

(11) *Número de Publicação:* **PT 90861 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07K003/12 A

C07K015/00 B

A61K037/64 B

A61K035/62 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.06.14	(73) <i>Titular(es):</i> MERRELL DOW PHARMACEUTICALS, INC. 2110 EAST GALBRAITH ROAD CINCINNATI, OHIO 45215 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.06.16 US 207415	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.12.29	
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 05/94 1994.05.18	
	(72) <i>Inventor(es):</i> ALAN DOUGLAS CARDIN US
	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UM PRINCÍPIO ANTICOAGULANTE A PARTIR DA SANGUESSUGA SUL-AMERICANA HAEMENTERIA GHILIANI

(57) *Resumo:*

[Fig.]

Q. 4. 4090.861

4.

MERREL DOW PHARMACEUTICALS INC.

"Processo para a extracção e purificação de um
princípio anticoagulante a partir da sangues-
suga sul-americana, "Haementeria Ghilianii""

ÂMBITO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma substância proteica que possui actividade de inibição do Factor X_a e ao processo para o seu isolamento a partir da saliva das glândulas salivares da sanguessuga Haementeria ghilianii, utilizando técnicas de separação cromatográfica.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os anticoagulantes constituem agentes terapêuticos úteis para o tratamento farmacológico de, por exemplo, trombose venosa aguda, embolia pulmonar, embolização arterial aguda das extremidades, enfarte do miocárdio e coagulação intravascular disseminada. Pensa-se que a administração profilática de anticoagulantes evita a repetição da embolia em pacientes com doenças cardíacas arterioscleróticas ou reumáticas e que evita diversas complicações tromboembólicas em cirurgia. A administração de anticoagulantes também é prescrita para o tratamento de doenças cerebrovasculares e das artérias coronárias. A trombose arterial, particularmente nas artérias que alimentam o cérebro e o músculo cardíaco constitui uma das principais causas de morte.

A coagulação sanguínea depende de diversas enzimas e de cofactores e faz-se por duas vias separadas, as vias intrínseca

e extrínseca. Na via intrínseca ou em cascata, todos os factores estão presentes no sangue em circulação, mas a coagulação por este mecanismo, uma vez iniciada, leva diversos minutos a completar-se. Na via extrínseca são libertados pelas células danificadas diversas lipoproteínas, isto é, Factor III, que normalmente não está presente no sangue em circulação, iniciando-se a coagulação ao fim de alguns segundos. Estas vias convergem num ponto do processo de coagulação em que o Factor X_a em conjunto com o Factor V e o ião de cálcio formam um complexo de protrombinase que catalisa a conversão de protrombina em trombina. Deste modo, o Factor X_a é de importância vital nas duas vias de coagulação e a sua inibição deverá reduzir a coagulação sanguínea independentemente da causa. Apesar de serem conhecidos diversos inibidores do Factor X_a , esses inibidores ou são da classe das clorocetonas, que são bastante tóxicas, ou são inibidores não específicos de serina-proteases. Deste modo, um inibidor específico e não tóxico de Factor X_a teria um importante valor terapêutico.

As sanguessugas têm sido utilizadas em medicina desde a Antiguidade. A utilização medicinal de sanguessugas nos princípios do século XIX quase provocou a extinção da espécie Hirudo medicinalis e obrigou a Rússia a impor quotas para a sua exportação. Mais recentemente tem-se estudado cientificamente as secreções das sanguessugas e descobriu-se que contêm uma diversidade de produtos biológicos que possuem um largo espectro de actividades bioquímica e farmacológica tais como propriedades anticoagulantes, antimetastásicas, anestéticas, antibióticas e vasodilatadoras. Por exemplo, a Hirudina iso-

lada a partir das glândulas salivares da sanguessuga Hirudo medicinalis constitui o mais específico e poderoso inibidor de trombina conhecido. Por isso, a Hementina que é isolada a partir das glândulas salivares da sanguessuga Haementeria ghilianii é uma enzima fibrinogenolítica com um peso molecular elevado. Trata-se do reconhecido princípio anticoagulante desta sanguessuga. Esta enzima degrada o fibrinogénio e a fibrina em vez de activar o sistema fibrinolítico do hospedeiro ou de inibir o sistema de coagulação.

A Requerente identificou e isolou a partir da saliva e dos extractos de tecidos das glândulas salivares da sanguessuga Haementeria ghilianii uma substância proteica que constitui um inibidor específico do Factor X_a e que é útil para inibir a coagulação do sangue.

SUMARIO DA INVENÇÃO

A substância proteica com actividade inibidora do Factor X_a , originada e isolada a partir das glândulas salivares da sanguessuga Haementeria ghilianii, é um agente anticoagulante útil. Isola-se a substância submetendo a saliva ou o extracto das glândulas salivares da sanguessuga Haementeria ghilianii a separação cromatográfica utilizando uma resina de permuta aniónica e eluindo com um gradiente salino crescente. As fracções que possuem elevada actividade inibidora do Factor X_a e elevada actividade anticoagulante são depois submetidas a cromatografia líquida de alta pressão de fase inversa (HPLC) para purificar melhor a substância que possui actividade inibidora do Factor X_a .

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

O termo "saliva" aqui utilizado refere-se não só à saliva (ou secreções salivares) mas também ao tecido homogeneizado obtido a partir de toda a sanguessuga e bem assim qualquer parte da sanguessuga, particularmente a partir das glândulas salivares. O termo "saliva" engloba também qualquer isolado da saliva, desde que, com é evidente, o isolado ou o homogenato de tecido contenham a substância proteica da presente invenção, possuindo actividade inibidora do Factor X_a . Também é possível encontrar uma substância proteica com actividade idêntica à substância da presente invenção, na saliva de outras espécies de Haementeria tal como H.officinalis.

Admite-se que a substância proteica da presente invenção possuindo actividade inibidora do Factor X_a seja constituída por diversas sequências de proteínas afins, sendo pelo menos duas destas proteínas as principais responsáveis pela actividade inibidora do Factor X_a . Para os objectivos da presente invenção consideram-se englobadas todas as proteínas/peptidos que possuam actividade inibidora do Factor X_a , isto é, que apresentem um valor IC_{50} de pelo menos 1000 nM, individualmente ou em associação, tal como a associação isolada pelo processo da presente invenção a partir da saliva da sanguessuga Haementeria ghilianii. A Requerente pretende especificamente abranger a substância proteica da presente invenção, quer esta seja obtida por síntese sequencial e de blocos quer seja obtida por clonagem e expressão de genes.

Apesar de não ser ainda conhecida a sequência completa de aminoácidos para estes peptidos, foram já determinadas algu-

mas propriedades. Os peptidos que constituem a substância proteica da presente invenção têm um peso molecular de aproximadamente 18 Kdal e não são altamente glicosilados. Embora possam estar presentes alguns grupos açúcar, a Requerente descobriu que o peso molecular aparente não varia significativamente com a concentração do gel de poliacrilamida no ensaio em SDS-PAGE (electroforese em gel de poliacrilamida/dodecilsulfato de sódio), sugerindo a falta de grupos glicosilo significativos nos peptidos. A Requerente descobriu também que cada peptido tem cerca de 6 resíduos alanina, 5 resíduos metionina, 12-14 resíduos lisina, 18-21 resíduos arginina e 16-17 resíduos prolina e uma fraca abundância de resíduos aromáticos, por exemplo, 4 resíduos fenilalanina e 6 resíduos tirosilo, ao efectuar a análise dos aminoácidos. A informação mais exacta sobre a composição, tal como o número de resíduos de cisteína/cistina e de triptofano, aguarda a disponibilidade de maiores quantidades de peptido e a análise sequencial.

Nesta memória descritiva utilizam-se as seguintes abreviaturas normalmente utilizadas para os aminoácidos:

Ala (ou A) - alanina
Arg (ou R) - arginina
Asx - asparagina e/ou ácido aspártico
Gly (ou G) - glicina
His (ou H) - histidina
Leu (ou L) - leucina
Lys (ou K) - lisina
Met (ou M) - metionina
Phe (ou F) - fenilalanina

Pro (ou P) - prolina
Ser (ou S) - serina
Thr (ou T) - treonina
Tyr (ou Y) - tirosina
Val (ou V) - valina

A substância proteica da presente invenção que possui actividade inibidora do Factor X_a pode, tal como muitas proteínas/peptidos, formar sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos orgânicos ou inorgânicos não tóxicos. Os exemplos ilustrativos de ácidos inorgânicos que formam sais adequados englobam os ácidos clorídrico, bromídrico, sulfúrico e fosfórico e sais ácidos de metais tais como o ortofosfato de mono-hidrogénio e sódio e o sulfato de hidrogénio e potássio. Os exemplos ilustrativos de ácidos orgânicos que proporcionam sais adequados englobam os ácidos mono-, di- tri-carboxílicos. São exemplos desses ácidos, por exemplo, os ácidos acético, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, benzóico, hidroxibenzóico, fenilacético, cinâmico, salicílico, 2-fenoxibenzóico e também os ácidos sulfónicos tais como o ácido metano-sulfónico e o ácido 2-hidroxietano-sulfónico. Os sais de radical aminoácido carboxi-terminal englobam os sais de ácido carboxílico não tóxicos formados com quaisquer bases inorgânicas ou orgânicas adequadas. A título ilustrativo, estes sais englobam os de metais alcalinos, por exemplo, sódio e potássio; de metais alcalino-terrosos, tais como o cálcio e magnésio; de metais leves do grupo IIIA incluindo o alumínio; e de aminas orgânicas primárias, secundárias e terciárias, tal como, por

exemplo, triálquil-aminas, incluindo trietilamina, procaína, dibenzilamina, l-etenamina, N,N'-dibenzil-etilenodiamina, di-hidro-abietilamina, N-(álquil inferior)-piperidina e, quaisquer outras aminas adequadas.

