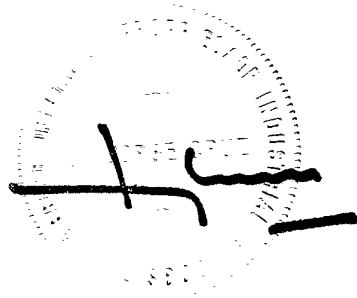


91849



SANDFI

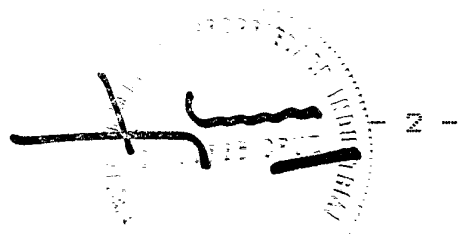
"PROCESSO DE DOSAGEM DE POLIÓSIDOS ANIÓNICOS SULFATADOS, E
RECIPIENTE PARA O ARRANQUE DESTES PROCESSOS"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

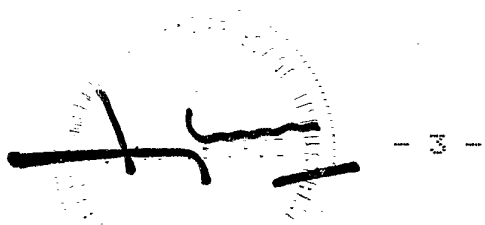
O presente invento diz respeito a um processo de dosagem de poliósidos aniônicos sulfatados fortemente aniônicos num líquido, que se caracteriza por se basear na dosagem, graças a um conjugado aniônico revelador, dos sítios catiónicos que ficam livres sobre uma superfície recoberta de um policatião. Refere-se ainda a um recipiente para o arranque deste processo.



O invento refere-se a um novo processo de dosagem de poliósidos aniónicos sulfatados, utilizando no princípio de dosagem a estrutura química destes compostos e não as suas actividades biológicas. O invento refere-se igualmente a um estojo pronto para ser empregue para o arranque deste processo.

Os poliósidos aniónicos sulfatados, tais como os glicosaminoglicanos e nomeadamente a heparina, cuja actividade anticoagulante é bem conhecida, são doseados segundo métodos baseados sobre as suas actividades biológicas, em particular a sua actividade sobre diversos factores da coagulação. É assim que se doseia a heparina pela sua actividade sobre o factor X activado ou o factor II activado, ou ainda segundo métodos mais globais baseados sobre o tempo de coagulação, tais como o tempo de Céphaline Kaolin ou TCK ou ainda o método descrito na Farmacopeia Francesa.

Ora os recentes trabalhos sobre a heparina têm mostrado que se tratava de um produto muito heterogéneo, tanto no que diz respeito ao comprimento das suas cadeias como à sua taxa de carga, e que era possível fraccioná-las e fragmentá-las tendo em vista aprontar produtos de actividade mais específica. Tem-se podido igualmente pôr em evidência que a heparina, para além das suas actividades bem conhecidas sobre a coagulação, intervinha como regulador em diversos sistemas biológicos e que alguns fragmentos desprovidos de actividade sobre a coagulação conservavam no entanto a sua actividade reguladora. Tornava-se portanto necessário aprontar um novo método de dosagem que permitisse avaliar a quantidade de produto contido num líquido, e em particular nos meios biológicos, sem ter de recorrer a uma actividade biológica.



Dawes, Pepper et al. (Thromb. Haemost., 1985, 54 (3), 630-634) propuseram uma técnica que consiste num deslocamento da heparina radioactiva, retida numa coluna do tipo Agarose-policatiónico, pelo poliósido aniónico sulfatado a testar. Este método é baseado no princípio geral do deslocamento dum produto marcado dos seus locais de ligações, pelo seu equivalente não marcado. Os métodos que apelam a este princípio apresentam o inconveniente de necessitar da manipulação de rádio-elementos que por sua vez são dispendiosos e implicam precauções no seu emprego.

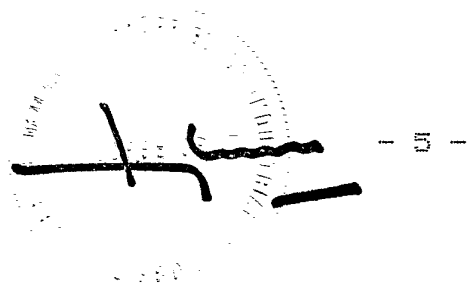
O invento propõe-se remediar estes inconvenientes e propõe um novo processo que permite a dosagem quantitativa de poliósidos sulfatados contidos num líquido, nomeadamente num meio biológico, em particular no plasma. Esta dosagem é baseada no carácter aniónico forte deste tipo de produtos e permite a dosagem de qualquer poliósido sulfatado, qualquer que seja a sua estrutura ou o seu tipo de actividade, sob a condição de que tenha uma quantidade de cargas aniónicas total de pelo menos duas, de preferência pelo menos três, por unidade dissacarídica. Produtos deste tipo são representados pela heparina e suas fracções, fragmentos e derivados, pelo pentosano polissulfato, dextrano sulfato e alguns heparanos sulfatos; em compensação, o ácido hialurónico, o dermatano sulfato, os condroitinos sulfatos e os heparanos fracamente sulfatados, não podem ser doseados por este processo.

O novo processo do invento é baseado na dosagem, graças a um conjugado aniónico revelador, dos sítios catiónicos que ficam livres sobre uma superfície recoberta de um policatiónico, depois de esta ter sido posta em contacto com o líquido que contém o poliósido aniónico sulfatado a dosear, sendo o conjugado revelador escolhido de tal maneira que a sua densidade de carga lhe permite fixar-se sobre os sítios que ficam vagos sobre o

policatição que recobre a superfície, sem todavia deslocar o poliósido a dosear que aí se encontrava previamente fixado, e sendo a quantidade do produto a dosear determinada por referência a uma curva de escalonamento estabelecida simultaneamente sobre a mesma placa.

Este processo pode ser vantajosamente posto em prática segundo as etapas sucessivas seguintes:

- (a) põe-se em contacto uma quantidade determinada do líquido que contém o produto a dosear com uma superfície recoberta por um produto catiónico;
- (b) põe-se em contacto o conjunto assim obtido com um excesso de um conjugado aniónico revelador, escolhido de tal maneira que a sua densidade de carga lhe permite fixar-se sobre os sítios que ficam vagos sobre o produto catiónico da etapa (a) sem todavia deslocar o poliósido que aí se encontra previamente fixado;
- (c) elimina-se o excesso do conjugado revelador que não se fixou por ligação iónica com o excesso do produto catiónico da etapa (a);
- (d) doseia-se, por um método apropriado, função do conjugado revelador escolhido, a quantidade que convém do conjugado revelador que se fixou por ligação iónica no decurso da etapa (b);
- (e) determina-se a quantidade total do produto a dosear que se encontra na amostra referindo a quantidade do conjugado revelador definido segundo o método apropriado da etapa (d) a uma curva de escalonamento estabelecida simultaneamente sobre a própria placa, segundo o mesmo método, com as quantidades dadas do produto que se quer dosear.



O resultado é lido sobre uma curva de escalonamento que indica directamente a quantidade de poliéido aniónico sulfatado por mililitro de meio biológico.

Segundo o processo do invento, o policatiço utilizado é um polímero básico escolhido no grupo constituído pelo sulfato de protamina, polibreno, ou um poliaminoácido tal como a poliargini-na ou a poli-L-lisina. Utiliza-se de preferência uma poli-L-lisi-na cujo peso molecular médio se situa entre 6000 e 9000 Dalton. Este policatiço apresenta com efeito a vantagem de dar uma muito boa reprodutibilidade nas dosagens.

De uma maneira vantajosa, o conjugado aniónico revela-dor é constituído por um glicosaminoglicano ligado de maneira covalente a um polipeptídeo, de preferência uma enzima. Poderia igualmente estar ligado a uma molécula orgânica que contém núcleos aromáticos susceptíveis de serem marcados, por exemplo com iodo ou com fósforo, por exemplo tirosina marcada com iodo 125.

No seguimento do texto, nós utilizaremos a abreviatura GAG para o glicosaminoglicano e o termo GAG-P para qualquer glicosaminoglicano-polipeptídeo, sendo cada conjugado designado pelo glicosaminoglicano GAG e pelo polipeptídeo P respeitantes, por exemplo GAG-enzima, GAG-peroxidase, GAG-fosfatase, GAG-albu-mina, Heparina-P, Heparina-enzima, Heparina-peroxidase, Heparina-fosfatase, Oligossacarídeo-CHO-peroxidase (OS-CHO-peroxidase) e assim por diante.

O GAG utilizado para a preparação do conjugado deve ser suficientemente aniónico para se ir fixar nos sítios deixados vagos, mas não deve ser mais aniónico que o produto a dosar, do qual tomaria então o lugar. A escolha do GAG a utilizar para a

preparação do conjugado efectua-se então em função da densidade de carga do poliéido aniónico sulfatado que se quer dosear.

O GAG utilizado para a preparação do conjugado revelador GAG-P pode ser qualquer GAG ou uma das suas fracções ou fragmentos. O GAG utilizado é de preferência a heparina ou um dos seus fragmentos. Estes têm, com efeito, a capacidade de se fixar, pelas suas cargas aniónicas, aos sítios deixados vagos sobre o policatiónio depois que o produto a testar tenha sido posto em contacto com este último. Uma mistura de GAG particularmente apropriada para a preparação do GAG-P é representada por uma mistura de fragmentos de heparina constituída por cadeias que possuem essencialmente de 4 até 10 unidades dissacarídicas.

De uma maneira vantajosa, utiliza-se como polipeptídeo para a preparação do conjugado revelador GAG-P, uma enzima; esta é escolhida de entre as que são facilmente preparáveis e estáveis e que podem ser doseadas facilmente, por exemplo por acção de um substrato e libertação de um produto colorido que se doseia por densidade óptica; a peroxidase de rabanete e a fosfatase são exemplos de tais produtos.

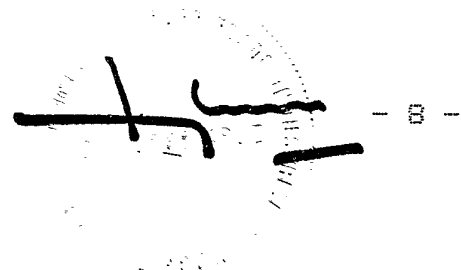
Num modo particularmente vantajoso do invento, o conjugado GAG-enzima é diluído com um outro conjugado GAG-P, de preferência com um GAG-albumina, sendo o GAG idêntico para os dois conjugados. Com efeito, a precisão da dosagem é inversamente proporcional à actividade específica do GAG-enzima e, se esta última for demasiado importante, é difícil definir condições operatórias que dêem uma precisão satisfatória. Portanto recorreu-se de preferência, para se poder dosear com uma precisão da ordem do µg/ml, a uma mistura de conjugados, sendo a actividade específica final da mistura estabelecida de maneira a ter uma boa precisão de dosagem nas condições operatórias.

De preferência, a mistura GAG-enzima e GAG-albumina tem uma actividade enzimática que se situa nas nossas condições operatórias entre 1 u.DO e 2 u.DO, sendo a actividade específica mais favorável de 1,5 u.DO.

De maneira vantajosa, pôde-se constatar que o conjugado formado de um GAG representado por um fragmento de heparina preparado por despolimerização com ácido nitroso e possuindo um peso molecular médio de 2.000 Dalton, nomeadamente o produto designado OS 4-10-CHO cuja preparação é descrita no parágrafo "PREPARAÇÃO I a)" situado mais abaixo, por um lado, e a título de enzima a peroxidase de rabanete, constituia um revelador de escolha para dosear nos meios biológicos diferentes poliósidos sulfatados, tais como a heparina e seus fragmentos como os vendidos sob o nome de Fraxiparina (R) (Choisy, França), Fragmin (R) (Kabi, Suécia), Lovenox (R) (Pharmuka, França), ou ainda tal como o pentosano polissulfato vendido sob a denominação de Hémoclar (R) (Midy, França), ou o dextrano sulfato e seus derivados, ou ainda os dextransos solúveis funcionalizados descritos no Pedido de Patente EP-146.455, ou os GAG hipersulfatados descritos no Pedido de Patente EP-214.879.

