Shapiro, A.L.; Vinuela, E. & Maizel, J.V. Jr. (1967). *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 28 (5): 815-20.) ou o de eletroforese com tricina (Schägger, H. & Jagow, G.V. (1987). *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal. Biochem. 166, 368-379). As bandas de proteínas foram

visualizadas através da marcação com o corante Coomassie Brilliant Blue R-250 ou com prata.

A descrição acima da presente invenção foi apresentada com o propósito de ilustração e descrição. Além disso, a descrição não tenciona limitar a invenção à forma aqui revelada. Em consequência, variações e modificações compatíveis com os ensinamentos acima, e a habilidade ou conhecimento da técnica relevante, estão dentro do escopo da presente invenção. É a intenção que a presente invenção inclua todas as modificações e variações da mesma, dentro do escopo descrito no relatório e nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para clonagem e expressão do polipeptídeo amilóide das ilhotas pancreáticas humanas (IAPP) caracterizado por ser na forma recombinante e utilizar um sistema de expressão heteróloga em bactéria *Escherichia coli* baseado no promotor LacI-T7 RNA polimerase, no qual um fragmento de DNA que contém a seqüência que codifica para o peptídeo maduro de IAPP é amplificado por transcrição reversa e reação em cadeia da DNA polimerase (RT-PCR) a partir de RNA total derivado de ilhotas pancreáticas humanas.
2. Método de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato do fragmento de DNA ser preferencialmente de 151-pb e amplificado a partir de 5 µg de RNA total derivado de ilhotas pancreáticas humanas.
3. Método de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato da amplificação por reação de PCR ser executada utilizando uma enzima através de uma etapa de desnaturação seguida por ciclos de incubação e extensão.
4. Método de acordo com o reivindicado em 3, caracterizado pelo fato da enzima ser preferencialmente Platinum Taq High Fidelity.
5. Método de acordo com o reivindicado em 3, caracterizado pelo fato da etapa desnaturante ser preferencialmente efetuada a 95 °C e por 1 minuto.
6. Método de acordo com o reivindicado em 3, caracterizado pelo fato de se efetuar preferencialmente 35 ciclos de incubação a 95 °C e por 30 segundos.
7. Método de acordo com o reivindicado em 3, caracterizado pelo fato de se efetuar preferencialmente 35 ciclos de incubação a 55 °C e por 30 segundos.
8. Método de acordo com o reivindicado em 3, caracterizado pelo fato de se efetuar preferencialmente 35 ciclos de incubação a 68 °C e por 30 segundos.
9. Método de acordo com o reivindicado em 3, caracterizado pelo fato de se efetuar uma etapa de extensão preferencialmente de 5 minutos e a 68 °C.
10. Método de acordo com reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de os iniciadores de transcrição nos sentidos senso (IAPP-F) e antiseno (IAPP-R), que correspondem aos terminais 5' e 3' da seqüência que codifica o polipeptídeo maduro humano de IAPP (IAPP-F: 5'-AGA TCT GGG TAC CGA CGA CGA CGA CAA GAA ATG CAA CAC TGC CAC AT-3'; IAPP-R: 5'-GTC GAC TCA ATA TGT

ATT GGA TCC CAC GTT GGT AG-3'), serem desenhados para conter os sítios de restrição *Bgl*III e *Sal*I para uma clonagem direcional obedecendo à fase de leitura e um códon de terminação inserido após o último resíduo.

5 11. Método de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de ser inserido um sítio de clivagem para enteroquinase (Ek) no oligonucleotídeo IAPP-F antes do primeiro resíduo de aminoácido de IAPP.

12. Método de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato do produto resultante da reação de PCR ser digerido e ligado ao vetor de expressão previamente digerido com enzimas e defosforilado.

10 13. Método de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato do sítio de clivagem para Ek ser removido do vetor e substituído pelo inserto gerado por PCR.

14. Método de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato da IAPP ser expressa como uma proteína de fusão preferencialmente ligada a uma cauda de poli-histidina, um domínio de tioredoxina e um fragmento de RNase A (HT-TRX-S), sendo o produto ligado eletroporado em *E. coli* DH10B competente.

15 15. Método de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato do clone recombinante (pET32a-IAPP) ser isolado e caracterizado através de digestão com enzimas de restrição e o produto ser seqüenciado através de sequenciamento automatizado.

16. Método de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato do plasmídeo de pET32a-IAPP contendo a proteína de fusão de IAPP ser usado para a transformação de células BL21(DE3)pLysS competentes através de eletroporação.

25 17. Método de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato do crescimento das células ocorrer em um meio contendo preferencialmente 20 g de triptona, 12 g de extrato de levedura, 5 ml de NaOH, 5 g de NaCl e 150 µg por ml de ampicilina.