A dose anticoagulante da substância proteica da presente invenção, possuindo actividade inibidora do Factor X_a , está compreendida entre 0,2 mg/kg e 250 mg/kg de peso do corpo do paciente por dia, dependendo, por exemplo, do paciente e da gravidade do estado trombótico que se pretende tratar. A dose adequada para um paciente particular pode ser facilmente determinada. Típica e preferencialmente administrar-se-á entre 1 e 4 doses diárias contendo entre 5 mg e 100 mg de ingrediente activo por dose. A concentração da subatância proteica da presente invenção, possuindo actividade inibidora do Factor X_a , necessária para inibir o Factor X_a quando utilizada para inibir a coagulação do sangue ou o Factor X_a num meio tal como o sangue armazenado, pode ser facilmente determinada pelos especialistas na matéria.

A terapia anticoagulante é prescrita para o tratamento e prevenção de diversos estados trombóticos, particularmente no caso de doenças cerebrovasculares e das artérias coronárias. Os especialistas nesta matéria são facilmente alertados para as circunstâncias que lhe exijam uma terapia anticoagulante. O termo "paciente" aqui utilizado abrange mamíferos tais como os primatas, incluindo seres humanos, ovinos, equinos, bovinos, suínos, caninos, felinos, ratos e murganhos. A inibição do Factor X_a é útil não só na terapia anticoagulante em indivíduos com estados trombóticos, mas também é útil sempre que seja necessária a inibição da coagulação do sangue tal como sucede

quando se pretende evitar a coagulação de sangue integral armazenado e quando se pretende evitar a coagulação em outras amostras biológicas para ensaio ou para armazenamento. Assim, pode adicionar-se a substância proteica da presente invenção, possuindo actividade inibidora do Factor X_a , a qualquer meio que contenha ou que se suspeite que contenha Factor X_a , ou pode simplesmente promover-se o contacto entre ambos, desde que se pretenda inibir a coagulação do sangue.

Apesar de a substância proteica da presente invenção, possuindo actividade inibidora do Factor X_a , poder sobreviver à passagem através do intestino após administração oral, a Requerente prefere a administração não oral, por exemplo, a administração subcutânea, intravenosa, intramuscular ou intraperitoneal; administração por injeção de aglomeração; ou por preparação de implantação.

Para administração parentérica é possível administrar a substância proteica da presente invenção que possui actividade inibidora do Factor X_a sob a forma de uma dosagem injectável de uma solução ou suspensão da substância num diluente fisiologicamente aceitável juntamente com um veículo farmacêutico, o qual pode ser um líquido esterilizado tal como água e óleos, com ou sem a adição de um agente tensioactivo e de outros adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis. Os exemplos ilustrativos de óleos que é possível utilizar nestas composições são os derivados de petróleo, óleos de origem animal, vegetal ou sintéticos, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja e óleo mineral. Em geral, a água, as soluções salinas, as soluções aquosas de dextrose e soluções de açúcar afins, etanol e glicóis tais como propilenoglicol ou polietilenoglicol são os

veículos líquidos preferidos, particularmente para soluções injectáveis.

A substância proteica da presente invenção que, possui actividade inibidora do Factor X_a , pode ser administrada sob a forma de uma injeção de aglomeração ou através de uma preparação de implantação, as quais podem ser formuladas de modo a permitir uma libertação controlada do ingrediente activo. O ingrediente activo pode ser comprimido em grânulos ou em pequenos cilindros que são implantados subcutânea ou intramuscularmente sob a forma de composições para implantação ou de injeções de aglomeração. As implantações podem utilizar materiais inertes tais como polímeros biodegradáveis ou silicones sintéticos, por exemplo, "Silastic", borracha de silicone ou outros polímeros preparados pela "Dow-Corning Corporation".

A substância proteica da presente invenção é preparada a partir da saliva de sanguessugas. O extracto de glândulas salivares, quer das glândulas salivares anteriores quer das posteriores quer de ambas de *H. ghilianii*, para utilização na obtenção e purificação da substância proteica da presente invenção, pode ser obtido por várias vias, tal como a remoção cirúrgica das glândulas e sua homogeneização, extraíndo o homogenato de tecido com, por exemplo, uma solução de sulfato de amónio ou de outros sais, tais como cloreto de sódio ou tampões, ou com acetona, e concentrando ou desidratando o extracto, ou submetendo a ultracentrifugação o homogenato de tecido. Depois, submete-se o extracto de glândulas salivares bruto resultante a cromatografia convencional para se isolar a porção que possui actividade anticoagulante e inibidora de FX_a . A Requerente utilizou cromatografia sobre DEAE-celulose,

uma resina de permuta aniônica e sobre uma resina de agarose-heparina, eluindo com gradiente salino de cloreto de sódio linearmente crescente. Como é evidente, é possível utilizar outras resinas e realizar a eluição com outros sais com vários gradientes ou com misturas ou dissolventes orgânicos e utilizando caudais na coluna variáveis para isolar a porção que tem actividade inibidora do Factor X_a e anticoagulante, pelo processo usual.

Depois submete-se o extracto de glândulas salivares purificado resultante, a um passo de cromatografia de afinidade utilizando Factor X_a , tal como o Factor X_a de bovinos, ligado a uma resina para cromatografia, tal como as resinas vulgarmente utilizadas em cromatografia de afinidade tendo grupos químicos disponíveis para ligação ao factor X_a . A Requerente utilizou Affi-Gel-15, uma resina que contém éster N-succinídico fornecida pela Bio-Rad Corporation. Com esta resina o Factor X_a pode ser ligado fazendo a incubação da resina juntamente com o Factor X_a associado ao ácido 4-morfolino-propano-sulfónico e subsequentemente com etanolamina. Submete-se a cromatografia o extracto de glândulas salivares purificado, utilizando esta resina e eluindo com HEPES, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfónico, que contém o inibidor de serina-protease reversível de sítio activo, benzamidina, e recolhendo a porção que possui actividade anticoagulante e amilolítica. Para um especialista na matéria é fácil conceber diversas variações convencionais desta técnica de cromatografia por afinidade.

Depois, purifica-se a substância proteica bruta resultante que possui actividade inibidora do Factor X_a . Esta puri-

figuração pode ser realizada por qualquer processo convencional tal como a cromatografia de fase inversa, um tipo de cromatografia em que a fase estacionária é não polar e a fase de eluição é polar. A fase estacionária é tipicamente uma cadeia hidrocarbonada quimicamente ligada a uma superfície inerte, tal como o vidro, e a fase de eluição é uma solução aquosa de metanol, acetonitrilo ou propanol. No caso de cromatografia por interacção hidrofóbica, a fase estacionária é não polar e a fase de eluição é polar, tal como água ou tampão aquoso. A Requerente utilizou uma resina do tipo C-18, isto é, uma resina em que o hidrocarboneto ligado à resina sólida é essencialmente um hidrocarboneto com 18 átomos de carbono, tal como "Aquapore RP-300", resina C-18, eluindo com gradiente linearmente crescente de uma solução aquosa de acetonitrilo, que contém ácido trifluoroacético. Todavia, outras colunas adequadas podem englobar resinas C₃, C₄, C₆, C₈, etc.

EXEMPLOS

Seguidamente ilustra-se a presente invenção com exemplos não limitativos.

EXEMPLO 1

Preparação da Substância Inibidora de FX a partir de Extracto de Glândulas Salivares de H.^a Ghilliani e sua Caracterização

Ensaio de Coagulação, Cromogénicos e Fibrinogénolíticos

Procedeu-se a ensaios de coagulação num só passo para determinar o tempo necessário à formação de protrombina e realizou-se o controlo espectrofotometricamente com um cronómetro de coagulação automático Electra 800 (Medical Laboratory

Automation, Inc.), utilizando programas normalizados e reagentes recomendados pelo fabricante. Sucintamente, adicionou-se a 100 μ l de plasma humano normal citrado diversas quantidades de (i) um extracto bruto de tecido das glândulas salivares de Haementeria ghilianii em HEPES 20mM, NaCl 0,15 M, CaCl_2 2,5 mM, pH 7,4, (ii) fracções cromatográficas de extracto de glândulas salivares de H.ghilianii em tampão de eluição em coluna ou (iii) inibidor de FX_a purificado obtido a partir de glândulas salivares de H.ghilianii em HEPES 20mM, NaCl 0,15 M e CaCl_2 2,5 mM, pH 7,4. Fez-se a determinação dos tempos de coagulação após a adição de 200 μ l de reagente tromboplastina ($\text{DADE}^{(R)}$) contendo CaCl_2 11,6mM. Os ensaios cromogénicos de FX_a e as actividades amidolíticas da trombina foram efectuados em placas de microtitulação de 96 cavidades (Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, NY) com acetato de metoxi-carbonil-D-ciclo-hexil-glicil-glicil-arginina-p-nitroanilida e com acetato de H-D-hexa-hidrotirosil-L-alanil-L-arginina-p-nitroanilida, respectivamente. Nestes ensaios adicionou-se entre 0,15 e 16 ng de enzima em 25 μ l de HEPES 20mM e NaCl 0,15 M, pH 7,4 (tampão de ensaio) a 25 μ l de tampão de ensaio seguindo-se a adição de 50 μ l da amostra do inibidor apropriado. As soluções foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e o ensaio começou com a adição de 100 μ l de substratos cromogénicos com uma concentração final de $2,5 \times 10^{-4}$ M. As actividades amidolíticas na ausência e na presença de inibidor foram controladas espectrofotometricamente pela absorvância de p-nitroanilida a 405 nm com um equipamento EL309 Microplate Autoreader (BIOT-TEK Instruments) fazendo-se registos com intervalos de 1 minuto.