Num modo particularmente vantajoso do invento no decurso da etapa (a) o policatión é absorvido nas cavidades de uma placa de microtitulação, em meio básico, por incubação durante 24 a 72 horas, de preferência 48 horas a uma temperatura que se situa entre 0 e +20°C, de preferência +4°C.

De maneira vantajosa, o conjugado aniónico revelador da etapa (b) é constituído por um poliósido aniónico ligado de maneira covalente a um produto escolhido no grupo constituído por uma enzima e uma molécula orgânica que contém núcleos aromáticos susceptíveis de serem marcados com iodo ou fósforo. De



preferência, utiliza-se uma enzima que evite a utilização de produtos marcados.

Num outro modo vantajoso do invento, no decurso da etapa (b) a mistura é incubada pelo menos 2 horas a uma temperatura que se situe entre 0 °C e +20 °C, de preferência +4 °C.

Segundo um modo preferido do invento, o conjugado aniónico revelador da etapa (b) é constituído por um poliósido aniónico, nomeadamente um GAG, ligado de maneira covalente a uma enzima e no decurso da etapa (b) utiliza-se um método de dosagem enzimática, sendo a enzima do conjugado revelador doseável por exemplo por acção sobre um substrato e a libertação de um produto colorido que se doseia por densidade óptica.

As diferentes lavagens são efectuadas com a ajuda de soluto cloretado isotónico (NaCl 9 P. 1000).

De uma maneira vantajosa, o meio básico utilizado para se fazer a solução do policatíção é um tampão tris-fosfato ou um tampão bicarbonato a um pH compreendido entre 9 e 10; utiliza-se de preferência um tampão bicarbonato com uma força iónica compreendida entre 0,05 M e 0,2 M, em particular 0,1 M, pH 9,6. O policatíção é posto em solução no meio básico com a concentração de 100µg/ml e deposita-se em cada cavidade 250 µg desta solução que se deixa incubar durante 48 horas.

A dosagem será tanto mais sensível quanto a concentração em policatíção for mais fraca, mas a gama de resposta será tanto mais larga quanto a concentração for mais elevada, sendo a sensibilidade inversamente proporcional à concentração em policatíção. De uma maneira vantajosa, utiliza-se uma concentração de 100µg/ml como acima é indicado para dosear um GAG presente no

plasma a uma concentração compreendida entre 0,1 e 0,5 µg/ml. Os resultados obtidos são particularmente satisfatórios nas condições indicadas acima quando o poliósido aniónico sulfatado a dosear é um fragmento regular de heparina, quer dizer um fragmento constituído por dissacarídeos trissulfatados, e cujo peso molecular médio se situa entre 5.000 e 6.000 Dalton.

De maneira vantajosa, para a realização do processo do invento, deposita-se em cada cavidade, depois de lavagem para eliminação do policatíção residual, 200 µl do líquido que contém o polianião sulfatado a dosear, sendo a este último, assim como ao líquido utilizado para a realização da curva de escalonamento, adicionado um inibidor de protease que por sua vez permite respeitar o policatíção e, quando o líquido é um meio biológico, em particular plasma, impedir a formação de trombina e portanto de um coágulo que perturbaria a dosagem. Utiliza-se de preferência como inibidor de protease a benzamidina que se adiciona com uma concentração que se situa entre 0,0025 M e 0,1 M, de preferência 0,0125 M, e deixa-se a incubação efectuar-se durante pelo menos 2 horas entre 0° e +20°C, de preferência +4°C.

Vantajosamente, quando a mistura de conjugados reveladores utiliza como enzima a peroxidase, a mistura comporta quantidades de GAG-enzima e de GAG-albumina expressas em equivalente de produto puro da ordem de 3,4 µg/ml de peroxidase e 7,7 µg/ml de albumina. Nestas condições utilizam-se de preferência 200 µl por cavidade de mistura reveladora.

Num modo de realização vantajoso do processo do invento, quando o conjugado revelador é um GAG-peroxidase, o substrato utilizado para revelar a quantidade de enzima fixada nas cavidades é constituído por uma mistura de ortofenileno diamina e de peróxido de hidrogénio. Utiliza-se por exemplo para cada cavidade

100 μ l de uma mistura que contém 0,5 mg de ortofenileno diamina em um ml de tampão citrato de sódio, HCl 0,1 M, pH 3,5 e 0,5 μ l de peróxido de hidrogénio. Nestas condições, deixa-se incubar durante cerca de 10 minutos à temperatura ambiente (cerca de 20 a 25 °C) e em seguida pára-se a reacção por adição de ácido sulfúrico 1N, vantajosamente 100 μ l por cavidade.

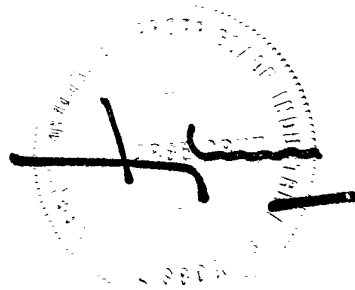
Num modo particularmente vantajoso do invento, quando o conjugado revelador é um GAG-peroxidase e o substrato de dosagem é o ortofenileno diamina adicionado de peróxido de hidrogénio, a leitura da densidade óptica efectua-se a 492 nm, seja directamente no fundo da cavidade, seja por transferência para uma cuba de espectrofotómetro.

Obtém-se a curva de escalonamento da figura 1 que dá em ordenada a adsorção a 492 nm e em abcissa o inverso da concentração em μ g/ml. A leitura da densidade óptica da amostra a dosear permite, referindo-se à curva de escalonamento, deduzir a concentração do produto a dosear num ml do meio biológico.

Num outro modo de realização, o conjugado revelador é um GAG-fosfatase e o substrato de dosagem o 4-nitrofenilfosfato, efectuando-se a leitura da densidade óptica a 405 nm.

O invento refere igualmente um estojo destinado à realização do processo segundo o invento. Este estojo contém:

- Placa de microtitulação,
- Policatição,
- Conjugado revelador constituído por um polianião ligado de maneira covalente a um revelador escolhido do grupo constituído por uma enzima e uma molécula orgânica susceptível de ser marcada,



- Substrato de dosagem escolhido em função do conjugado revelador.

Num aspecto particular do invento o estojo contém:

- Placa de microtitulação,
- Policatíção escolhido no grupo constituído por sulfato de protamina, polibreno, poliarginina e poli-L-lisina,
- GAG-enzima liofilizado,
- Substrato da enzima escolhida, gerador de um corante.

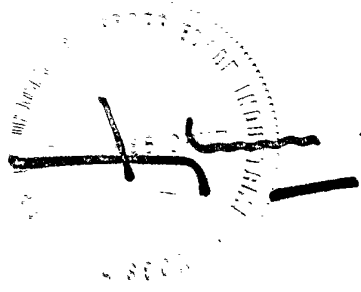
Num modo particularmente vantajoso do invento o estojo comporta:

- Placa de microtitulação,
- Policatíção,
- GAG-enzima liofilizado, sendo a enzima escolhida no grupo constituído pela peroxidase de rabanete e a fosfatase,
- GAG-albumina liofilizado,
- Substrato da enzima escolhida, gerador de um corante.

Num outro modo particular do invento o estojo comporta um múltiplo de cada um dos elementos seguintes:

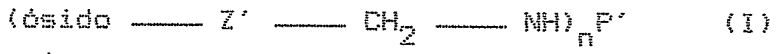
- Placa de microtitulação : 1,
- Poli-L-lisina : 25 ml a 100 µg/ml,
- GAG-peroxidase de rabanete liofilizado : 68 µg,
- GAG-albumina : 54 µg,
- Ortófenileno diamina : 10 ml (5 mg).

De preferência o estojo segundo o presente invento é acompanhado por um método de utilização como abaixo é definido.



Num outro modo vantajoso do invento, as placas de microtitulação são recobertas de policatión e prontas a serem empregues.

Os conjugados GAG-P, nomeadamente GAG-enzima e GAG-albumina, pertencem à família dos N-poliósidos-polipeptídeos da seguinte fórmula I:



na qual:

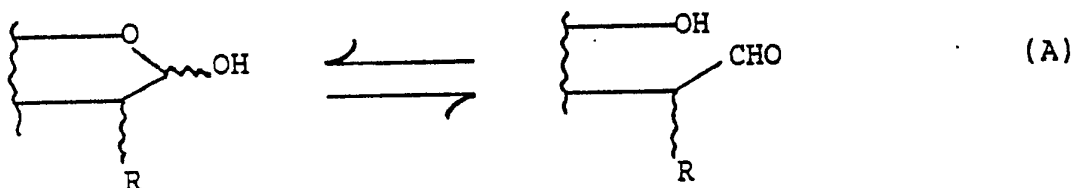
- P' é o radical n-valente de um polipeptídeo P ligado aos grupos NH que provêm de n grupos amino livres presentes na origem na molécula de P;
- Z' é a unidade sacarídica terminal redutora do polissacariídeo ósido-Z na sua forma aldeídica, quer natural, quer proveniente da despolimerização nitrosa, privada do grupo aldeídico de 3;
- ósido é o resto do polissacariídeo ósido-Z';
- n é um número inteiro de 3 a 30;

ou, se tal suceder, um dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

é com efeito possível efectuar um enxerto da cadeia poliosídica sobre a cadeia peptídica num ponto único da dita cadeia poliosídica recorrendo a um grupo aldeídico único presente ou gerado na extremidade da cadeia poliosídica.

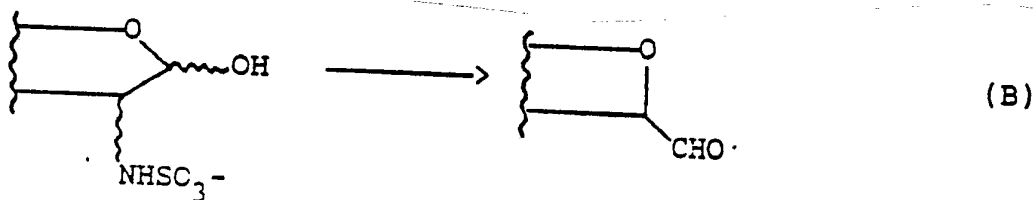
É bem conhecido que os açúcares em geral e os polissacariídeos em particular são caracterizados por uma estrutura

hemiacetálica (cíclica ou fechada) em equilíbrio com a estrutura aldeídica correspondente (linear ou aberta) segundo o Esquema (A)



sendo R por exemplo um hidroxilo ou um grupo amino livre ou sulfatado, sendo o dito equilíbrio, nos açúcares naturais, quase totalmente deslocado para a esquerda.

Por outro lado é conhecido que certos métodos de despolimerização de polissacarídeos, nomeadamente a despolimerização por ação do ácido nitroso, em seguida designada por "despolimerização nitrosa", conduzem à transformação das unidades osídicas. Assim, por exemplo, as unidades glicosídicas da heparina são transformadas, pela despolimerização nitrosa, em unidades 2,5-anidromanosídicas segundo o Esquema (B)



apresentando a dita unidade 2,5-anidromanosídica um grupo aldeídico.

A técnica de despolimerização nitrosa permitiu preparar heparinas de baixo peso molecular tendo na extremidade da maioria das espécies o agrupamento 2,5-anidromanose, portanto um grupo aldeídico.

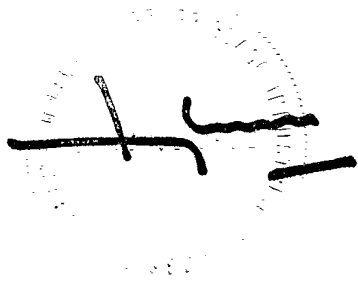
Encontrou-se agora que fazendo reagir um polissacarídeo com um polipeptídeo, a forma aldeídica do dito polissacarídeo reagiu com aminas livres do dito polipeptídeo para dar uma polibase de Schiff. Esta reacção comporta o deslocamento do equilíbrio do Esquema (A) acima para a direita e a formação da polibase de Schiff.

Encontrou-se também que a mesma reacção tem lugar com polissacarídeos obtidos por despolimerização nitrosa segundo o Esquema (B) acima, e que a polibase de Schiff se forma rapidamente com rendimentos satisfatórios.

