



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 101813 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C07F009/117 A C07K009/00 B
A61K031/66 B

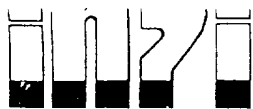
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1996.01.11	(73) <i>Titular(es):</i> INSTITUTO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL E TECNOLÓGICA APARTADO 12 2780 OEIRAS PT
(30) <i>Prioridade:</i>	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.08.29	(72) <i>Inventor(es):</i> HELENA SANTOS LÍGIA OLIVEIRA MARTINS LAURA DA SILVA CARRETO MILTON SIMÕES DA COSTA PT PT PT PT
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 09/98 1998.09.02	(74) <i>Mandatário(s):</i>

(54) *Epígrafe:* UTILIZAÇÃO DE FOSFATO DE DI-MANOSIL-DI-MIO-INOSITOL E DE FOSFATO DE 1,3-DI-MIO--INOSITOL NA TERMOESTABILIZAÇÃO, OSMOPROTECÇÃO E PROTECÇÃO CONTRA A DESIDRATAÇÃO DE COMPONENTES CELULARES E CÉLULAS

(57) *Resumo:*

PROCESSO BIOLÓGICO PARA A BIOLÓGICO PARA A BIOSÍNTESE DE DOIS SOLUTOS INTRACELULARES; FOSFATO DE DI-MANOSIL-DI-MIO-INOSITOL E FOSFATO DE 1,3-MIO-INOSITOL; THERMOTOGA MARÍTIMA E THERMOTOGA NEAPOLITANA; PROTECTOR DE MACROMOLÉCULAS



DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA
TEL. 388 51 51 / 2 / 3 LINHA AZUL 388 10 78
TELEFAX 38 53 08

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. ☒	MOD. UTIL. ☐	MOD. IND. ☐	DES. IND. ☐	TOP. SEMIC. ☐	Classificação Internacional (5)
N.º 101813 (11)					007 F 9 / 117 A 61 K 31 / 66
Data do pedido: 19/06/96 (22)					

Requerente(s) (71): (Nome e Morada)

Codigo Postal 21780 OEIRAS

Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET)

Qta. do Marquês - EAN - Apt. 12

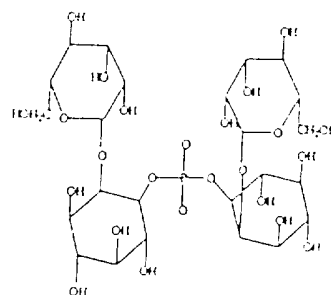
Inventores (72):

Helena Santos, Ligia Martins, Milton Simões da Costa e Laura da Silva Carreto

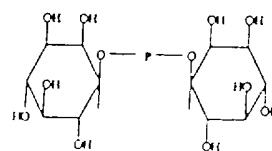
Reivindicação de prioridade(s) (30):

Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido

Figura (para interpretação do resumo)



Fosfato de di-manosil-di-mio-inositol



Fosfato de 1,3-di-mio-Inositol

Epigrafe: (54)

Utilização de fosfato de di-manosil-di-mio-inositol e de fosfato de 1,3'-di-mio-inositol na termoestabilização, osmoprotecção e protecção contra a desidratação de componentes celulares e células.

Resumo: (máx. 150 palavras) (57)

RESUMO

Esta invenção refere-se a um processo biológico para a biossíntese de dois solutos intracelulares identificados como fosfato de di-manosil-di-mio-inositol e fosfato de 1,3-di-mio-inositol. Foram identificados nas bactérias hipertermófilas *Thermotoga maritima* e *Thermotoga neapolitana* (T_{opt} de crescimento de 80°C), durante crescimento a temperaturas supra-óptimas em meio complexo. As condições ambientais necessárias à sua acumulação em concentrações elevadas indicam que estes novos solutos compatíveis possam exercer um efeito protector de macromoléculas (nomeadamente biocatalisadores) e células contra operações que envolvam aquecimento, secagem e/ou congelamento.