Preparou-se fibrinogénico (humano) marcado com ^{125}I conforme descrito por Knight et al., Thromb. Haemostas (Stuttgart) 46, 1981, 593-596. Misturou-se fibrinogénico (5 mg) em 5 ml de Tris-HCl 50mM, NaCl 0,1M, e citrato de sódio 0,025M, pH 7,9, com 500 ui de Na^{125}I (New England Nuclear, Boston, MA) com 5 ul de veículo NaI a 0,045% num tubo de plástico para cultura e arrefeceu-se sobre gelo. Para se iniciar a reacção transferiu-se a mistura para um tubo arrefecido com 100 ug de iodogénico e agitou-se suavemente em banho de gelo durante 1 hora. Para interromper a reacção de radioiodação faz-se a decantação da solução proteica para o interior de um tubo de plástico para cultura para separar o iodogénico dos reagentes. Depois adiciona-se à amostra BSA (5 mg) e a seguir fracciona-se a solução numa coluna de 0,5 x 12 ml de Biogel P-2 equilibrada com Tris-HCl 0,05M e NaCl 0,1M, pH 7,9, para separar qualquer ^{125}I livre do fibrinogénico que marcado com ^{125}I . A radioactividade específica é de $1,9 \times 10^8$ dpm/mg.

O ensaio fibrinogenolítico baseou-se na capacidade da hementina (S.M. Malinconico, et al., J. Lab. Clin. Med., 103, 1984, 44-58), em fracções cromatográficas para degradar o fibrinogénico marcado com ^{125}I para originar peptidos marcados com ^{125}I solúveis em ácido tricloroacético. Neste ensaio fez-se a incubação de 100 ul das fracções cromatográficas de DEAE-5PW com 50 ug de fibrinogénico marcado com ^{125}I em 227 ul de Tris-HCl 50mM e NaCl 0,1M, pH 7,9; ajustou-se a mostra para 10mM em CaCl_2 e depois incubou-se durante a noite a 37°C . Adicionou-se 100 ul de BSA (3 mg/ml) em tampão de incubação seguindo-se a adição de 427ul de ácido tricloroacético a 20% (TCA) arrefecido com gelo. As amostras foram colocadas sobre

gelo durante 2 horas, submeteram-se a centrifugação e determinou-se a radioactividade nos grânulos e nos sobrenadantes fazendo a contagem de raios gama. Exprime-se a actividade fibrinogenolítica pela proporção entre a contagem feita para a composição solúvel em TCA e a contagem feita para a composição insolúvel em TCA (TCA sol/TCA ppt).

Preparação de Extracto de Glândulas Salivares. Fez-se a maceração de glândulas salivares de H. ghilianii, correspondentes a 50 unidades de actividade de hementina (49 unidades/mg de proteína) (S.M. Malinconico et al., J. Lab. Clin. Med., 103, 1984, 44-58) com uma vareta de vidro num balão de vidro de 3ml Reactiv-Vial (Pierce Chemical Co.) contendo 2ml de HEPES 20mM, pH7,8 (tampão de extracção). Colocou-se o balão sobre gelo e submeteu-se o seu conteúdo a uma ponta de uma microsonda de ultra-sons (Branson Sonic Power Supply) com impulsos de potência com duração de 30 segundos utilizando uma taxa de ocupação do ciclo de 30% e o nível 3 de potência. Submeteu-se o balão a centrifugação durante 5 minutos a 3750 rpm, recolheu-se o sobrenadante e depois submeteu-se a nova centrifugação a 8500 rpm num centrífugador de bancada de Eppendorf. Com o agregado do primeiro passo de centrifugação fez-se nova suspensão em 2ml de tampão de extracção e repetiu-se o procedimento anterior. Os sobrenadantes resultantes das duas extracções por ultra-sons foram depois combinados e utilizados imediatamente para purificação.

Preparação de FX_a de Bovino em Matriz de Afinidade sobre Affi-Gel-15

Fez-se o acoplamento de FX_a de bovino a Affi-Gel-15 por

incubação de 2 mg de enzima purificada em 2 ml de ácido 4-morfolino-propano-sulfónico (MOPS), pH 7,5 (tampão de acoplamento) com 2,5 ml de resina a 4°C durante a noite. Procedeu-se à lavagem intensa das pérolas e depois fez-se nova suspensão em 3 ml de tampão de acoplamento. Seguidamente, fez-se reagir novamente as pérolas com 0,3 ml de etanolamina 1 M, pH 8,0 durante a noite, à temperatura de 4°C, depois lavou-se intensamente com HEPES 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5, contendo 0,1% de Tween 20.

Purificação do Anticoagulante de FX_a. Fez-se a aplicação de extracto de glândulas salivares contendo 4 mg de proteína solúvel em 4 ml de tampão de extracção, sobre uma coluna de permuta aniónica de DEAE-5PW (Waters Associates) (0,46 x 7,5 cm) equilibrada com HEPES 20 mM, pH 7,8 (tampão A). Depois procedeu-se à eluição das proteínas com gradiente linear de NaCl variando desde 100% de tampão A (condições iniciais) até 100% de tampão B (tampão A contendo NaCl 0,5 M) durante 60 minutos. O caudal foi de 1 ml/minuto. Procedeu-se à combinação das fracções de eluição entre NaCl 0,1 M e NaCl 0,20 M contendo simultaneamente actividade anticoagulante e actividade anti FX_a (ver fig. 2), diluiu-se com tampão A para se obter uma condutividade ≤ 10 mS/cm e depois aplicou-se a uma coluna de heparina-agarose de 0,5 x 5 cm (Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc.). Na figura 3 apresentam-se os resultados da purificação adicional das fracções de DEAE com princípio activo anticoagulante, sobre heparina-agarose. Lavou-se intensamente a coluna com tampão A e depois fez-se a eluição com gradiente salino linear; o gradiente variou entre 100% de tampão A e 100% de tampão B (tampão A + NaCl 1 M), durante 75 minutos.

O caudal foi de 1 ml/minuto. Em algumas aplicações recuperou-se o princípio activo anti-FX_a fraccionando as proteínas sobre uma coluna de FX_a de bovino em Affi-Gel-15 (figura 4). Os extractos brutos ou as fracções cromatográficas com actividade anticoagulante foram ajustados com Tween 20 a 0,1% e procedeu-se ao fraccionamento por cromatografia de afinidade numa coluna com um volume do leito de 2 ml de FX_a de bovino em Affi-Gel-15. Lavou-se intensamente a coluna com HEPES 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5, contendo 0,1% de Tween 20 e procedeu-se à eluição das proteínas com HEPES 0,05 M, Tween 20 a 0,1%, pH 7,5, contendo benzamidina 0,1 M. Os ensaios de coagulação e amidolíticos foram efectuados sobre diluições a 1/500 das fracções recolhidas. Elui-se a coluna com um caudal de 4 ml/hora. O fraccionamento final dos princípios activos anticoagulantes e amidolíticos efectuou-se numa coluna de fase inversa C-18 Aquapore RP-300 de 2,1 x 30 ml, utilizando-se o sistema de separação de proteínas/peptidos Applied Biosystems Model 130. Procedeu-se à eluição das proteínas com gradiente linear de acetonitrilo; o gradiente variou desde 100% de tampão A (0,1% de ácido trifluoroacético em H₂O até 100% de tampão B (0,07% de ácido trifluoroacético/ 70% acetonitrilo/ 29,93% de H₂O), durante 40 minutos. Durante a noite procedeu-se à secagem das fracções (ver figura 5) que continham a proteína, num sistema de vazio rápido Savant. Dissolveu-se novamente as amostras em ácido trifluoroacético a 0,1% em H₂O e fez-se a análise de diversas alíquotas através da micro-sequenciação em fase gasosa por electroforese em gel de poliacrilamida/SDS, procedeu-se à análise de aminoácidos e à pesquisa dos princípios activos

anticoagulantes e amidolíticos.