Além disso, como os poliósidos não têm senão uma única extremidade redutora, o acoplamento não pode ter lugar senão ao nível desta extremidade e a estrutura terciária do polipeptídeo é assim conservada.

Ulteriormente, verificou-se que fazendo reagir o polissacarídeo com o polipeptídeo na presença de um agente redutor, se obtém directamente o conjugado polissacarídeo/polipeptídeo sem isolar a polibase de Schiff intermediária, com rendimentos muito bons.

Na presente descrição, o polipeptídeo, designado por "P", é esquematicamente representado pela fórmula II seguinte:



na qual P° é o radical m-valente do polipeptideo P ao qual estão ligados os seus grupos funcionais NH₂ livres, sendo os ditos m grupos funcionais NH₂ o grupo amino terminal e os (m-1) grupos amino em posição épsilon das lisinas contidas no polipeptideo.

Na fórmula (II) de cima, m representa a totalidade dos grupos amino disponíveis para a formação das polibases de Schiff, mas o acoplamento não tem lugar senão sobre um certo número, designado por "n", destes grupos amino; o radical n-valente ligado aos grupos amino que reagiram com o grupo aldeidico de Z é de aqui em diante designado por P'.

Está entendido que, na presente descrição, o conceito alargado de "valência" se refere às ligações livres dos radicais ou das estruturas a que respeitam. Assim, o radical P' m-valente ou n-valente é o residuo do polipeptideo P com as suas m ou n ligações livres tal com acima ilustradas e as estruturas bivalentes Ia", Ib", Ic" e Id" abaixo explicam-se por si só.

Na presente descrição, o polissacarideo é esquematicamente representado pela fórmula



sendo Z a unidade sacaridica terminal redutora do dito polissacarideo na sua forma aldeidica seja natural seja proveniente duma despolimerização nitrosa e sendo ósido o resto da cadeia do dito polissacarideo.

O radical monovalente ósido-Z' - representa o polissacarídeo ósido-Z tal como foi acima definido, privado do grupo aldeídico de Z.

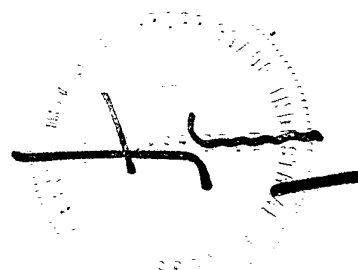
Mais particularmente, na fórmula (I) ósido- representa o radical dum polissacarídeo ósido-Z (III), chamado igualmente "poliósido", proveniente de substâncias naturais biocompatíveis, sem resíduos aglicones, sendo o dito poliósido privado de uma unidade sacarídica terminal redutora (Z).

O termo "biocompatível" tal como utilizado na presente memória descritiva designa a propriedade de polissacarídeos naturais, tendo um peso molecular de preferência inferior a 100.000, nomeadamente compreendido entre 1.200 e 50.000, e dos seus derivados ou análogos cujos constituintes se encontram naturalmente no organismo dos mamíferos e que, por isso, podem ser facilmente metabolizados e eliminados.

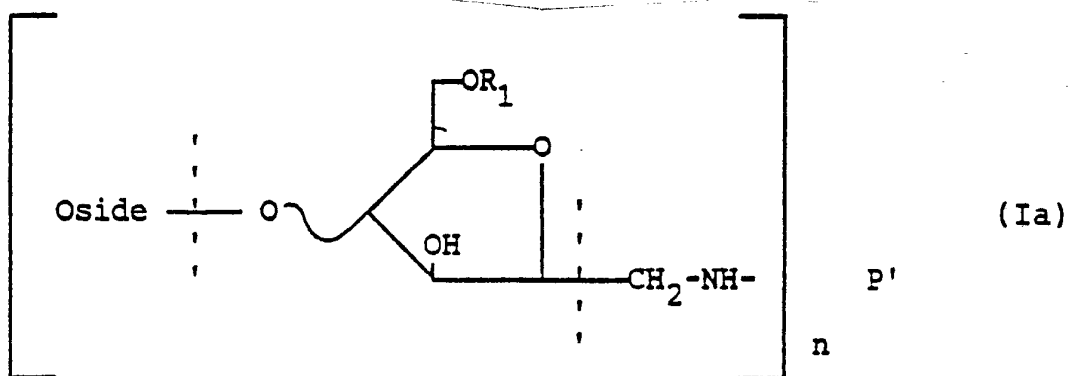
De maneira vantajosa, o poliósido proveniente de substâncias naturais biocompatíveis é um glicosaminoglicano tal como foi definido por R. W. Jeanloz, Arthritis and Rheumatism, 1960, 3, 233-237 e por Casu, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 1985, 43, 51-134.

De maneira preferencial, na fórmula (I) acima, ósido representa o radical de um glicosaminoglicano ósido-Z escolhido de entre a heparina, fragmentos de heparina, condroitina sulfato 4-6, condroitina sulfato 6-6, heparano sulfato e dermatano sulfato, privado da unidade terminal redutora Z.

Num aspecto particular e vantajoso do invento, o N-poliosil-polipeptídeo provém de um glicosaminoglicano do tipo heparínico ósido-Z cujo motivo Z representa o motivo terminal

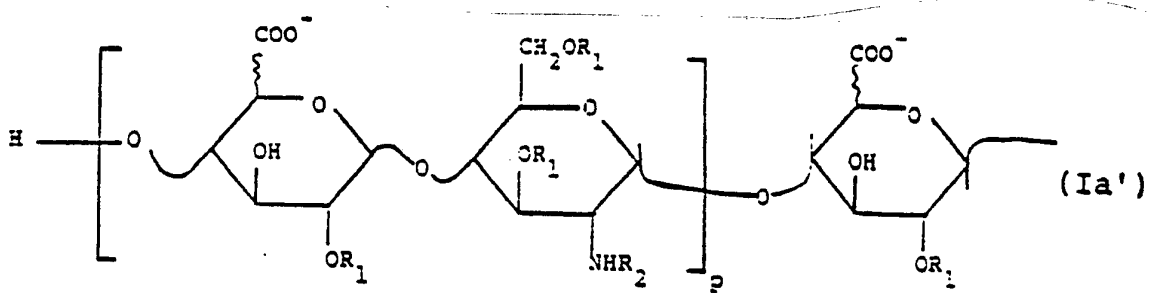
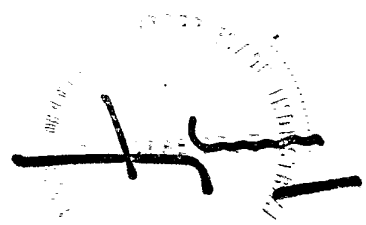


reductor de uma cadeia redutora tendo sofrido uma despolimerização nitrosa. É representado pela fórmula (Ia) seguinte:



que corresponde à fórmula (I), sendo o agrupamento entre as linhas a tracejado o radical Z' e sendo R₁ H ou SO₃⁻.

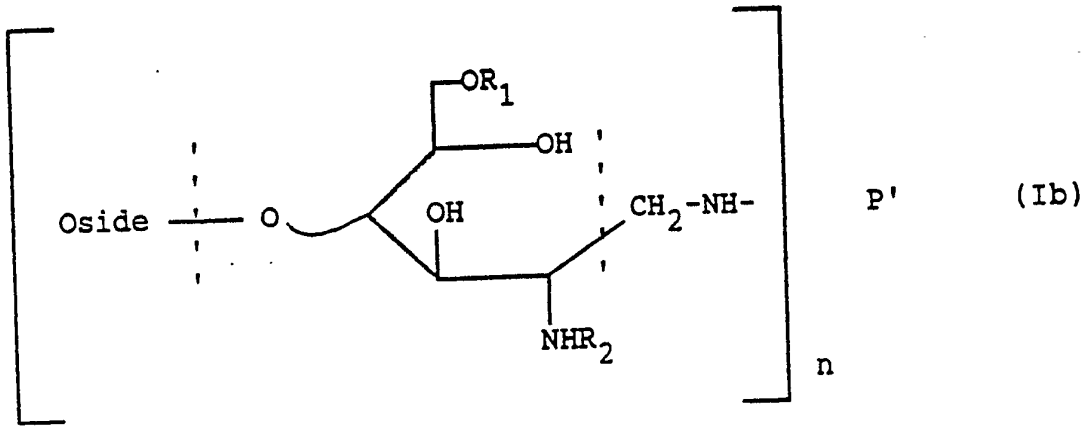
Na fórmula (Ia) acima, ósido designa, segundo um aspecto preferencial do presente invento, o radical proveniente de uma heparina, representado pela fórmula



na qual R_1 representa hidrogénio ou um grupo SO_3^- , R_2 representa um grupo acetilo ou um grupo SO_3^- e p varia de 4 até 24.

é entendido que o valor de p , no radical (Ia'), é tal que representa o número de unidades dissacarídicas de fragmentos de heparina proveniente de uma despolimerização nitrosa da heparina natural, nas misturas que têm vantajosamente uma massa molecular média que se situa entre 2000 e 6500 Dalton, de preferência cerca de 2000 a 2500 Dalton.

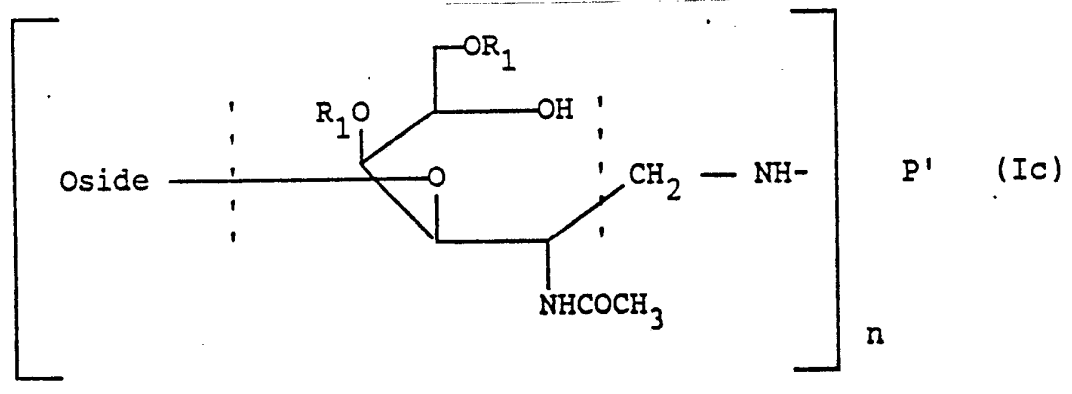
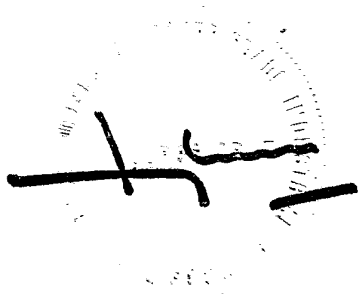
Num outro aspecto particular do invento, o N-poliosil-polipeptideo provém de um polissacarídeo ósido-Z cujo motivo Z representa o motivo terminal redutor natural de um glicosaminoglicano de tipo heparínico. É representado pela fórmula (Ib) seguinte:



que corresponde à fórmula (I), sendo o agrupamento entre as linhas a tracejado o radical Z' e sendo R₁ H ou SO₃⁻, sendo R₂ H, SO₃⁻ ou acetilo e sendo ósido o resto da cadeia heparínica.