PAT. INV. ☒ MOD. UTIL. ☐ MOD. IND. ☐ DES. IND. ☐ TOP. SEMIC. ☐

Classificação Internacional (51)

N.º 101813 (1) DATA DO PEDIDO 96/06/96 (22)

Resumo (continuação) (57)

O fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e o fosfato de 1,3-di-*mio*-inositol podem ser utilizados em processos catalisados por enzimas a temperaturas elevadas ou quando estes operam na presença de desnaturantes químicos como detergentes, solventes orgânicos, agentes oxidantes ou agentes caotrópicos como ureia e cloreto de guanidina, com o intuito de estabilizar a sua actividade a curto e a longo prazo.

O fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e o fosfato de 1,3-di-*mio*-inositol podem também ser utilizados na estabilização de lipossomas e outros sistemas de membranas utilizados na microencapsulação de fármacos, e de outros compostos utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética, de detergentes e outras.

O fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e o fosfato de 1,3-di-*mio*-inositol podem ainda ser utilizados durante a secagem de proteínas e células inteiras para o seu transporte e conservação prolongada, e ainda como adjuvantes para a conservação por liofilização ou a temperaturas baixas de estirpes microbianas e linhas de células animais e vegetais, bem como de órgãos perfundidos.

DESCRIÇÃO

"Utilização de fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e de fosfato de 1,3'-di-*mio*-inositol na termoestabilização, osmoprotecção e protecção contra a desidratação de componentes celulares e células"

Vários solutos intracelulares de baixo peso molecular acumulam em níveis elevados em alguns microrganismos quando estes são sujeitos a condições ambientais extremas, nomeadamente de agressão osmótica. Estes solutos servem geralmente como osmólitos em organismos halotolerantes ou halofílicos (que toleram ou exigem meios com elevadas concentrações salinas, respectivamente), ou ainda como reservas de carbono e energia. Na célula, os osmólitos têm como função manter a pressão de turgescência e o volume celular, sem que a sua acumulação prejudique as estruturas e funcionamento celulares em condições de agressão osmótica. Praticamente todos os organismos halotolerantes ou halófilos até agora examinados acumulam ou iões inorgânicos (K^+ , Na^+ , Cl^-) ou solutos orgânicos. Estes, também designados por solutos compatíveis, incluem açúcares, aminoácidos e substâncias derivadas de aminoácidos, polióis e oligopeptídeos [1].

Para além de serem compatíveis com a actividade celular normal, os osmólitos sintetizados em condições de agressão ambiental exercem um efeito estabilizador acentuado sobre as macromoléculas constituintes celulares, nomeadamente nas proteínas. Tem sido constatado que os solutos compatíveis têm um efeito positivo quer na estabilização térmica das proteínas, quer na sua estabilização na presença de agentes desnaturantes, como detergentes, solventes orgânicos ou agentes caotrópicos - ureia e cloreto de guanidina. Vários estudos têm incidido sobre o mecanismo molecular envolvido na estabilização da estrutura de proteínas por diferentes solutos de baixo peso molecular, nomeadamente osmólitos [2,3,4].

A adição de compostos de baixo peso molecular a soluções contendo proteínas conduz a alterações das propriedades físicas da água, tendo como consequência um

aumento da sua tensão superficial e a exclusão desses compostos da interface água-proteína. Assim, a estrutura da água envolvida nas camadas de hidratação das proteínas fica num estado de elevada organização, o que gera uma situação termodinamicamente desfavorável e que conduz à minimização da área de interface água-proteína. A área superficial das proteínas globulares é menor no estado nativo do que no desnaturado, deslocando-se o equilíbrio proteína nativa $\rightleftharpoons$ desnaturada para a esquerda, do que resulta uma maior estabilização da estrutura nativa. Esta maior estabilização das proteínas, induzida pela presença de compostos de baixo peso molecular em solução aquosa, permite que biocatalisadores funcionem e catalisem reacções específicas em condições extremas de temperatura, pressão, força iónica, pH ou na presença de solventes orgânicos e detergentes. Esta capacidade estabilizante dos compostos compatíveis reveste-se da maior importância visto que uma das prioridades da biotecnologia moderna passa pela obtenção de biocatalisadores estáveis ou de agentes que estabilizem os biocatalisadores contra a inactivação térmica e química.