Electroforese Analítica em Gel de Poliacrilamida

Colocou-se numa unidade de electroforese Mighty Small (Hoefer Scientific Co.) geles de poliacrilamida (8 x 8 cm e 1 mm de espessura) a 20% e a 12% em acrilamida contendo 3% de gel de filtração e foram submetidos a uma corrente constante de 10 mA/gel. Os geles continham Tris-HCl 0,25 M a pH 9,0 e 0,1% de dodecilsulfato de sódio (SDS). Efectuou-se a electroforese em Tris-HCl 25 mM, em glicina 0,2 M e em SDS a 0,1%, pH 8,4. As amostras secas foram dissolvidas em 35 µl de Tris-HCl 10 mM a pH 6,8, em SDS a 1%, em sacarose a 20%, em EDTA 1 mM em ureia 6 M, em 2-mercapto-etanol a 1% e em azul de bromofenol a 0,03%; antes da electroforese as amostras foram aquecidas a 60°C durante 15 minutos. Os geles foram fixados e as proteínas detectadas por coloração com prata de acordo com o procedimento de Merrill et al., Anal. Biochem., 105, 1980, 361. Os pesos moleculares aparentes das proteínas foram determinados por extrapolação a partir do gráfico dos logaritmos dos pesos moleculares em função da mobilidade electroforética das proteínas padrão. As proteínas padrão utilizadas foram fosforilase B (94 000), albumina do soro de bovino (67 000), ovalbumina (43 000), anidrase carbónica (30 000), α -quimotripsinogénico (25 700), inibidor de tripsina de soja (20 000), β -lactoglobulina (18 400), α -lactalbumina (14 400), lisozima (14 300), inibidor de tripsina de bovino (6 200) e insulina (3 000).

Análise de Sequências. Realizou-se um conjunto de degradações automáticas Edman num sequenciador de proteínas-peptidos modelo 470A (Applied Biosystems, Inc.) com reagentes, instruções

e programas normalizados, fornecidos pelo fabricante. Os amino-ácidos modificados por fenil-tio-hidatoína foram analisados em cada ciclo num analisador modelo 120 PHT (Applied Biosystems, Inc.) directamente em série com um sequenciador de fase gasosa do modelo 470A.

Análise de Aminoácidos. Microprovetas do amostrador automático (Hewlett Packard) utilizadas com tubos de hidrólise, foram submetidas à acção de ultra-sons em metanol e depois aqueceu-se numa estufa a 500°C durante 4 horas. Procedeu-se à hidrólise dos peptidos por hidrólise em fase gasosa num equipamento Picotag Workstation (Waters Associates) a 105°C durante 20 horas com 200 µl de HCl em ebulição constante (Pierce Chemical Co.) contendo alguns microlitros de fenol liquefeito (MCB). As amostras hidrolizadas foram submetidas a secagem num concentrador de vazio rápido "speed vac" (Savant), procedeu-se à sua dissolução num pequeno volume (tipicamente 15-30 µl) de HCl 0,1 N e procedeu-se à colocação num amostrador automático modelo 1090 da HPLC (Hewlett Packard). Realizou-se a análise de amino-ácidos utilizando o analisador Aminoquant da Hewlett Packard na sua configuração de alta sensibilidade (detecção por fluorescência). Efectuou-se a determinação dos aminoácidos após modificação numa coluna prévia, primeiro com O-ftaldeído (OPA) para os aminoácidos primários e depois com cloroformato de 9-fluorenil-metilo (FMOC) para os aminoácidos secundários. Os amino-ácidos modificados foram separados por HPLC de fase inversa utilizando colunas, reagentes e instruções fornecidos pelo fabricante. Este sistema quantifica com exactidão 1-500 pmoles de massa aminoacilo.

4.

A Figura 1 mostra a actividade anti-FX_a nos extractos brutos de glândulas salivares de H. ghiliani. O princípio activo inibe simultaneamente o factor FX_a de bovino e humano (ver a inserção), mas não inibe as trombinas de bovino e de seres humanos (dados não apresentados).

A Figura 2 mostra a cromatografia de 4 mg de extracto de proteínas solúveis por permuta aniónica sobre DEAE. Os princípios activos anticoagulantes e inibidor de FX_a eluem conjuntamente entre NaCl 0,1 M e NaCl 0,16 M (painel A) para as fracções 30-35. O princípio activo fibrinogenolítico, sem princípio activo anti-FX_a, elui para uma concentração superior a NaCl 0,20 M (painel B) para as fracções 37-44 (área tracejada). Este material proporcionou lises de coágulos (fibrina), degradou fibrinogénio marcado com ¹²⁵I (figura 2, painel B) e verificou-se que degradava as cadeias, α , β e γ de fibrinogénio purificado pelo ensaio SDS-PAGE (resultados não apresentados). A acção fibrinogenolítica desta fracção é atribuída à hementina. Além disso, as fracções com princípio activo anti-FX_a não demonstraram qualquer actividade fibrinogenolítica. Tomando como base os resultados das Figuras 1 e 2, o inibidor cuja eluição ocorre entre NaCl 0,1 M e NaCl 0,16 M não é devido à hirudina de Hirudo medicinalis (J. Dodt, et al., Biol Chem. Hoppe-Seyler, 366, 1985, 379-385) ou à hementina, o componente fibrinogenolítico da Haementeria ghiliani (S.M. Malinconico, et al., J. Lab. Clin. Med., 103, 1984 44-58). Conforme se mostra na Figura 2, 25 μ l das fracções que possuem actividades de pico prolongaram o tempo de formação da protrombina 16 segundos e inibiram completamente 17 ng de FX_a no ensaio amidolítico. Tomando como

os ensaios do extracto fraccionado em DEAE, a actividade inibidora de FX_a é responsável pela principal actividade anticoagulante.

As fracções anticoagulantes possuindo actividade anti- FX_a obtidas a partir da coluna DEAE foram reunidas e depois fraccionadas por cromatografia em heparina-agarose (figura 3). Os princípios activos amidolíticos anticoagulantes e anti- FX_a eluíram conjuntamente para valores de concentração de NaCl entre 0,45 M e 0,55 M. Além disso, 25 μl de fracções que apresentaram actividade anticoagulante de pico prolongaram 17 segundos aproximadamente o tempo de formação da protrombina e inibiram completamente a hidrólise de substracto cromogénico, provocada por 16 ng de FX_a purificado.

Na Figura 4 apresenta-se o fraccionamento dos princípios activos anticoagulantes/anti- FX_a por cromatografia de afinidade de FX_a sobre Affi-Gel-15. Conforme se indica, os princípios activos anticoagulante e anti- FX_a foram eluídos em conjunto a partir da coluna com benzamidina 0,1 M, um inibidor de serina-protease de sítio activo reversível.

Na Figura 5 mostra-se o fraccionamento adicional do inibidor por HPLC de fase inversa. Conforme se pode observar, fez-se a resolução de quatro picos secundários e de dois picos principais com princípio activo anticoagulante distribuído ao longo do multiplete de picos. Novo fraccionamento proporcionou seis picos discretos designados por P_0 - P_5 (ver inserção). De entre estes, P_4 e P_5 demonstraram as principais actividades anticoagulantes e anti FX_a , apresentando os picos P_1 - P_3 actividade ligeiramente inferior. Não se detectou qualquer actividade

para P_0 .

O ensaio SDS-PAGE (acrilamida a 20%) das fracções P_0 - P_5 confirmou que estas proteínas possuem mobilidades idênticas com pesos moleculares aparentes de aproximadamente 18 000 (dados não apresentados). A Figura 6 representa o perfil cromatográfico de P_5 em HPLC de fase inversa microporosa. A inserção representa uma preparação de P_5 em SDS-PAGE a 12% (12% de acrilamida). Este componente puro possui um peso molecular aparente de 18 000, isto é, o peso molecular aparente do inibidor de FX_a purificado não varia significativamente com a concentração de gel de poliacrilamida entre 12 e 20%, sugerindo que não é altamente glicosilado.

A Figura 7 representa um gráfico de inibição de FX_a dependente da dose de P_5 . A concentração de P_5 que proporciona metade da inibição máxima é 60 picomolar.

No Quadro I apresentam-se composições de aminoácidos das fracções P_0 - P_5 . Os teores de aminoácidos das fracções P_1 - P_5 apresentaram-se bastante semelhantes relativamente à maioria dos resíduos com excepção da fracção P_4 e da fracção P_5 que apresentaram resíduos Asx e Glx ligeiramente superiores e resíduos Lys e Pro significativamente superiores. A fracção P_0 diferiu significativamente das fracções P_1 - P_5 e o seu teor em Asx, Glx, Thr, Arg, Val, Met, Ile, Lys e Pro. A menor actividade de P_1 , P_2 e P_3 está possivelmente associada com o teor significativamente menor de Lys e de Pro. A semelhança global na composição, com excepção dos resíduos Lys e Pro, sugere que as fracções P_1 - P_5 representam proteínas de sequências relacionadas.

4.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURASFigura 1.