18. Método de acordo com o reivindicado em 17, caracterizado pelo fato do crescimento das células ocorrer preferencialmente a 37° C.

30 19. Método de purificação de polipeptídeo amilóide das ilhotas pancreáticas humanas (IAPP) caracterizado pelo fato de compreender as etapas

de lise das células, centrifugação da suspensão e resuspensão do sedimento em presença de agente desnaturante, centrifugação da solução, remoção do material insolúvel, coleta e filtração do sobrenadante clarificado, ligação da proteína à coluna de afinidade contendo íons metálicos imobilizados, clivagem com protease e eluição da rh-IAPP em forma purificada.

20. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato de se adicionar isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo (IPTG) preferencialmente a uma concentração final de 1 mM quando a cultura de bactérias apresentar densidade óptica (D.O.) em 600 nm de 0.6.

21. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato de se efetuar a centrifugação do meio preferencialmente a 5.000 g, a 4 °C e por 30 minutos.

22. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato de se efetuar a resuspensão do precipitado preferencialmente em 500 ml de tampão contendo 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl e 1 mM imidazol, em pH 7.4.

23. Método de acordo com o reivindicado em 22, caracterizado pelo fato de se efetuar lise celular preferencialmente após 6 horas da indução e a 37 °C.

24. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato de se efetuar a lise das células preferencialmente através de 10 pulsos de 1 minuto no gelo, com intervalos de 2 minutos entre os pulsos.

25. Método de acordo com o reivindicado em 24, caracterizado pelo fato do material ser preferencialmente mantido no gelo durante a etapa de lise.

26. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato de se efetuar a centrifugação da suspensão preferencialmente a 18.000 g, a 4 °C e por 40 minutos.

27. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato de se efetuar a resuspensão do precipitado preferencialmente em 250 ml de tampão contendo 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl e 1 mM imidazol, contendo 6 M de uréia e incubado a 4 °C.

28. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato de se efetuar a remoção do material insolúvel por centrifugação da amostra preferencialmente a 39.000 g, a 4 °C e por 20 minutos.

29. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato se efetuar a coleta e filtração do sobrenadante clarificado preferencialmente através de uma membrana com poros de $0,45 \mu\text{m}$, sendo este material remanescente usado para a purificação de IAPP em uma coluna de cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados, usando o ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) acoplado a agarose e carregado com níquel, em presença de 6 M de uréia.

30. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato de se efetuar a clivagem da rh-IAPP com enteroquinase (Ek) através da introdução na coluna de preferencialmente uma unidade internacional de Ek em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl e 10 mM de CaCl_2 em pH 8,0.

31. Método de acordo com o reivindicado em 30, caracterizado pelo fato da clivagem ser preferencialmente realizada por 18 horas e a 25°C .

32. Método de acordo com o reivindicado em 19, caracterizado pelo fato de se efetuar a eluição da rh-IAPP purificada preferencialmente em uma solução de 50 % (V/V) de 2-2-2-trifluoroetanol (TFE) diluído no tampão de clivagem.

33. Iniciadores de transcrição nos sentidos senso (IAPP-F: 5'-AGA TCT GGG TAC CGA CGA CGA CGA CAA GAA ATG CAA CAC TGC CAC AT-3') e antisense (IAPP-R: 5'-GTC GAC TCA ATA TGT ATT GGA TCC CAC GTT GGT AG-3') caracterizados pelo fato de serem desenhados para conter os sítios de restrição *BglII* e *Sall* para uma clonagem direcional obedecendo a fase de leitura e um códon de terminação inserido após o último resíduo.

RESUMO

Patente de Invenção: MÉTODO PARA CLONAGEM, EXPRESSÃO E
PURIFICAÇÃO DO POLIPEPTÍDEO AMILÓIDE DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS
5 HUMANAS.

Método para clonagem e expressão do polipeptídeo das ilhotas
pancreáticas (IAPP) maduro humano sob a forma recombinante, utilizando um
sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli* baseado no promotor LacI-
10 T7 RNA polimerase, no qual um fragmento de DNA que contém a seqüência que
codifica o peptídeo maduro de IAPP é amplificado por transcrição reversa e
reação em cadeia da DNA polimerase (RT-PCR) a partir de RNA total derivado de
ilhotas pancreáticas humanas, clonado em vetor de expressão como descrito
15 acima e expresso em bactérias, e método de purificação empregando-se as
etapas de lise das células, centrifugação do meio e resuspensão do precipitado
em presença de agente desnaturante, centrifugação da solução, remoção do
material insolúvel, coleta e filtração do sobrenadante clarificado, ligação da
proteína a coluna de afinidade contendo íons metálicos imobilizados, clivagem
com protease e eluição da rh-IAPP em forma purificada.