É também de salientar que os solutos compatíveis contrariam os efeitos prejudiciais provocados pela desidratação em proteínas [5], membranas celulares [6] e células [7,8]. Apesar da importância dos processos de secagem e congelação na conservação e armazenagem de amostras biológicas ocorrem sempre efeitos indesejáveis nestas operações, tais como a desnaturação de proteínas sensíveis ou o decréscimo na viabilidade de muitos tipos de células. A preservação de componentes celulares quando desidratados e/ou congelados tem grande importância em aplicações em medicina (conservação de tecidos e outros produtos de origem biológica), na indústria farmacêutica (microencapsulação de fármacos), cosmética (lipossomas), na indústria alimentar (conservação de alimentos) e em investigação científica (manutenção de colecções de culturas de microrganismos). Nos processos de desidratação de membranas celulares e células a remoção da água ligada aos grupos iónicos polares das bicamadas lipídicas, conduz a uma transição de fase dessas estruturas lipídicas. Após re-hidratação, as membranas secas sofrem uma transição de fase inversa, ocorrendo geralmente, defeitos que provocam rupturas em algumas regiões das membranas. A protecção exercida pelos solutos de baixo peso molecular

nas membranas celulares e células relaciona-se com o facto destes compostos substituírem a água (removida na secagem) entre as cabeças polares dos lípidos, promovendo a manutenção da mesma fase lipídica, mesmo quando estas estruturas se encontram desidratadas. Nos processos de desidratação de proteínas os compostos de baixo peso molecular exercem uma protecção através de um mecanismo de que resulta uma maior estabilização da estrutura nativa, análogo ao efeito de protecção exercido por solutos em proteínas, quando sujeitas a temperaturas elevadas ou à presença de agentes desnaturantes em solução aquosa. Assim, a integridade destas estruturas é mantida e a sua actividade normal recuperável numa maior extensão.

Foram identificados alguns solutos em bactérias e arqueobactérias hipertermófilas (temperatura mínima de crescimento de 70°C) que revelaram exercer funções de termoprotecção. Esta conclusão baseia-se essencialmente no facto de estes solutos se acumularem preferencialmente durante o crescimento a temperaturas supra-óptimas. Estão nestas condições os solutos fosfato de 1,1'-di-*mio*-inositol em *Pyrococcus furiosus* e 2,3'-ciclo-difosfoglicerato em *Methanothermus fervidus* [9,10].

Os compostos, objecto da presente invenção, fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e fosfato de 1,3'-di-*mio*-inositol podem ser obtidos por fermentação de duas bactérias hipertermófilas e halófilas *Thermotoga maritima* e *Thermotoga neapolitana*, à temperatura de 88°C (sendo a temperatura óptima de 80°C), utilizando um meio de crescimento [11] que contém em 1 litro de água destilada: 5g de amido, 0,5g de KH_2PO_4 , 20g de NaCl , 0,5g de extracto de levedura, 0,5g de cisteína-HCl, 2mg de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2mg de biotina, 20mM de tiosulfato, 15 ml de uma solução de oligoelementos (que contém em 1 litro de água destilada: 1,5g de ácido nitriloacético, 3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5g $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1g NaCl , 0,1g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,18g de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,18g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,02g de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,01g de H_3BO_3 , 0,01g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025g de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,3g de $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 250 ml de uma solução de água do mar (que contém em 1 litro de água destilada: 27,7g de NaCl , 7g de $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5,5g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,65g de KCl , 0,1g de NaBr (KBr), 30 mg de H_3BO_3 , 15 mg de $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de ácido cítrico, 0,05 mg de KI e 2,25 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). O meio foi acertado com uma solução de H_2SO_4 a pH 6,5. A

recuperação deste soluto é feita por extracção das células a 100°C com uma mistura de etanol:água a 80% [9].

O facto dos solutos apresentados nesta invenção, fosfato de di-manosil-di-mio-inositol e fosfato de 1,3'-di-mio-inositol, serem sintetizados por organismos hipertermófilos, e da sua concentração intracelular aumentar drasticamente a temperaturas de crescimento supraóptimas, torna estes novos solutos excelentes candidatos a agentes termoestabilizadores.

Os compostos da presente invenção podem ser utilizados na termostabilização de vários biocatalisadores com interesse industrial afectados por inactivação, diminuição de eficiência, a temperaturas de operação elevadas, tal como acontece na indústria dos detergentes, tratamento de pasta de papel, etapas nos processos de engenharia genética, etc.,.