Inibição de FX_a feita por extracto bruto de glândulas salivares de Haementeria ghilianii. Adicionou-se aproximadamente 11 μ g de extracto de glândulas salivares (proteína solúvel) a 16 ng de FX_a purificado. Incubou-se a amostra durante 10 minutos à temperatura ambiente e determinou-se a actividade amidolítica após a adição de acetato de metoxi-carbonil-D-ciclo-hexil-glicil-glicil-arginina-p-nitroanilida; espectrofotometricamente fez-se o controlo de formação de p-nitroanilido com registos a 405 nm com intervalos de 1 minuto. Curva superior: FX_a de bovino e substrato cromogénico; curva inferior : FX_a de bovino, extracto de glândulas salivares e substrato cromogénico. Inserção: (curva superior) FX_a de seres humanos e substrato cromogénico: (curva inferior) FX_a de seres humanos, extracto de glândulas salivares e substrato cromogénico. O extracto de glândulas salivares de H. ghilianii não inibe a hidrólise de acetato de H-D-hexa-hidro-tirosil-L-alanil-L-arginina-p-nitroanilida provocadas pelas trombinas de bovinos e de seres humanos (dados não apresentados).

Figura 2. Fraccionamento de extracto bruto de glândulas salivares (4 mg de proteína solúvel) em coluna de permuta aniónica de DEAE de 0,46 x 7,5 cm. Procedeu-se à eluição das proteínas com gradiente linear de NaCl em HEPES 20mM, pH 7,8 (ver os métodos para os pormenores). O caudal foi de 1 ml/minuto e recolheram-se fracções de 1 ml. Painel A: Determinou-se a actividade anticoagulante (círculos em branco) através de um ensaio de coagulação num só passo prolongando o tempo de formação de



protrombrina. Mediu-se a inibição de FX_a a 405 nm através da inibição de formação de p-nitroanilida (quadrados em branco) utilizando o substrato cromogénico de acetato de metoxi-carbonil-D-ciclo-hexil-glicil-glicil-arginina-p-nitroanilida. Painel B: Este painel representa o perfil de eluição de proteína de H. ghilianii determinado por absorção a 280 nm. A actividade fibrinogenolítica (também dita fibrinolítica) é representada pela área a tracejado. A eluição deste princípio activo não ocorre em simultâneo com a dos princípios activos anti- FX_a ou anticoagulantes principais.

Figura 3. Fraccionamento do inibidor de FX_a parcialmente purificado, por cromatografia em heparina-agarose. As fracções em DEAE de princípios activos anticoagulantes e anti- FX_a com eluição simultânea foram reunidas e carregadas numa coluna de 0,5 x 5 cm de heparina-agarose. Procedeu-se à eluição das proteínas com gradiente linear de NaCl variável até 1 M em HEPES 20 mM, pH 7,8. O caudal foi de 1 ml/minuto e recolheram-se fracções de 1 ml. Determinou-se a actividade anticoagulante (círculo em branco) através de um ensaio de coagulação num só passo prolongando o tempo de formação de protrombina. Mediu-se a eluição de FX_a a 405 nm através da inibição da formação de p-nitroanilida (quadrado em branco) utilizando o substrato cromogénico de acetato de metoxi-D-ciclo-hexil-glicil-glicil-arginina-p-nitroanilida.

Figura 4. Fraccionamento do inibidor FX_a por cromatografia de afinidade de FX_a de bovino sobre Affi-Gel-15. Procedeu-se à eluição das proteínas a partir da coluna com benzamidina 0,1 M. O caudal foi de 4 ml/hora e recolheram-se fracções de

1,2 ml; fez-se o ensaio dos princípios activos anticoagulante (círculos em branco) e anti-FX_a (círculos a cheio) das fracções cromatográficas com diluições a 1/500, conforme se descreveu antes.

Figura 5. Purificação do princípio anti FX_a de H. ghiliani; por HPLC de fase inversa. As fracções de pico com princípios activos anticoagulante e anti-FX_a de eluição simultânea foram fraccionadas por HPLC de fase inversa microporosa sobre uma coluna de 2,1 x 30 mm Aquapore RP-300. A área sombreada mostra a actividade anticoagulante distribuída através das fracções de pico. A inserção mostra a nova cromatografia da separação de fase inversa inicial na mesma coluna. Com a nova cromatografia obtêm-se picos discretos não sobrepostos. O princípio activo inibidor de FX_a principal encontrou-se nas fracções P₄ e P₅ (sombreado carregado); também se detectou actividade nas fracções P₁, P₂ e P₃ (sombreado ligeiro). Não se detectou qualquer princípio activo na fracção P₀ (não sombreada).

Figura 6. HPLC de fase inversa microporosa da fracção P₅.

Procedeu-se à determinação da absorvência a 214 nm para a proteína P₅ de H. ghiliani. A inserção mostra uma preparação de SDS-PAGE (acrilamida a 12%) da fracção P₅ isolada por HPLC de fase inversa microporosa. A pista a representa as proteínas de peso molecular normalizado e a pista b representa a proteína P₅ purificada. As proteínas foram detectadas por coloração com prata de acordo com o processo de Merrill et al.

Figura 7. Testou-se a capacidade de inibição de FX_a (0,15 ng) dependente da dose, de P₅ purificada, para as concen-

trações indicadas, através da sua capacidade para inibir a hidrólise do acetato de metoxi-carbonil-D-ciclo-hexil-glicil-glicil-arginina-p-nitroanilida. Fez-se a determinação da formação de p-nitroanilida a 405 nm.

QUADRO I

Análise dos aminoácidos^a das fracções P₀-P₅ obtidas a partir de extractos de glândulas salivares de Haementeria Ghilianii por HPLC de fase inversa microporosa

Amino-ácido	P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀
Asx	17	18	14	16	17	11
Glx	22	24	19	19	20	14
Ser	9	10	7	8	8	7
His	2	2	2	2	2	2
Gly	14	18	13	13	14	10
Thr	9	10	10	10	11	7
Ala	6	6	6	6	6	6
Arg	18	20	18	19	21	13
Tyr	6	6	6	6	6	5
Val	7	7	5	7	7	4
Met	5	5	5	5	5	3
Ile	8	8	7	7	8	5
Phe	4	4	3	4	4	3
Leu	9	9	10	11	1	9
Lys	12	14	7	5	6	4
Pro	17	16	6	6	6	3

^a Expressas em resíduos por mole de proteína. Os valores estão normalizados para um teor de Ala de 6 resíduos/mole.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para o isolamento de uma substância protei-
nácea possuindo actividade inibidora do Factor X_a a partir da
saliva da sanguessuga "Haementeria ghilianii", caracterizado pelo
facto:

a) de se submeter a saliva a um gradiente salino crescente numa
resina permutadora de iões aniônica e de se segregar a porção de
eluente que possui actividade inibidora do factor X_a ,

b) de se submeter as fracções isoladas da alínea a) a cromato-
grafia de afinidade baseada em heparina, Factor X_a , ou simulta-
neamente heparina e Factor X_a e de se segregar a porção que possui
actividade anticoagulante e amidolítica; e

c) de se submeter o isolado da alínea b) a cromatografia líqui-
da de pressão elevada e fase inversa e de se segregar a porção do

do eluente que possui a actividade inibidora do Factor X_a .

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a resina de permuta aniônica ser DEAE-celulose.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a resina de HPLC ser uma resina que contém um éster de N-succimidilo.

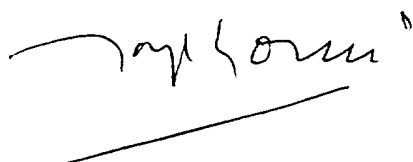
4.- Processo de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de a substância inibidora do Factor X_a essencialmente pura obtida possuir a capacidade para inibir no máximo metade do Factor X_a para uma concentração de 60 pM e por possuir um peso molecular compreendido entre 15.000 e 20.000 daltons.

5.- Processo para a inibição do Factor X_a , caracterizado pelo facto de se fazer reagir um meio que contém o factor X_a com uma quantidade eficaz de uma substância proteínica que possui actividade inibidora do Factor X_a preparada pelo processo de acordo com as reivindicações 1 a 3.

6.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se incorporar uma quantidade eficaz sob o ponto de vista anticoagulante de uma substância pro-

teínácea que possui actividade inibidora do Factor Xa, quando preparada de acordo com as reivindicações 1 a 3, em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável,

Lisboa, 14 de Junho de 1989
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

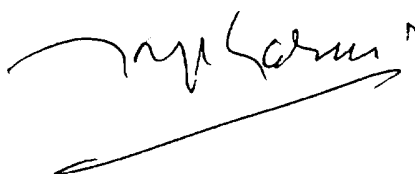


R E S U M O

"Processo para a extracção e purificação de um princípio anticoagulante a partir da sanguessuga sul-americana, "Haementeria Ghilianii""

A presente invenção refere-se ao isolamento de uma substância inibidora do Factor X_a a partir do extracto das glândulas salivares da sanguessuga "H. ghilianii". Submete-se o extracto a separação utilizando resinas de cromatografia de heparina/agaro-se e DEAE/celulose e eluindo com um gradiente salino crescente. Submete-se o extracto a cromatografia de afinidade utilizando Factor X_a ligado a uma resina Affi-Gel-15 eluindo com benzamidina que contém HEPES. A cromatografia de fase inversa proporciona vários péptidos ou proteínas purificados possuindo actividade inibidora do Factor X_a . Referem-se ainda as composições farmacêuticas que contêm os péptidos e proteínas anteriores.