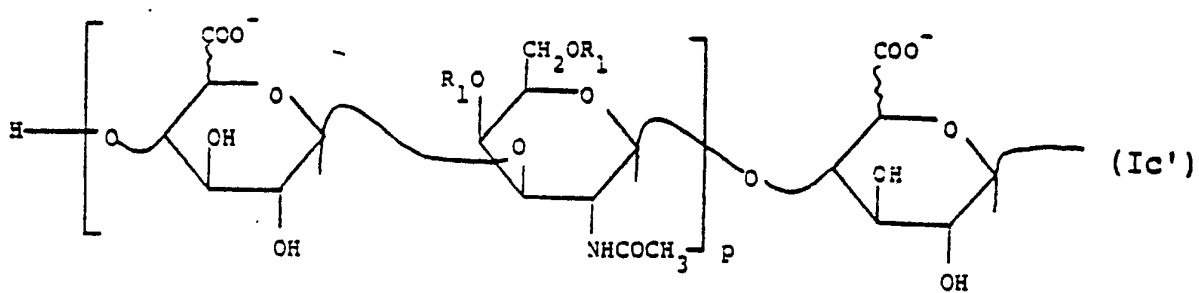
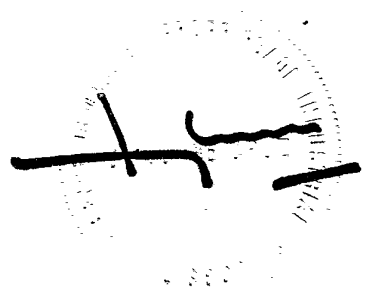
Na fórmula (Ib) acima, R₂ representa de preferência SO₃⁻ ou acetilo e ósido representa de preferência o radical (Ia'), no qual p varia de 10 até 100, sendo o valor de p tal que representa o número de unidades dissacarídicas que formam as misturas de cadeias na heparina natural.

Num outro aspecto particular do invento, o N-poliosil-polipeptídeo que provém de um polissacarídeo ósido-Z cujo motivo Z representa o motivo terminal redutor natural de um glicosaminoglicano de tipo condroitina ou dermatano sulfato. é representado pela fórmula (Ic) seguinte:



que corresponde à fórmula (I), sendo o agrupamento entre as linhas a tracejado o radical Z', sendo um dos R₁ H e o outro SO₃⁻ e sendo Osido o resto da cadeia da condroitina sulfato ou do dermatano sulfato.

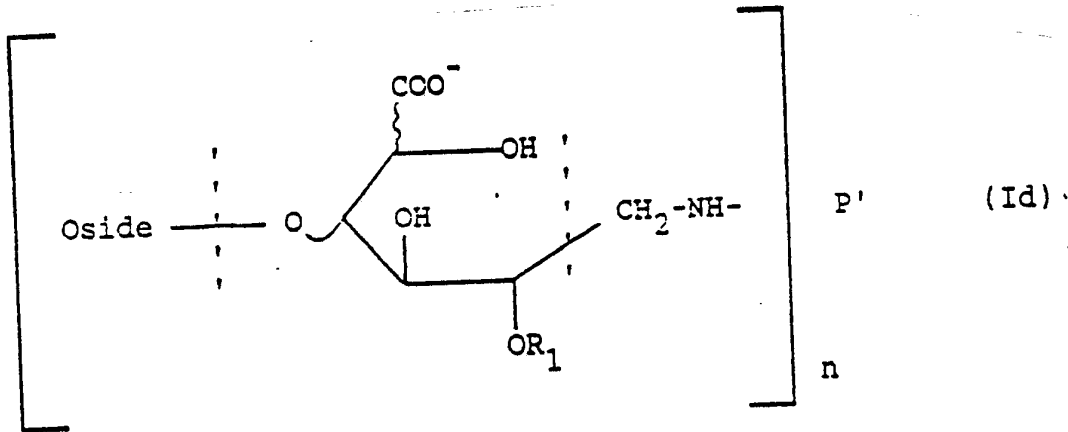
Na fórmula (Ic) acima, o radical Osido é representado pela fórmula (Ic')



onde um dos R_1 representa hidrogénio e o outro um grupo SO_3^- e p varia de 10 até 100, sendo o valor de p tal que representa o número de unidades dissacarídicas que formam as misturas de cadeias presentes na condroitina sulfato ou no dermatano sulfato.

Num outro aspecto particular do invento, o N-poliosil-polipeptideo que provém de um polissacarídeo ósido-Z que sofreu uma despolimerização em condições tais que a cadeia possui um número de motivos ímpares de que o motivo Z redutor representa um ácido urónico, ácido D-glucurónico ou L-idurónico. é então representado pela fórmula (Id) seguinte:

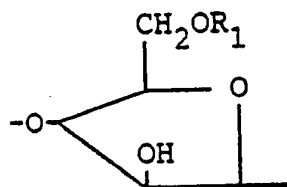
- 22 -



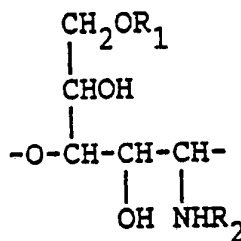
que corresponde à fórmula (I), sendo o agrupamento entre as linhas a tracejado o radical Z', sendo R₁ H ou SO₃⁻, e sendo ósido o resto da cadeia polissacarídica.

O presente invento compreende igualmente compostos de fórmulas (Ia) e (Ib) acima, nas quais ósido representa o resto de fragmentos de heparina homogêneos em relação à sua massa molecular (fórmula Ia', p = 1-10) e que eventualmente contém o sítio de fixação à antitrombina III. Ele compreende por outro lado compostos de fórmula Ib acima, na qual ósido representa o resto de um oligossacarídeo de síntese (fórmula Ia', p = 1-6).

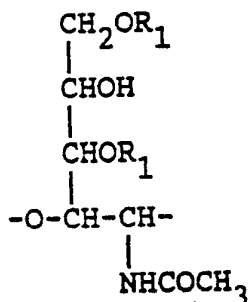
Nas fórmulas (Ia), (Ib), (Ic) e (Id) acima, o radical Z' pode ser melhor representado pelas estruturas bivalentes respectivas seguintes:



(Ia'')

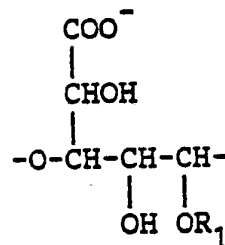


(Ib'')



(Ic'')

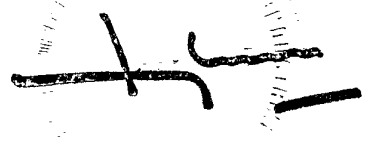
et



(Id'')

nas quais R_1 e R_2 são tais como foram acima definidos acima e a estereocconfiguração é a da unidade terminal redutora Z.

Na fórmula I acima, P' é vantajosamente o radical n-valente duma proteína enzimática, em particular uma enzima capaz de agir sobre um substrato libertando um produto colorido, podendo este último ser doseado por densidade óptica. A peroxidase de rabanete e a fosfatase são exemplos de tais enzimas. Têm sido obtidos resultados muito satisfatórios e reprodutíveis com a peroxidase de rabanete.



De uma maneira vantajosa, o N-poliosil-polipeptideo utilizado a titulo de GAG-enzima para a realizaco do presente invento corresponde  fórmula (Ia) acima, na qual P'  o resíduo de uma molécula de peroxidase de rebanete e n  igual a 3.

Para preparar o conjugado GAG-enzima útil para a realizaco do presente invento, procede-se por enxerto covalente dos motivos aminas livres da enzima P sobre as cadeias do GAG não comportando cada uma senão um único agrupamento aldeidico susceptível de reagir com um motivo amina.

Mais particularmente, o processo para a preparaco de uma GAG_enzima de fórmula (I) acima  caracterizado por se tratar a enzima P representada pela fórmula

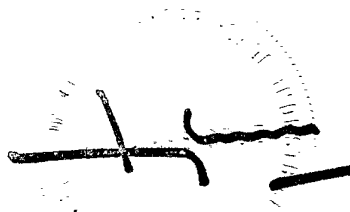


na qual P^o  o radical m-valente da enzima P  qual estão ligados os seus m grupos funcionais NH₂ livres, sendo os ditos m grupos funcionais NH₂ o grupo amino terminal e os grupos amino em posicão psilon das (m-1) lisinas contidas na enzima, com um excesso de um GAG representado pela fórmula III seguinte:



sendo Z a unidade sacarídica terminal redutora do dito GAG na sua forma aldeidica quer natural, quer proveniente de uma despolimerizaco nitrosa e sendo sido o resto da cadeia do dito polissacarídeo e se submeter a polibase de Schiff assim obtida de fórmula





na qual o radical monovalente ósido-Z'-- representa o polissacariídeo ósido-Z tal como acima foi definido, privado do grupo aldeídico de Z, e P' e n são como acima foram definidos, a uma redução com um cianoboro-hidreto.

De maneira vantajosa, os poliósidos naturais biocompatíveis ósido-Z utilizados como produtos de partida III são glicosaminoglicanos tal como acima foram definidos (GAGs), nomeadamente substâncias constituídas por cadeias nas quais alternam ácidos urónicos (ácido D-glucurérico ou ácido L-idurénico) e açúcares aminados, podendo estes últimos ser glucosaminas quando se trata de glicosaminoglicanos de tipo heparínico, ou galactosaminas quando se trata de glicosaminoglicanos de tipo condroitina sulfato, a saber a condroitina sulfato 4-S, a condroitina sulfato 6-S e o dermatano sulfato, podendo os agrupamentos carboxílicos dos motivos osídicos dos ditos GAGs ser salificados ou esterificados, sendo os grupos hidroxilos diversamente substituídos por agrupamentos funcionais, de preferência grupos sulfatos, e sendo os agrupamentos aminados substituídos quer por grupos sulfato, quer por grupos acetilo.

Tais GAGs são constituídos por uma mistura de cadeias heterogêneas em relação aos seus pesos moleculares, podendo estes últimos variar desde 1.800 até 50.000 Dalton, e em relação à posição e número dos seus agrupamentos funcionais.

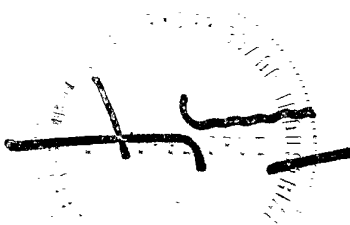
De preferência, o poliósido de partida III é um glicosaminoglicano escolhido de entre heparina, fragmentos de heparina, condroitina sulfato 4-S, condroitina sulfato 6-S, heparano sulfato e dermatano sulfato.

Os compostos de partida III particularmente preferidos são glicosaminoglicanos do tipo heparínico, quer dizer

heparina, heparano sulfato e seus derivados obtidos quer por fraccionamento a partir da heparina ou do heparano sulfato, quer por hemissíntese ou síntese. Tais poliósidos têm sido largamente descritos na literatura. Pode tratar-se de produtos naturais obtidos por fraccionamento ou por síntese, tais como os descritos nas patentes francesas 2 440 376 e 2 461 719 ou nas EP 84 999 e 113 599; pode tratar-se igualmente de produtos obtidos por despolimerização tais como os descritos nas patentes europeias 37 319, 40 144 e 181 252. Num aspecto particularmente preferido do invento, utilizam-se misturas de fragmentos de heparina obtidos por despolimerização nitrosa tendo uma massa molecular inferior a 10.000 Dalton, em particular os que têm uma massa molecular média que se situa entre 2.000 e 2.500 Dalton. Vantajosamente podem-se igualmente utilizar fragmentos de heparina homogêneos em relação à sua massa molecular ou oligossacarídeos obtidos por síntese que são homogêneos tanto no que respeita à sua massa molecular como à posição e número dos seus grupos funcionais. No seguimento do texto, a mistura de cadeias heparínicas obtidas por despolimerização nitrosa e que têm um peso molecular médio de 2.000 Dalton, preparada como se descreve na PREPARAÇÃO I a) abaixo, será designada pela referência "DS 4-10-CHO".

Um outro produto de partida vantajoso ósido-Z é a mistura de fragmentos de heparina obtida por despolimerização nitrosa e descrita na EP-37 319; é designada por "CY 222-CHO".

Podem-se igualmente escolher como poliósidos derivados da heparina desprovidos de sítio de fixação à antitrombina III (AT III), quer as cadeias de heparinas tenham sido fraccionadas de maneira a eliminar as cadeias oligossacarídicas que comportam o sítio de fixação à AT III recorrendo por exemplo a uma cromatografia de afinidade sobre resina Sépharose-AT III ou a cromatografias de permuta iónica, como está descrito em E. Sache et al.,



Thromb. Res., 1982, 25, 443-458, quer estes sítios tenham sido destruídos por exemplo por despolimerização com ácido periódico e beta-eliminação exaustiva. Lembrar-se-á aqui que a antitrombina III ou AT III é um inibidor plasmático da coagulação, activa sobre diferentes proteases plasmáticas e cuja actividade é fortemente acrescida pela heparina que age como co-factor.