Os compostos da presente invenção podem ser utilizados como protectores de biocatalisadores na presença de agentes desnaturantes como solventes orgânicos, detergentes, agentes oxidantes ou agentes caotrópicos, tais como ureia e cloreto de guanidina.

Estas utilizações podem ser confirmadas pela determinação de actividades enzimáticas de um determinado biocatalisador em função da temperatura e da concentração de agentes desnaturantes, na presença e na ausência destes solutos.

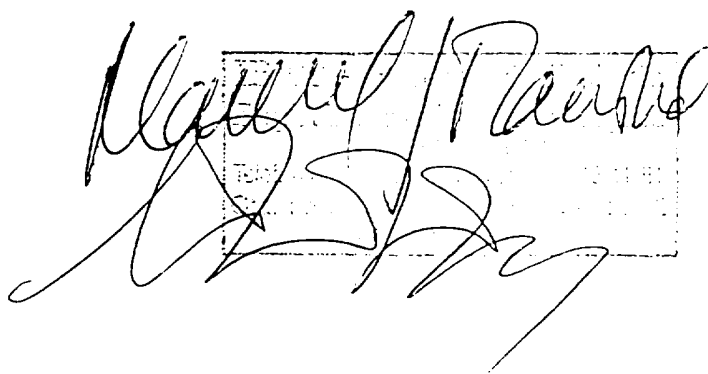
Os compostos da presente invenção podem ser utilizados como protectores contra os efeitos negativos durante a secagem e/ou congelamento de componentes celulares (como proteínas e biomembranas), lipossomas, células ou mesmo tecidos.

Esta utilização pode ser confirmada adicionando estes solutos aos componentes celulares ou células antes do processo de secagem e/ou congelação. Após re-hidratação e/ou descongelamento, avalia-se o grau de manutenção da conformação molecular (quando se trata de biocatalisadores ou biomembranas) ou da viabilidade celular (quando se trata da conservação de células).

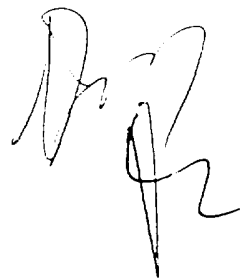
REFERÊNCIAS:

- [1] Brown, A.D. (1990). Microbial Water Stress Physiology - Principles and Perspectives. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- [2] Arakawa, T. and S.N. Timasheff (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.*, **47**: 411-414.
- [3] Arakawa, T. and S.N. Timasheff (1983). Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**: 169-177.
- [4] Arakawa, T. and S.N. Timasheff (1982). The stabilization of protein structure by sugars. *Biochem.*, **21**: 6536-6544.
- [5] Carpenter, J.F., Crowe, J.H. and T. Arakawa (1990). Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J. Dairy Sci.*, **73**: 3627-3636.
- [6] Rudolph, A.S., Crowe, J.H. and L.M. Crowe (1986). Effects of three stabilizing agents - proline, betaine, and trehalose - on membrane phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**: 134-143.
- [7] Louis, P., Truper, H.G. and E.A. Galinski (1994). Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 684-688.
- [8] Leslie, S.B., Teter, S.A., Crowe, L.M. and J.H. Crowe (1994). Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **1192**: 7-13.
- [9] Martins, L.O. and H Santos (1995) Accumulation of mannosylglycerate and di-myo-inositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3299-3303.
- [10] Hensel, R. and H. König (1988). Thermoadaptation of methanogenic bacteria by intracellular ion concentration. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**: 75-79.
- [11] Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, U.B. and K.O. Stetter (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch. Microbiol.* **144**: 324-333.

26-10.08

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcelo T. Pereira", is written over a rectangular stamp. The signature is fluid and cursive. The stamp is a rectangular box with a dotted border and contains some faint, illegible text.

REIVINDICAÇÕES



1

Processo novo que envolve a biossíntese de dois compostos novos de baixo peso-molecular, o fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e o fosfato de 1,3'-di-*mio*-inositol, pelas estirpes bacterianas *Thermotoga maritima* e *Thermotoga neapolitana* caracterizados como agentes termoestabilizadores sobre macromoléculas biológicas, uma vez que são produzidos por microrganismos hipertermófilos (T_{opt} de crescimento de 80°C) e são acumulados em concentrações crescentes a temperaturas de crescimento supra-óptimas.