Lisboa, 14 de Junho de 1989
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



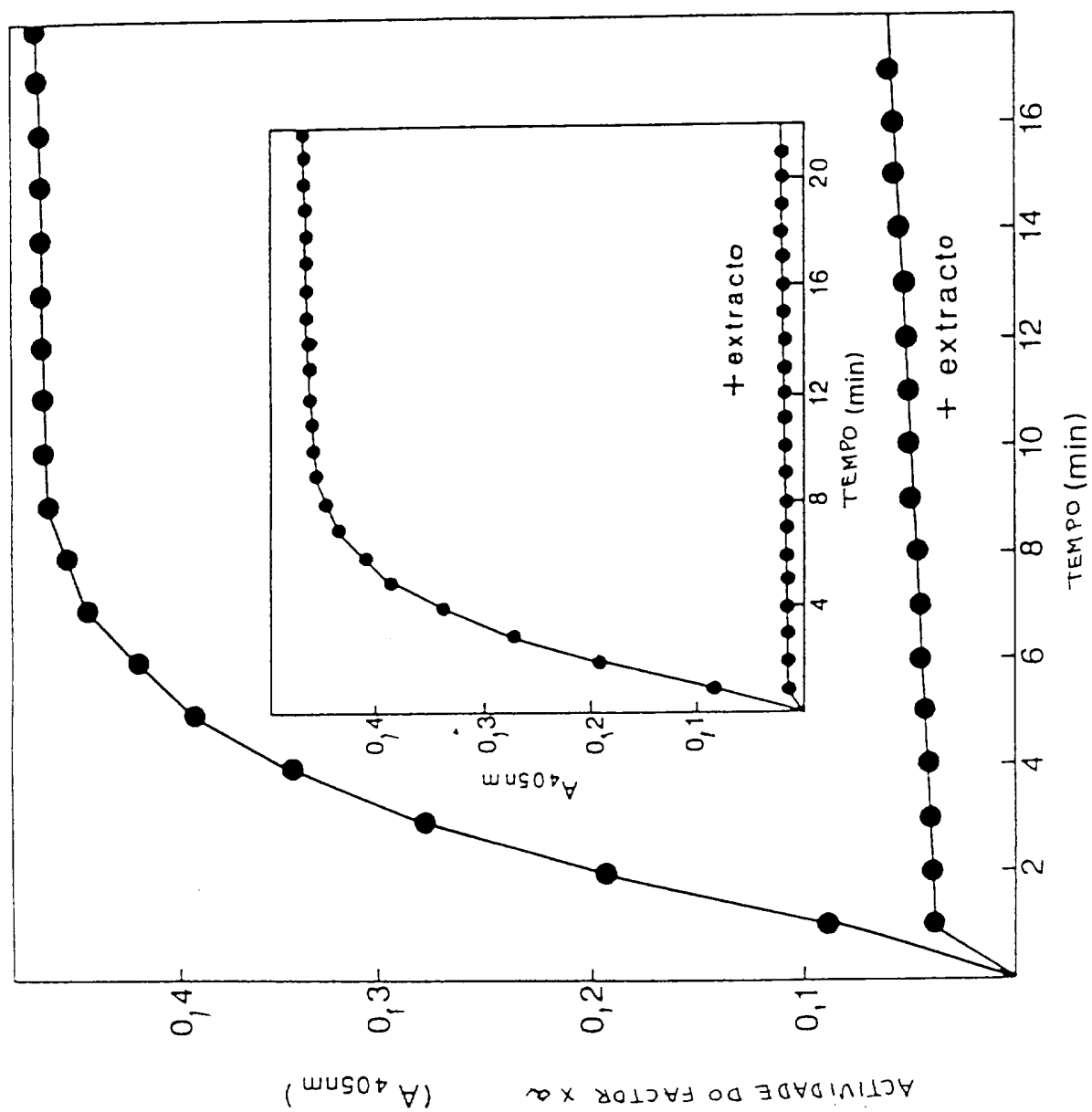


FIGURA 1

7.

4.