De uma maneira vantajosa, o acoplamento entre um dos motivos aminados da enzima F e da cadeia do GAG ósido-Z efectua-se ao nível do motivo terminal da cadeia ósido-Z, tendo ou não esta última sofrido uma operação prévia de fragmentação por despolimerização.

Quando se utiliza, como produto de partida, um GAG ósido-Z cujo motivo terminal Z é um grupo 2,5-anidromanósico obtido por despolimerização nitrosa segundo o Esquema (B) acima, é preferível que a reacção de acoplamento seja efectuada sobre o dito ósido-Z imediatamente a seguir à sua preparação, para evitar que o grupo aldeídico, notoriamente pouco estável, perca a sua reactividade.

Na medida em que se deseja obter uma cadeia poliosídica de tipo heparínico desprovida de sítio de fixação à antitrombina III, é vantajoso utilizar como produto de partida um GAG que tenha sofrido uma despolimerização com ácido periódico, seguida de uma beta-eliminação exaustiva, permitindo este processo cortar preferencialmente a cadeia heparínica entre os carbonos em posições 2 e 3 de todos os ácidos urónicos não sulfatados tal como o GAG descrito por Casu et al., *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, 1986, 36 (1), nº 4, 637-646. Ora, é sabido que um tal motivo está presente no sítio de fixação da heparina à antitrombina III.

A quantidade de cadeias poliosídicas a pôr em acção deve estar em grande excesso em relação às cadeias peptídicas numa proporção de 100 a 2000 moles de ósido-Z para 1 mole da substância peptídica P. Este excesso é vantajosamente de 500 a 1500 moles de ósido-Z para uma mole da substância peptídica P. De preferência, quando se põe em acção peroxidase de rabanete, utilizam-se 1000 a 1500 moles de ósido-Z para 1 mole de peroxidase.

O meio reaccional é um meio aquoso que deve estar desprovido de aminas primárias ou secundárias susceptíveis de interferir com a reacção de acoplamento entre o ósido-Z e o peptídeo P. De uma maneira vantajosa, o meio aquoso é um tampão susceptível de ser ajustado ao pH apropriado por adição de um ácido mineral ou de um hidróxido alcalino. Eventualmente, pode ser adicionado um solvente orgânico miscível com a água tal como o etanol, a acetona, a dimetilformamida.

Num modo preferido do invento, utiliza-se um tampão fosfato 0,05 M adicionado de cloreto de sódio. Junta-se, se necessário, polissorbato 80 (derivados de sorbitano monooleato ou tween), por exemplo à razão de 1 p. 10.000, permitindo este agente tensioactivo evitar a absorção da substância peptídica P sobre as superfícies.

O pH do meio reaccional é escolhido de maneira a que a amina esteja sob forma protonada, pode variar de 6 a 9, todavia vantajosamente é de 7 a 8, de preferência vizinho da neutralidade.

A temperatura de reacção pode variar em função da substância peptídica utilizada, situando-se vantajosamente entre +2°C e +35°C, prosseguindo a reacção durante 2 a 15 dias. De

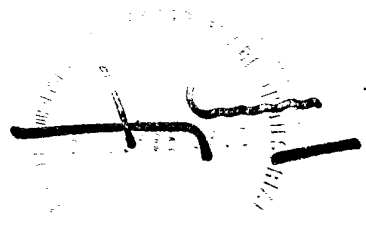
preferência, opera-se a baixa temperatura, por exemplo a +4°C, sobretudo quando a substância peptídica é uma enzima, sendo um grande número destas últimas termolábeis, que é em particular o caso das enzimas trombolíticas. É preciso todavia notar que quanto mais baixa é a temperatura tanto mais lenta é a cinética da reacção. A duração da reacção é portanto variável conforme a temperatura escolhida. De maneira vantajosa, deixa-se efectuar a reacção sob agitação a +4°C durante 2 a 8 dias se o poliósido a utilizar possuir um agrupamento aldeídico proveniente de uma despolimerização nitrosa. Em particular quando a substância peptídica em utilização é uma enzima trombolítica tal como a uroquinase, a pré-uroquinase ou o activador tecidual do plasminogénico, ou ainda quando se trata de uma enzima tal como a peroxidase ou a fosfatase susceptível de ser doseada facilmente por acção sobre um substrato, a manutenção da reacção a +4°C durante 3 a 5 dias permite obter um rendimento de enxerto satisfatório.

A polibase de Schiff de fórmula (IV) assim obtida pode ser isolada segundo as técnicas conhecidas, por exemplo por precipitação com um sal apropriado, tal como o sulfato de amónio, e submetida a uma redução com um cianoboro-hidreto, tal como o cianoboro-hidreto de sódio.

A redução pode igualmente ser feita directamente no meio reaccional, sem isolar a polibase de Schiff.

É igualmente possível passar directamente aos compostos I por reacção do polipeptídeo P com o poliósido ósido-Z em presença de cianoboro-hidreto de sódio nas condições acima.

Desta maneira, a polibase de Schiff intermediária é reduzida à medida que ela se forma e o produto I é isolado enquanto único produto final.



Para separar o conjugado assim obtido dos produtos que não reagiram, pode-se operar por precipitação, podendo esta operação efectuar-se por exemplo em meio de sulfato de amónio que se adiciona ao meio reaccional em quantidade suficiente para saturar a solução, quer dizer à razão de cerca de 600 mg/ml. Deixa-se em seguida decantar e centrifuga-se.

Esta operação pode ser repetida depois de renovação do precipitado e adicionando de novo a este sulfato de amónio nas mesmas condições.

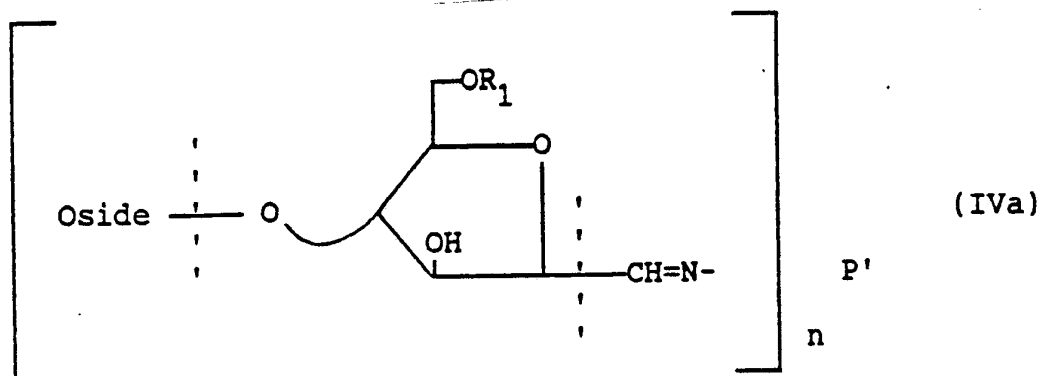
Para recuperar o N-poliosil-polipeptideo sob a forma pura, efectua-se uma permeação em gel com a ajuda de um gel escolhido em função da natureza e da dimensão do polipeptideo. A filtração em gel efectua-se de maneira vantajosa sobre uma coluna que contém um gel de tipo ultragel, por exemplo o vendido pela Société IBF (França) sob o nome de Ultragel (R) AcA 44 ou o vendido por Pharmacia sob o nome de Sephacryl (R) S 200.

Num modo de realização vantajoso, dissolve-se o precipitado obtido na etapa precedente num tampão apropriado à substância peptídica P posta em acção, deposita-se em seguida a solução sobre a coluna que foi previamente equilibrada com a ajuda do mesmo tampão. A filtração em gel é seguida por meio de um espectrofotómetro de 280 nm e o pico de proteína é recuperado. Ele contém a totalidade do produto, de que se efectua em seguida a caracterização e a dosagem.

As polibases de Schiff de fórmula (IV) acima são produtos novos que representam os intermediários chave na preparação dos N-poliosil-polipeptideos de fórmula (I). Elas constituem portanto um aspecto ulterior do presente invento.

De maneira preferencial, na fórmula (IV) acima, ósido representa o radical de um glicosaminoglicano ósido-Z escolhido de entre a heparina, fragmentos de heparina, condroitina sulfato 4-6, condroitina sulfato 6-6, heparano sulfato e dermatano sulfato, privado da unidade terminal redutora Z.

Particularmente vantajosas são as polibases de Schiff provenientes de um polissacarídeo ósido-Z cujo motivo Z representa o motivo terminal redutor de uma cadeia de glicosaminoglicano heparínico que sofreu uma despolimerização nitrosa. Ela é representada pela fórmula (IVa) seguinte:



que corresponde à fórmula (IV), sendo o agrupamento entre as linhas a tracejado o radical Z' e sendo R₁ H ou SO₃⁻.

De uma maneira vantajosa, a polibase de Schiff do invento corresponde à fórmula (IVa) acima, na qual P' é uma molécula de peroxidase em particular a peroxidase de rabanete ou a fosfatase, e n é igual ou inferior a 6, de preferência 3.

A polibase de Schiff (IVa) acima é transformada no N-poliosil-polipeptídeo correspondente (Ia) por redução com o cianoboro-hidreto de sódio.

O invento não se limita aos aspectos particulares acima descritos, pelo contrário ele engloba todas as variantes; ele será melhor compreendido com a ajuda dos exemplos de aplicação que se vão seguir.

PREPARAÇÃO I

Preparação do conjugado GAG-enzima segundo a fórmula (I), na qual P é a peroxidase de rabanete e Z-ósido é o OS 4-10-CHO

A peroxidase de rabanete pode ser comprada no comércio. Trata-se, por exemplo da peroxidase vendida por SERVA, França. No exemplo que se vai seguir, utilizou-se a peroxidase SERVA Lote 18077, cuja actividade é de 1,126 u/mg.

a) Geração da terminação aldeídica por despolimerização da heparina:

O fragmento de heparina foi preparado da seguinte maneira:

500 g de heparina injectável, sob a forma de sal de sódio, são dissolvidos em 4500 ml de água desmineralizada, a uma temperatura de 18°C.

A relação YW/USP da heparina utilizada é vizinha de 1, apresentando estes títulos um valor da ordem de 160-170.

A solução obtida é posta sob agitação enérgica, e o seu pH é diminuído até 2,5 por adição de ácido clorídrico concentrado. Juntam-se então 15 g de nitrito de sódio dissolvidos em 300 ml de água. O pH da reacção é ajustado a 2,5 pelo ácido clorídrico concentrado e o volume total da

solução é levado até 5000ml. Deixa-se a reacção efectuar-se durante 45 minutos depois verifica-se a ausência de iões nitrosos residuais na solução reaccional, por exemplo por meio de papel indicador impregnado de iodeto de potássio amidado (desenvolvimento de uma coloração azul-violácea na presença de iões NO_2^-).

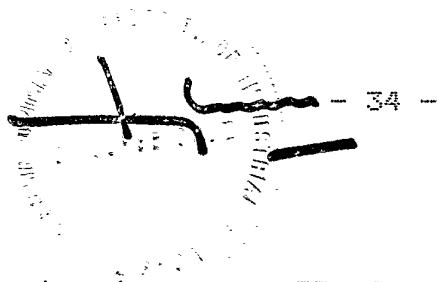
Deixa-se a reacção prosseguir até ao desaparecimento total dos iões nitrosos na ausência de reacção ao papel iodoaminado, efectuando-se controlos todos os 3 ou 4 minutos.

Quando estes controlos se tornam negativos, a reacção é considerada como tendo acabado.

Os produtos da reacção são recuperados por adição de 10 litros de etanol. Depois de 48 horas em repouso, o produto é decantado e elimina-se o sobrenadante.

O precipitado é redissolvido em 9 litros de água desmineralizada. Junta-se 100 g de cloreto de sódio e baixa-se o pH da solução até 3,8 com a ajuda de ácido clorídrico concentrado. O volume é ajustado exactamente a 10 litros com a ajuda de água desmineralizada, e junta-se sob agitação enérgica 10 litros de etanol. Deixa-se repousar 48 horas. Sifona-se o sobrenadante e leva-se o seu pH até 7,00 por meio de hidróxido de sódio 5 N. Junta-se 19 litros de etanol. Deixa-se repousar 48 horas. Sifona-se o sobrenadante para o separar. O precipitado é recuperado, lavado com etanol, moído e seco sob vazio.