2

Processo novo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto do fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e do fosfato de 1,3'-di-*mio*-inositol, quando adicionados a soluções contendo biocatalisadores permitirem a sua funcionalidade a temperaturas a que normalmente ocorreria a sua desnaturação e inoperacionalidade.

3

Processo novo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto do fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e do fosfato de 1,3'-di-*mio*-inositol quando adicionados a soluções contendo biocatalisadores permitirem a sua resistência a agentes desnaturantes como detergentes, solventes orgânicos, agentes oxidantes e outros.

4

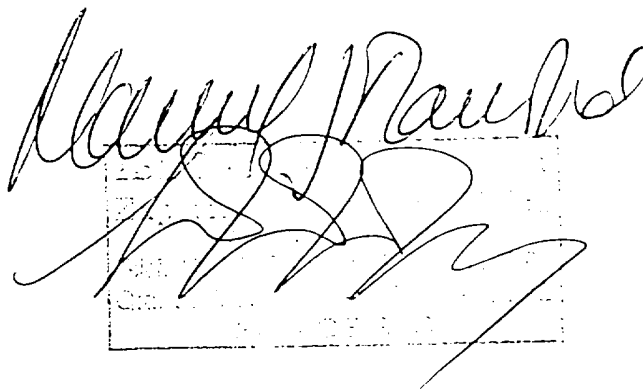
Processo novo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores caracterizado pelo facto dos dois novos compostos, o fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e o fosfato de 1,3'-di-*mio*-inositol, poderem ser utilizados para a conservação por liofilização e conservação a temperaturas baixas de proteínas, membranas lipídicas e de linhas de células microbianas, vegetais e animais, bem como de órgãos

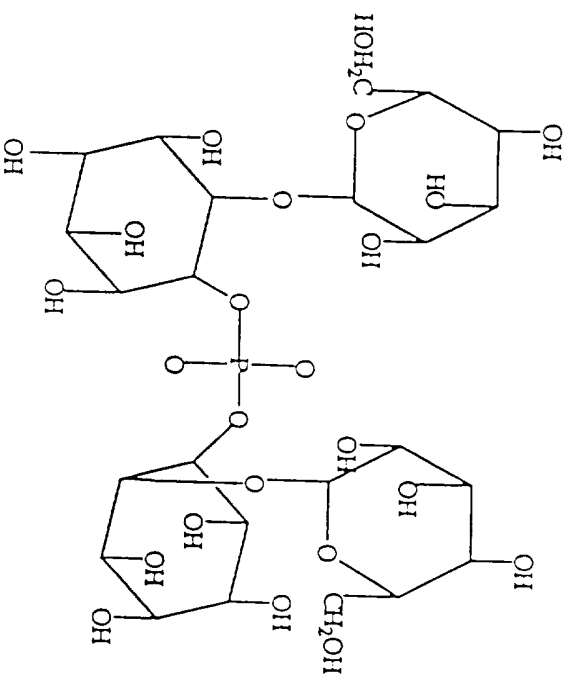
perfundidos, promovendo a manutenção da conformação nativa destas estruturas, compatível com a sua posterior utilização.

5

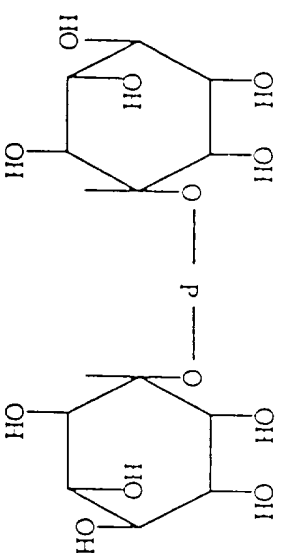
Processo novo de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado pela utilização de fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol e de fosfato de 1,3'-di-*mio*-inositol na estabilização de lipossomas e outros sistemas de membranas usados para microencapsulação de fármacos e de outros compostos com aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, de detergentes e outras.

96.10.08

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Daniel Naves', is written over a rectangular stamp. The stamp contains some faint, illegible text and a central emblem. The signature is written in a cursive, flowing style.



Fosfato de di-manosil-di-*mio*-inositol



Fosfato de 1,3'-di-*myo*-Inositol