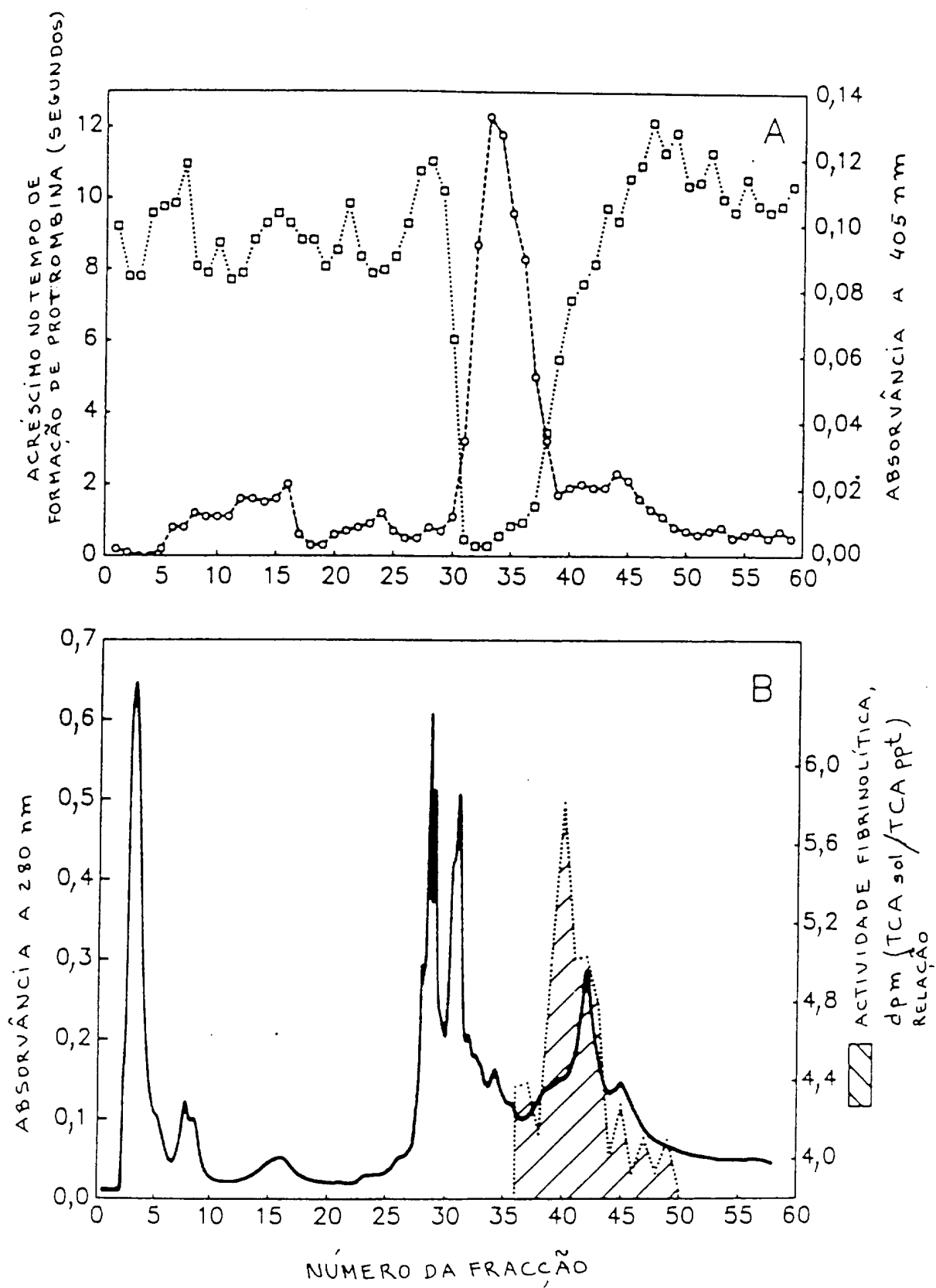


FIGURA 2

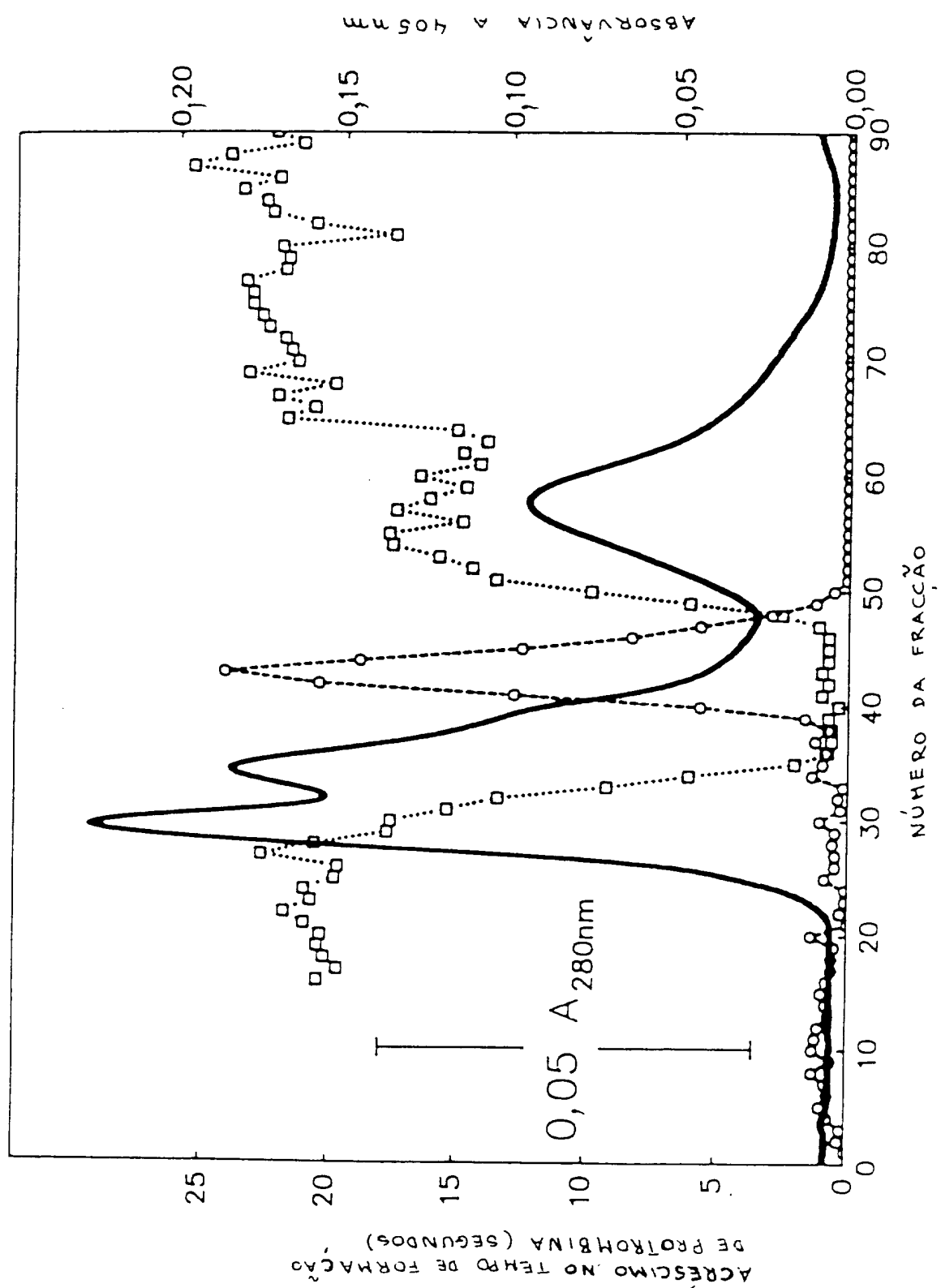


FIGURA 3

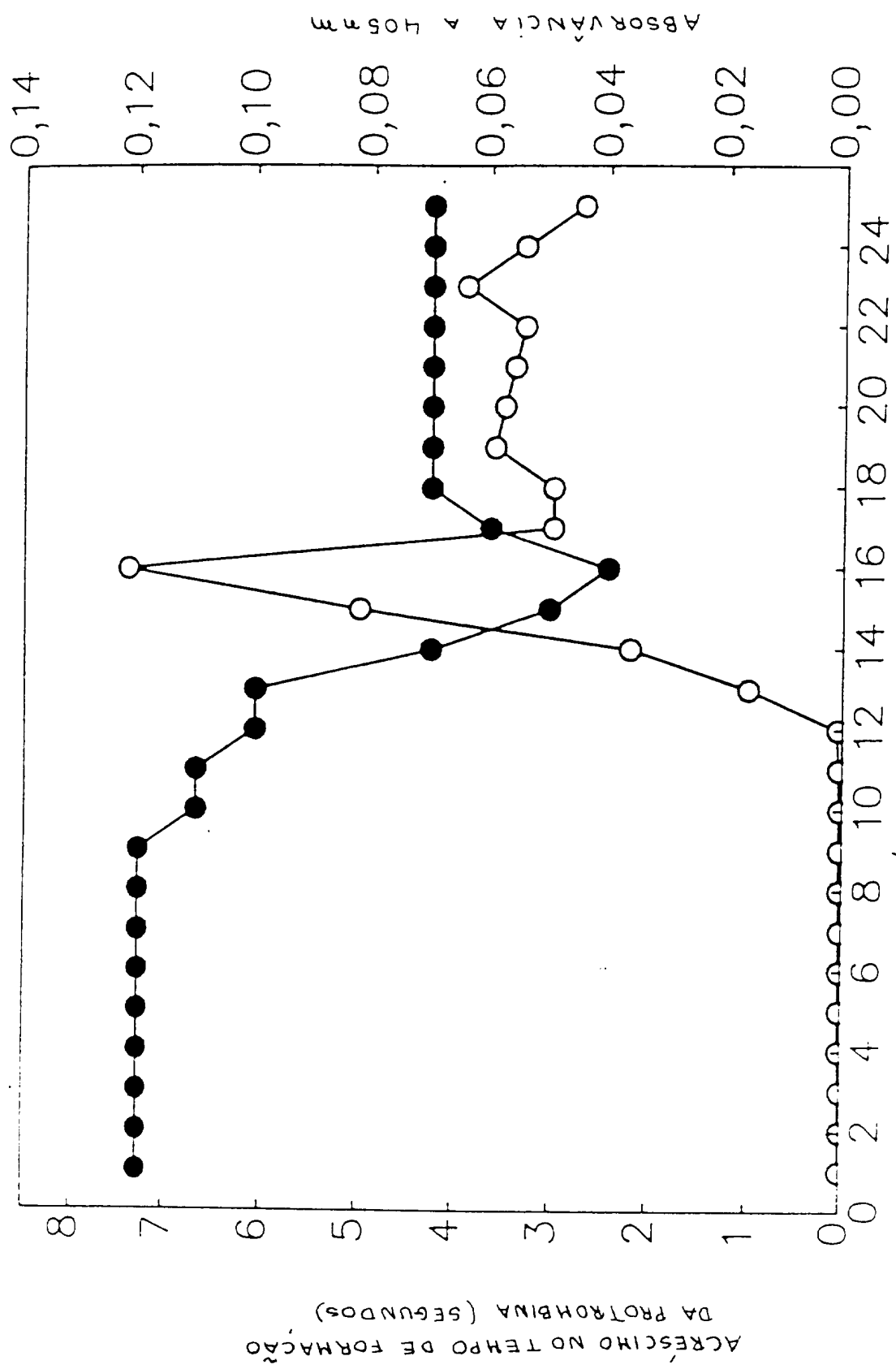
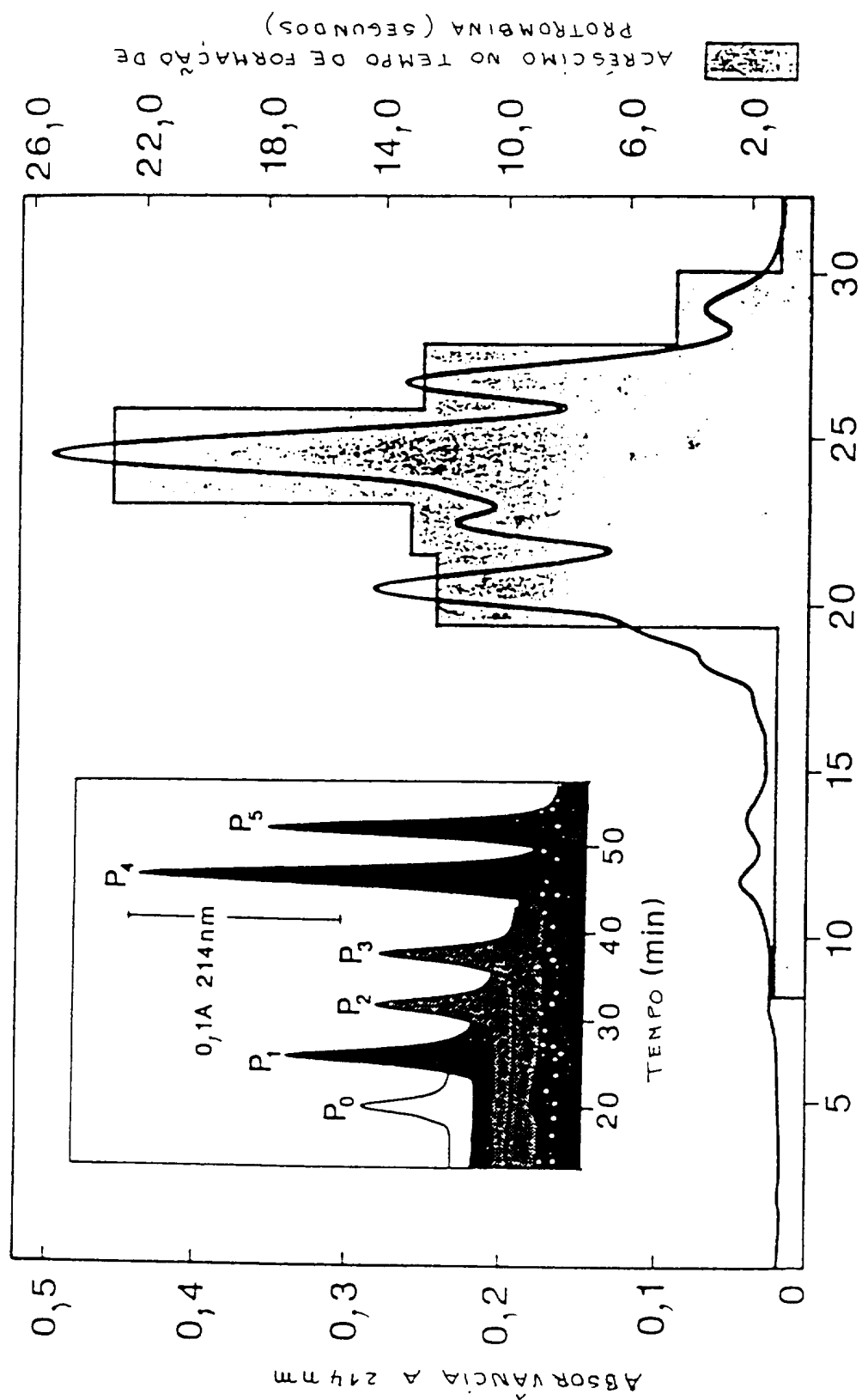


FIGURA 4
NÚMERO DA FRACÇÃO

7.