Obtém-se assim 120 g de mistura de oligossacarídeos não reduzidos que constitui o produto OS 4-10-CHO.



b) Acoplamento da peroxidase de rabanete com o OS 4-10-CHO:

12,5 mg de peroxidase de rabanete em pó são dissolvidos em 3 ml de tampão fosfato 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7. Junta-se 25 mg de cianoboro-hidreto de sódio em 1 ml do mesmo tampão e 805 mg de OS 4-10-CHO em 1 ml do mesmo tampão. Ajusta-se o pH para 7 com soda 2 N e deixa-se reagir sob agitação durante 5 dias à temperatura de +4°C. Verifica-se uma ligeira opalescência.

c) Eliminação do precipitado:

Centrifuga-se a 15.000 rpm durante 10 minutos, à temperatura de +4°C, e em seguida efectua-se uma filtração sobre filtro Millipore 0,2 micron.

d) Filtração em gel:

O produto recuperado na etapa precedente é depositado numa coluna Ultrogel (R) AcA 44 (IBF, França) de dimensão 2,6 x 100 cm. A operação é seguida por espectrofotómetro de 280 nm e recupera-se o pico de proteína.

e) Caracterização do produto:

Estuda-se a taxa de acoplamento do produto doseando-se as proteínas pelo método de Bleu de Coomassie (S. M. Read e D. H. Northcote, Ann. Biochem., 1981, 116, 53-64) e o CY 216-CHO pelo método do carbazol (dosagem dos ácidos urónicos, R. Bitter e H. Muir, Ann. Biochem., 1962, 4, 330-334).

Os resultados são calculados para um PM médio de 2.000 Dalton no que diz respeito ao OS 4-10-CHO e 40.000 Dalton no que diz respeito à peroxidase.

Os resultados são os seguintes:

Proteínas : 1,028 mg/ml, i.e. para 7 ml: 7,196 mg (0,18 µM)
OS 4-10-CHO: 0,152 mg/ml, i.e. para 7 ml: 1,064 mg (0,552µM)
Actividade : 1,420 u/ml, i.e. para 7 ml: 9.940 u
Rendimento : 70,6 %.

Obtêm-se 3 moles de OS 4-10-CHO para 1 mole de peroxidase.

PREPARAÇÃO II

Preparação do GAG-enzima segundo a fórmula (I), na qual F é a albumina e Z-ósido é o OS 4-10-CHO

- a) Geração da terminação aldeídica por despolimerização da heparina:
Procede-se como se descreveu atrás no parágrafo PREPARAÇÃO I a).
- b) Acoplamento da albumina com o OS 4-10-CHO:
0,1 ml de albumina bovina em solução a 30 mg são postos em solução em 2,0 ml de tampão fosfato 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7. Juntam-se 60 mg de cianoboro-hidreto de sódio em 1 ml do mesmo tampão e 800 mg de OS 4-10-CHO em 1 ml do mesmo tampão. Ajusta-se o pH para 7 com soda 2 N e deixa-se reagir sob agitação durante 7 dias. Constata-se um importante insolúvel.
- c) Eliminação do insolúvel:
Centrifuga-se a 15.000 rpm à temperatura de +4°C, e em seguida efectua-se uma filtração sobre filtro Millipore 0,2 micron e lava-se com 1 ml de tampão fosfato.
- d) Filtração em gel:
O produto recuperado na etapa precedente é depositado numa coluna Ultrogel (R) AcA 44 (IBF, França) de dimensão



2,6 x 100 cm. A operação é seguida por espectrofotômetro de 280 nm e recupera-se o pico de proteína.

e) Caracterização do produto:

Estuda-se a taxa de acoplamento do produto doseando-se as proteínas pelo método de Bleu de Coomassie e o OS 4-10-CHO pelo método do carbazol. Os resultados são calculados para um PM médio de 2.000 Dalton no que diz respeito ao OS 4-10-CHO e 65.000 Dalton no que diz respeito à albumina.

Os resultados são os seguintes:

Proteínas : 4,6 mg/ml, i.e. para 7 ml: 32 mg (0,47 μ M)
OS 4-10-CHO: 1,22 mg/ml, i.e. para 7 ml: 8,54 mg (4,28 μ M)

Têm-se portanto 9 moles de OS 4-10-CHO para 1 mole de albumina.

EXEMPLO

(a) Adsorção do polícatião sobre as cavidades da placa de microtitulação

250 μ l de uma solução de Poli-L-lisina (PM 5000-9000, vendida por Serva, França) com a concentração de 100 μ l num tampão bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 são depositados em cada uma das cavidades de uma placa de microtitulação. Deixa-se incubar 48 horas à temperatura de +4°C.

As cavidades são em seguida esvaziadas por aspiração e depois lavadas com duas vezes 300 μ l de soluto cloretado isotônico (NaCl 9 p. 1000).

As placas estão prontas para a dosagem.

- (b) Incubação do líquido no qual se encontra o polianião sulfatado a dosear e preparação da curva de escalonamento

Introduz-se em cada cavidade 200 µl da solução amostra a dosear e paralelamente estabelece-se uma curva de escalonamento metendo num número de cavidades apropriado 200 µl do mesmo meio biológico ao qual se terá adicionado uma quantidade conhecida do polianião sulfatado que se deseja dosear, ou seja 0,0 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2,5 e 5 µg.

A todos os meios biológicos foi adicionada benzamidina à concentração de 0,0125 M.

Deixa-se incubar durante 2 horas, à temperatura de +4°C. Lava-se em seguida com 2 vezes 300 µl de soluto cloretado isotónico.

- (c) Colocação em contacto com a mistura reveladora

Prepara-se a mistura reveladora a partir dos conjugados GAG-peroxidase e GAG-albumina na proporção, expressa em equivalente de produto puro, de 3,4 µg/ml de peroxidase para 7,7 µg/ml de albumina, em solução no soluto NaCl 9 p. 1000.

Deposita-se 200 µl desta mistura em cada cavidade. Deixa-se incubar 1 hora a +4 °C. Lava-se em seguida com 2 vezes 400 µl de soluto cloretado isotónico.

- (d) Revelação da quantidade de enzima presente

Deposita-se em cada cavidade 100 µl da mistura seguinte:

- 0,5 mg de ortofenileno diamina em 1 ml de tampão citrato de sódio, HCl 0,1 M, pH 3,5;
- 0,75 µl de peróxido de hidrogénio.

Deixa-se incubar 10 minutos à temperatura ambiente (cerca de 20 a 25 °C). Para-se a reacção por adição em cada cavidade de 100 µl de ácido sulfúrico 1 N. Determina-se em seguida a densidade óptica a 492 nm.

A curva de escalonamento é dada na Figura 1. Ela dá em ordenada a densidade óptica e em abcissa o log da concentração expressa em µg/ml.

Faz-se referência a esta curva de escalonamento para determinar, a partir da densidade óptica da amostra a dosear, a concentração em produto da amostra.

Os produtos A) a F) da lista seguinte foram previamente introduzidos numa mistura de plasma humano e doseados.

Os produtos testados são os seguintes:

- A) Heparina do comércio, lote H-801 (Laboratoire Choay, Paris, França)
- B) Dextrano sulfato, lote 12-837 (Pharmacia, Suécia)
- C) Fragmento de heparina vendido no comércio sob a denominação Fraxiparine, lote XH-716 (Laboratoire Choay, Paris, França)
- D) Pentosano polissulfato vendido no comércio sob a denominação Hémoclar, lote B2003 (Laboratoire Midy, Paris, França)
- E) Dosagem do fragmento de heparina conhecido sob a denominação CY 222 e descrito no Pedido de Patente

Europeia EP 037 319, lote P 54 WH (Laboratoire Choay, Paris, França)

F) Dosagem de um fragmento de heparina obtido por despolimerização com periodato e tendo as seguintes características:

PM médio: 6.000 Dalton

Local de fixação à AT III: nada

Estrutura: essencialmente constituída por dissacárido trissulfatado regular de tipo heparínico

Actividade anti-XA : inferior a 15 u/mg

Actividade anti-IIa: inferior a 15 u/mg

Código: IC 1772 - lote P 37 VH (Laboratoire Choay, Paris, França)

O produto IC 1772 foi preparado da seguinte maneira:

(I) Corte das cadeias de heparina com a ajuda do ácido periódico

10 g de heparina injectável de muco de porco, sob a forma de sal de sódio, titulando 157 uI/mg na dosagem Codex e 155 u/mg na dosagem anti-factor Xa de Yin et al., são dissolvidos em 250 ml de água desmineralizada a 4°C. O pH da solução é ajustado a 5,0 por ácido clorídrico concentrado. 10 g de metaperiodato de sódio (NaIO_4 , PM: 213,89) dissolvidos em 250 ml de água desmineralizada são adicionados sob agitação moderada. O pH do conjunto é ajustado a 5,0 por ácido clorídrico concentrado. A solução é abandonada 24 horas, na obscuridade, em câmara fria a 4°C.

(2) Eliminação do periodato residual

Reparte-se em seguida a solução reaccional por 3 tubos de diálise NDJAX 40^R (porosidade de 3 a 4000 Da) e submete-se a uma diálise durante 15 horas em contracorrente com água desmineralizada.

(3) Despolimerização em meio básico

Aos 780 ml de solução obtida após diálise, são adicionados 16 ml de soda 10 N, e o conjunto é submetido a agitação durante 3 horas à temperatura ambiente (da ordem de 18-21 °C).

(4) Redução

500 mg de boro-hidreto de sódio (NaBH₄, PM: 37,83) são então adicionados e a solução é agitada de novo durante 4 horas à temperatura ambiente. O seu pH é em seguida levado a 4 com a ajuda de ácido clorídrico concentrado. Depois de 15 minutos de agitação, o pH é ajustado para 7 com ajuda de soda concentrada.

Aos 820 ml de solução assim obtida são adicionados 16,4 g de NaCl e depois 1270 ml de etanol.

O conjunto é deixado em repouso durante 3 horas e depois é centrifugado a 2500 rot/minuto durante 20 minutos.

O precipitado é recolhido, repostado em suspensão em 200 ml de etanol puro, moído no Ultra-Turrax^R e finalmente recuperado por filtração sobre buchner fritado.

é então seco sob vácuo a 40 °C durante 5 horas.

Recupera-se assim 8,9 g de produto intermediário que tem as seguintes propriedades:

- dosagem Codex : 8 uI/mg
- dosagem APTT : 7 uI/mg
- dosagem Anti-Xa : 8 u/mg.

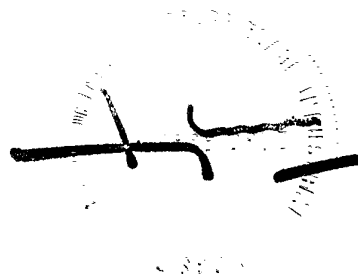
(5) Fracionamento alcoólico

Estes 8,9 g são dissolvidos em cerca de 120 ml de água desmineralizada à temperatura ambiente. Adiciona-se 1,78 g de NaCl e o pH da solução é baixado até 3,5 com a ajuda de ácido clorídrico. O volume da solução é ajustado a 170 ml com a ajuda de água desmineralizada. São adicionados sob agitação 151 ml de etanol puro. A agitação é mantida por 15 minutos após o fim da adição e depois o conjunto é deixado em repouso durante 10 horas, à temperatura ambiente.

O precipitado formado é recolhido por centrifugação - 20 minutos a 2500 rot/min. é ressuspenso em 150 ml de etanol puro, moído no Ultra-Turrax, recuperado por filtração sobre buchner fritado lavado por 300 ml de etanol puro e finalmente seco sob vácuo a 40 °C durante 24 horas.

Recuperam-se assim sob a forma de pó branco 5 g do produto IC 1772 que tem as características seguintes:

- título Codex : 11 uI/mg
- título APTT : 9 uI/mg
- título Anti-Xa : 12 u/mg.



Os resultados obtidos são repostos nas figuras 1 a 6 que representam as curvas de escalonamento obtidas com os produtos A a F, por ordem.

Sobressai das figuras 1 a 6 que, com base no método de dosagem descrito no presente invento, se obtém uma variação da densidade óptica que é função da quantidade de produto presente no plasma. Esta variação de densidade óptica permite portanto avaliar numa dada amostra, por exemplo o plasma de um animal ou de um paciente tratado por um dos produtos (polianíses sulfatados fortes), o teor deste plasma no produto considerado.