TEMPO (min)

FIGURA 5

5.

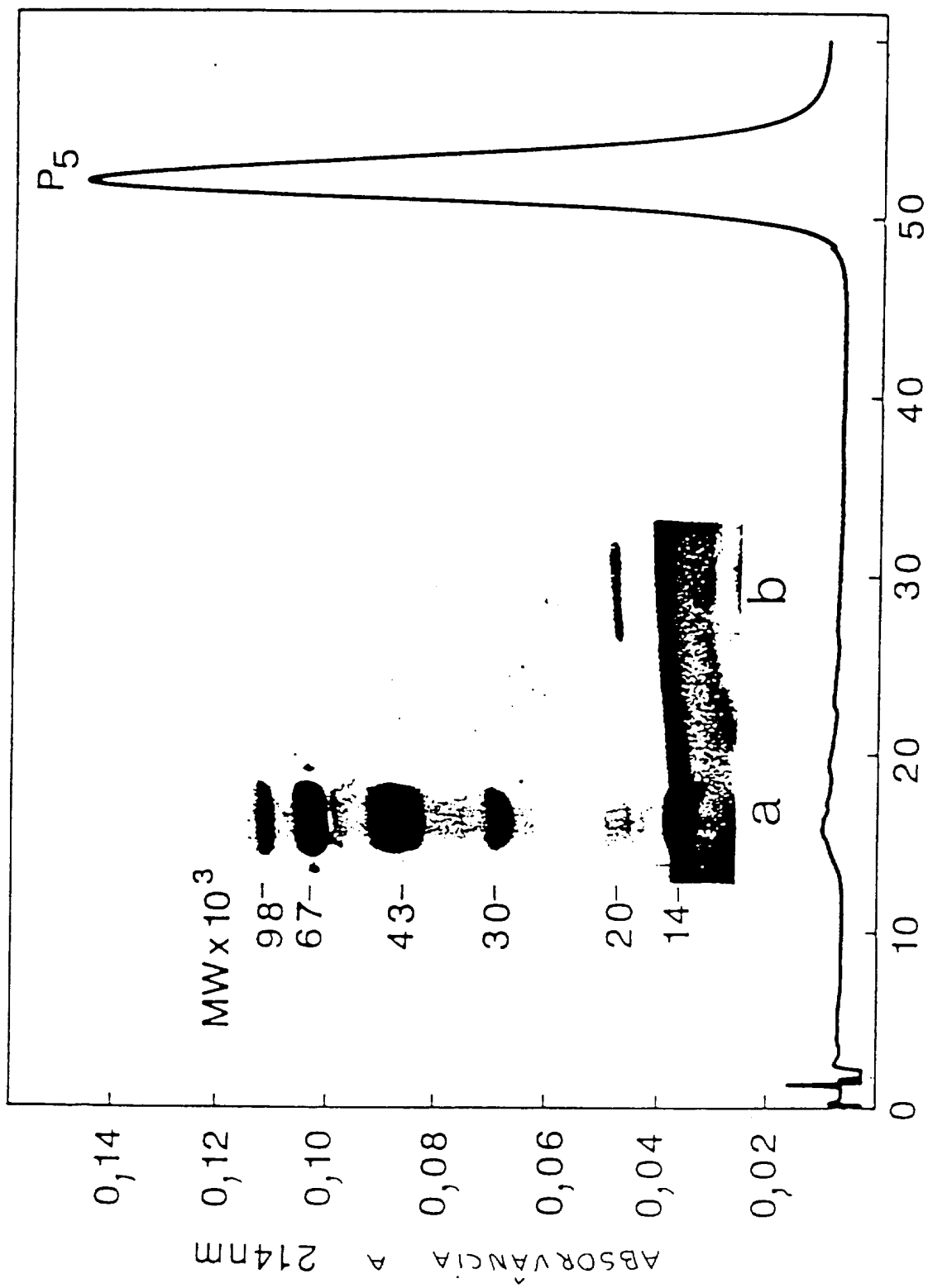


FIGURA 6

2

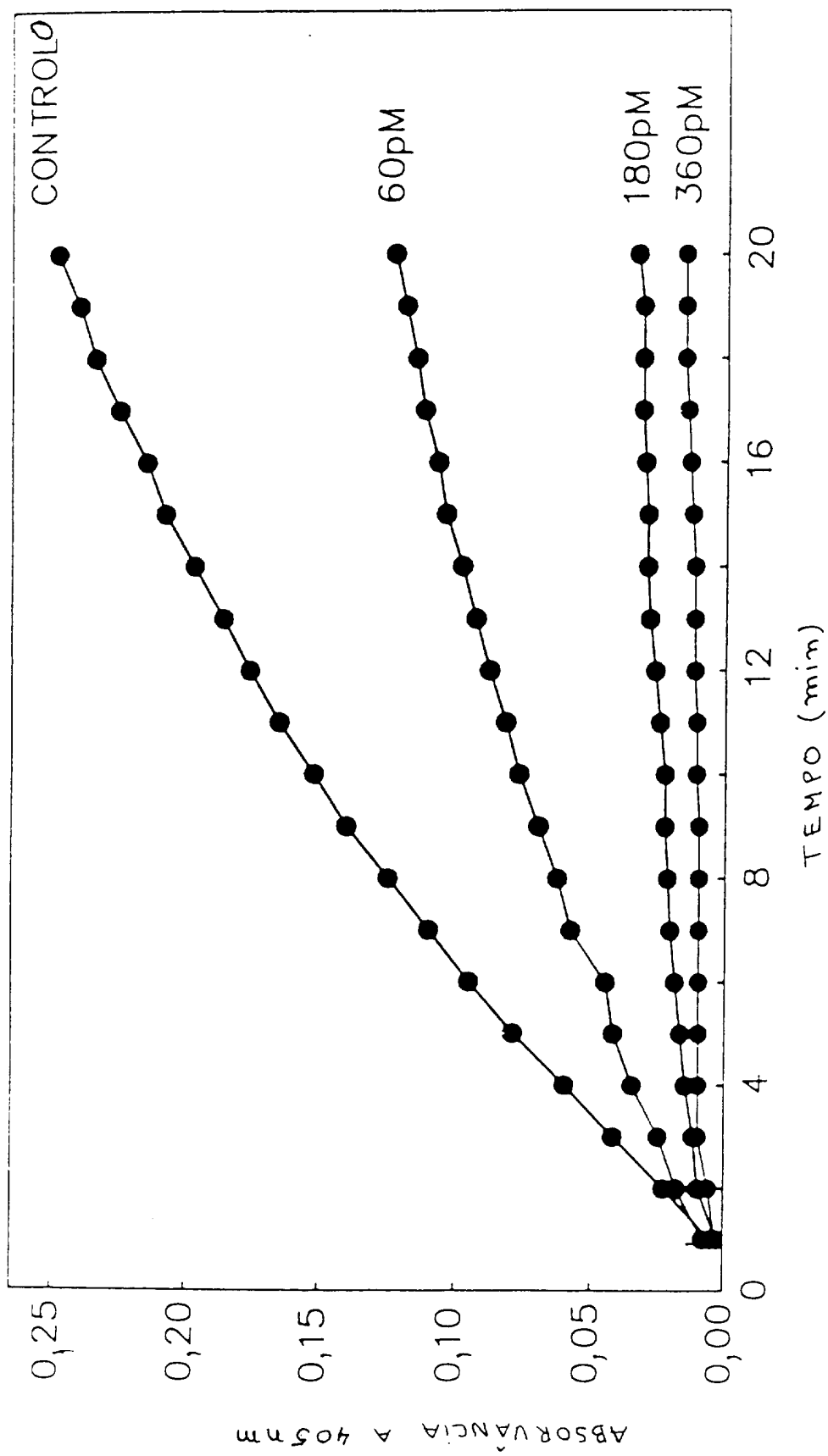


FIGURA 7

7.