REIVINDICAÇÕES:

1ª - Processo de dosagem de poliósidos sulfatados fortemente aniónicos num líquido, caracterizado por estar baseado na dosagem, graças a um conjugado aniónico revelador, dos sítios catiónicos que ficam livres sobre uma superfície recoberta de um policatião, logo que este tenha sido posto em contacto com o líquido que contém o poliósido aniónico sulfatado a dosear, sendo o conjugado aniónico revelador escolhido de tal maneira que a sua densidade de carga lhe permite fixar-se nos sítios que ficam vagos sobre o policatião que recobre a superfície, sem todavia deslocar o poliósido a dosear que aí se encontra previamente fixado, e sendo a quantidade do produto a dosear determinada por referência a uma curva de escalonamento estabelecida simultaneamente sobre a própria placa.

2ª - Processo de dosagem de poliósidos sulfatados fortemente aniónicos num líquido, caracterizado por:

- (a) se pôr em contacto uma quantidade determinada do líquido biológico que contém o produto a dosear com uma superfície recoberta de um produto catiónico;
- (b) se pôr em contacto o conjunto assim obtido com um excesso de um conjugado aniónico revelador, escolhido de tal maneira que a sua densidade de carga lhe permite fixar-se sobre os sítios que ficam vagos sobre o produto catiónico da etapa (a) sem todavia deslocar o poliósido que aí se encontra previamente fixado;

- (c) se eliminar o excesso da mistura reveladora que não se fixou por ligação iónica com o excesso do produto catiónico da etapa (a);
- (d) se dosear, por um método apropriado, função do conjugado revelador escolhido, a quantidade do dito conjugado revelador que se fixou por ligação iónica no decurso da etapa (b);
- (e) se determinar a quantidade total do produto a dosear na amostra referindo a quantidade do conjugado revelador definido segundo o método apropriado da etapa (d) a uma curva de escalonamento estabelecida simultaneamente sobre a própria placa segundo o mesmo método.

3ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado por o catião utilizado ser um polímero básico escolhido do grupo constituído por sulfato de protamina, polibreno, poliarginina e poli-L-lisina.

4ª - Processo de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por se utilizar como policatão uma poli-L-lisina com um peso molecular médio que se situa entre 6.000 e 9.000 daltons.

5ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizado por na etapa (a) o policatão ser absorvido nas cavidades de uma placa de microtitulação, em meio básico, por incubação durante 24 a 72 horas, de preferência 48 horas a uma temperatura que se situa entre 0 e 20°C, depois de lavagem.

6ª - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o meio básico no qual se encontra o policatão ser um

tampão trifosfato ou um tampão bicarbonato de pH compreendido entre 9 e 10.

7a - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o conjugado aniônico revelador da etapa (b) ser constituído por um glicosaminoglicano ligado de maneira covalente a uma enzima.

8a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 7, caracterizado por na etapa (b) a mistura ser incubada durante pelo menos 2 horas a uma temperatura que se situa entre 0 e 20°C, depois de lavagem.

9a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, caracterizado por na etapa (d) se utilizar um método de dosagem enzimático.

10a - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a enzima do conjugado revelador ser doseável por acção sobre um substrato e libertação de um produto colorido, que se doseia por densidade óptica.

11a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado por o poliósido aniônico do conjugado revelador ser um glicosaminoglicano.

12a - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o glicosaminoglicano do conjugado revelador ser a heparina ou um dos seus fragmentos.

13a - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o glicosaminoglicano ser uma mistura de

fragmentos de heparina constituídos por cadeias que possuem essencialmente de 4 a 10 unidades dissacarídicas.

14a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado por o conjugado revelador ser um conjugado GAG-enzima diluído com um conjugado GAG-albumina, sendo idênticos os GAGs utilizados para os dois conjugados.

15a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado por a enzima utilizada ser a peroxidase de rabanete.

16a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado por os constituintes do GAG-enzima serem respectivamente o DS 4-10-CHO e a peroxidase de rabanete.

17a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado por a quantidade de enzima presente em cada uma das cavidades ser revelada por uma mistura de ortofenileno diamina e de peróxido de hidrogénio.

18a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 15, 16 ou 17, caracterizado por na etapa (d) se revelar a quantidade de enzima presente por adição de uma mistura de ortofenileno diamina em tampão citrato, pH 3,5 e de peróxido de hidrogénio e incubação 10 minutos à temperatura ambiente, depois de paragem da reacção por adição de um ácido forte.

19a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado por a enzima utilizada ser a fosfatase.

20a - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o substrato de dosagem do conjugado GAG-fosfatase ser o 4-nitrofenil fosfato.

21a - Recipiente destinado à dosagem de polióssidos sulfatados fortemente aniônicos caracterizado por conter os elementos seguintes:

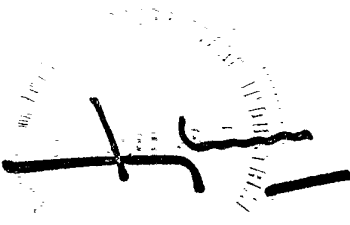
- Placa de microtitulação
- Policatife
- Conjugado revelador constituído por um polianião ligado de maneira covalente a um revelador escolhido do grupo constituído por uma enzima e uma molécula orgânica susceptível de ser marcada
- Substrato de dosagem escolhido em função do conjugado revelador.

22a - Recipiente de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por conter os elementos seguintes:

- Placa de microtitulação
- Policatife escolhido do grupo constituído por sulfato de protamina, polibreno, poliarginina e poli-L-lisina
- GAG-enzima liofilizado
- Substrato da enzima escolhida, gerador de um corante.

23a - Recipiente de acordo com a reivindicação 21 ou 22, caracterizado por conter os elementos seguintes:

- Placa de microtitulação
- Policatife escolhido do grupo constituído por sulfato de protamina, polibreno, poliarginina e poli-L-lisina

- 
- GAG-enzima liofilizado, sendo a enzima escolhida no grupo constituído pela peroxidase de rabanete e a fosfatase
 - GAG-albumina liofilizado
 - Substrato da enzima escolhida, gerador de um corante.


24a - Recipiente de acordo com a reivindicação 21 a 23, caracterizado por conter um múltiplo de cada um dos elementos seguintes:

- Placa de microtitulação : 1
- Poli-L-lisina : 25 ml a 100 µg/ml
- GAG-peroxidase liofilizado : 68 µg
- GAG-albumina liofilizado : 54 µg
- Ortófenileno diamina : 10 ml (5 mg).

25a - Recipiente de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24 caracterizado por as placas de microtitulação serem recobertas pelo policatión e prontas a serem empregues.

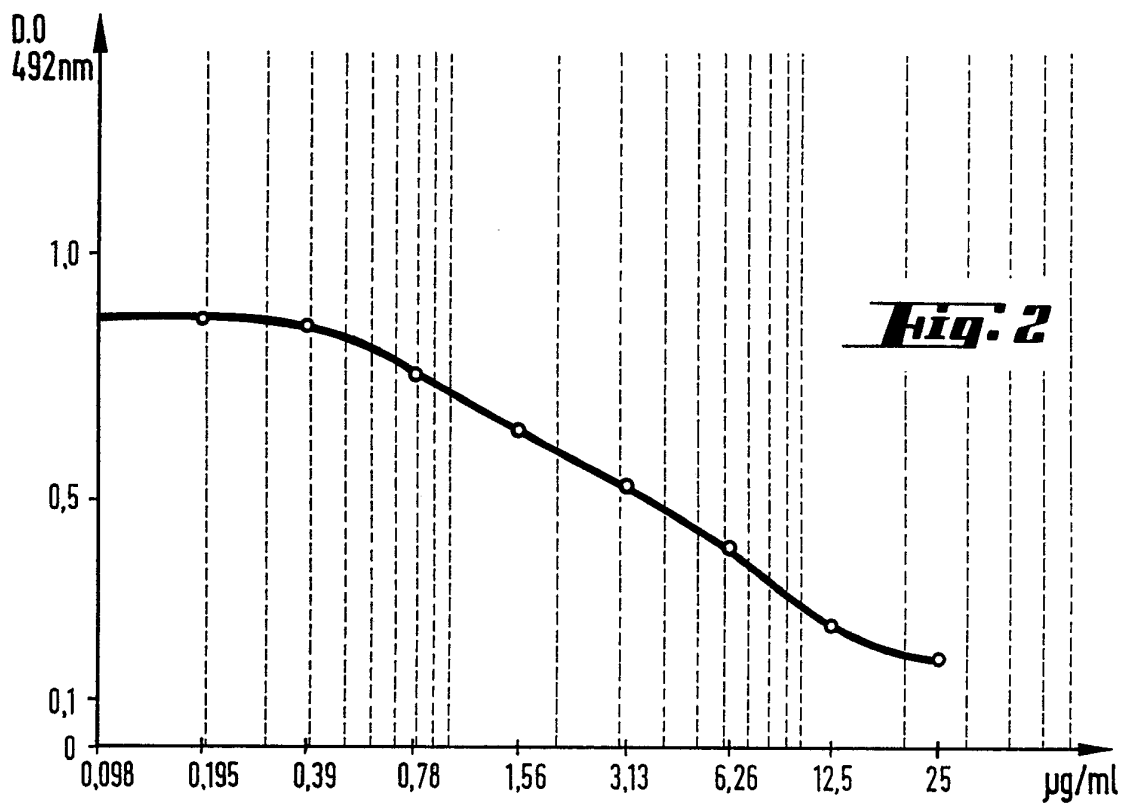
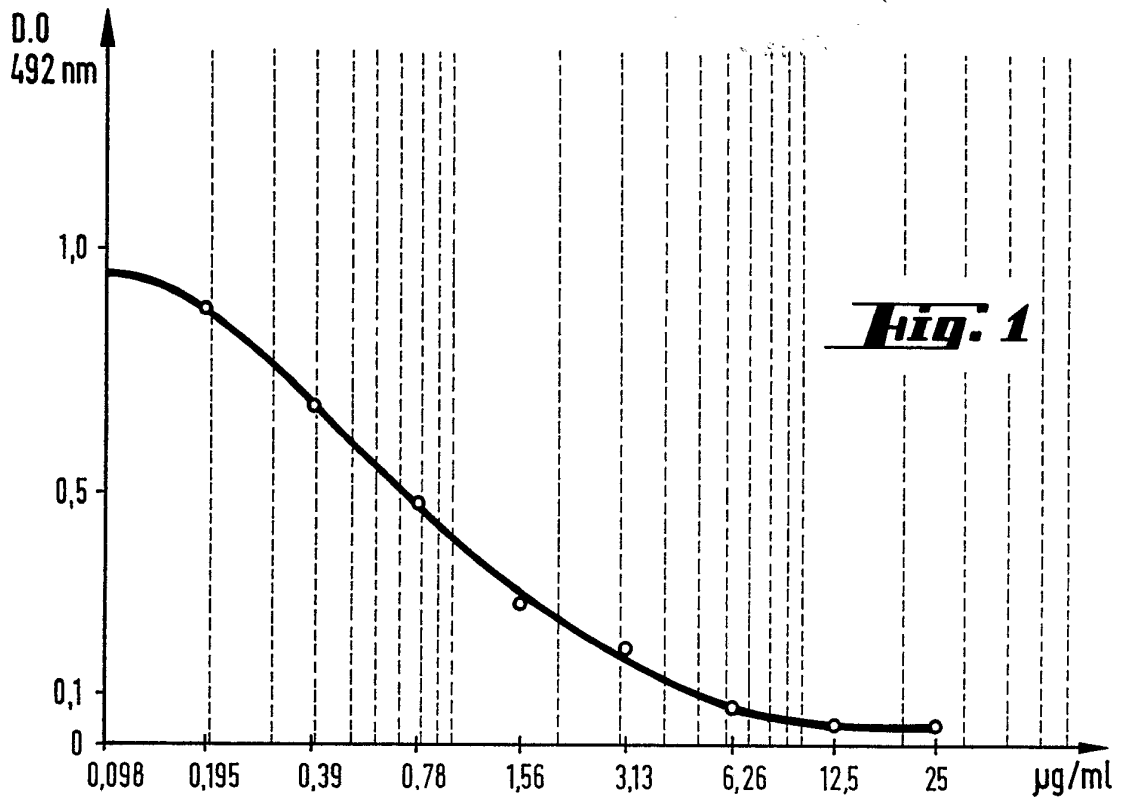
26a - Recipiente de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 25, caracterizado por ser acompanhado de instruções de utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20.

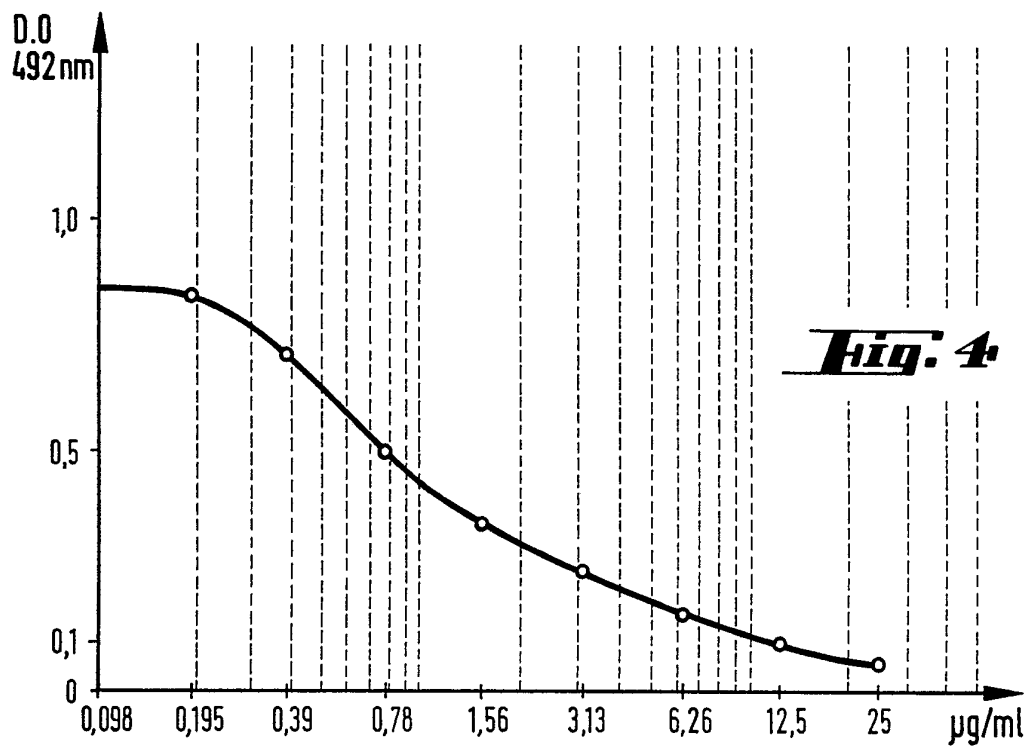
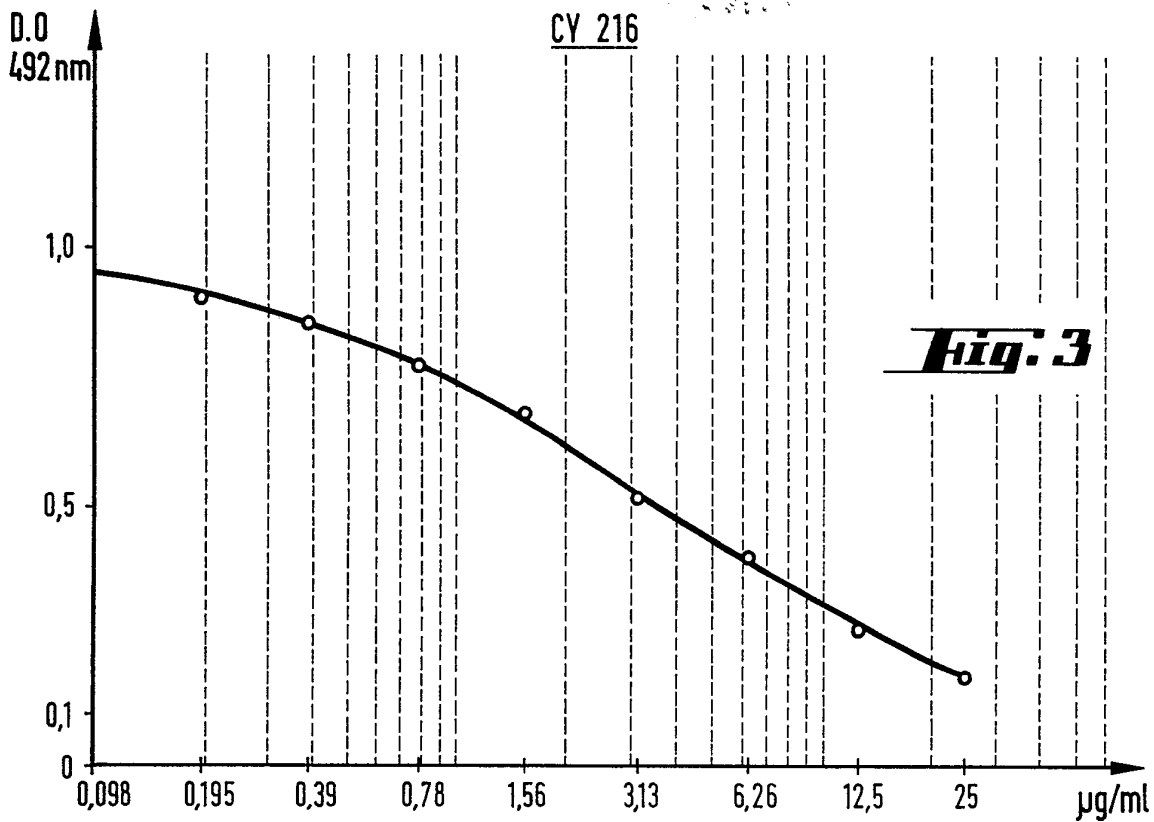
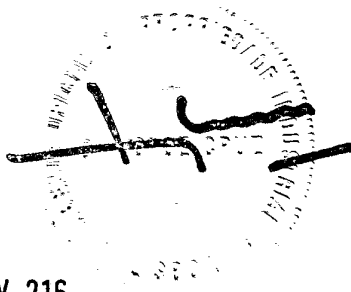
Lisboa, 29 de Setembro de 1989



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

Handwritten signature or initials.





CY 222

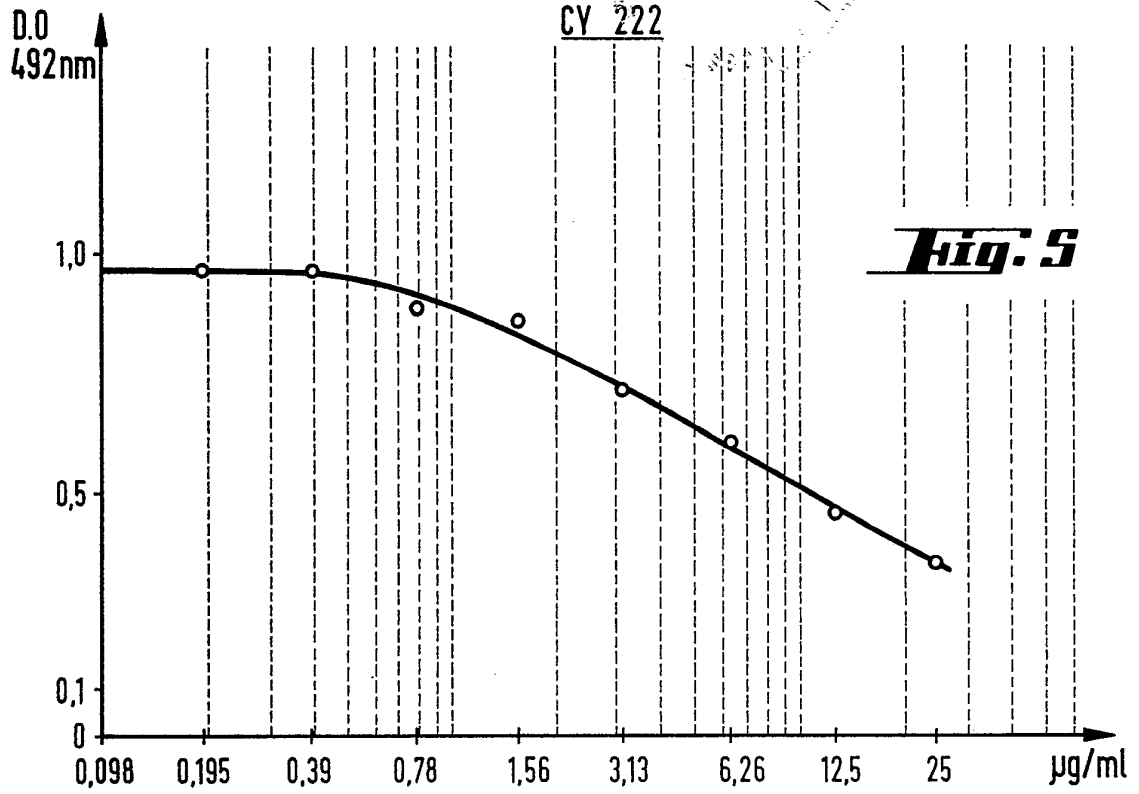


Fig. 5

IC 86 1772

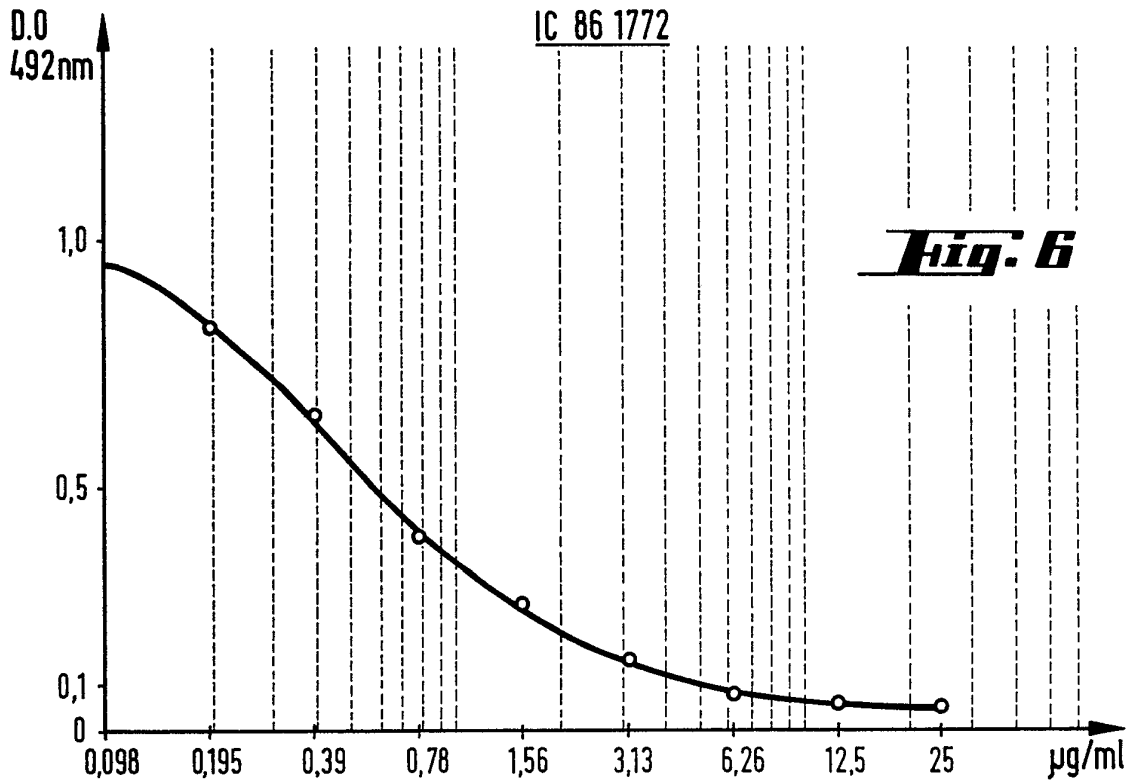


Fig. 6