

MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

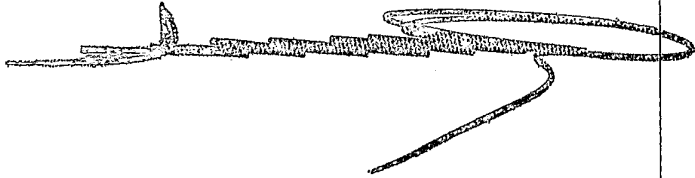
Nº 95 065

NOME: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE COMPONENTES GLICOPROTEICAS GALACTOSILADAS"

INVENTORES: Prof.Dr.Joachim Thiem e Torsten Wiemann, residentes na Alemanha Ocidental)

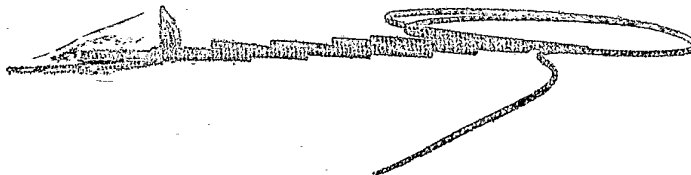
Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883. República Federal Alemã, 23 de Agosto de 1989, sob o nº P 39 27 801.8.



Descrição da patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã, (inventores: Prof. Dr. Joachim Thiem e Torsten Wiemann, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE COMPONENTES GLICOPROTEICAS GALACTOSILADAS"

Descrição

As glicoproteínas desempenham um papel central nos processos biológicos de reconhecimento, tais como na génese tumoral, nas infecções bacterianas e virais, no reconhecimento célula-célula, no crescimento celular e na diferenciação celular. Constituem a base da classificação dos grupos sanguíneos e são responsáveis pela internalização de diferentes compostos macro-moleculares e medicamentos. Um importante campo de utilização das glicoproteínas e, portanto, por exemplo a direcção selectiva de fármacos contra os órgãos em objectivo, bem como a protecção de medicamentos contra a catabolização proteolítica (N. Sharon, H. Lis, Chem. Eng. News 59 (13) (1981) 21; H. Schachter, Clinica Biochemistry 17, (1984) 3).



Consoante o tipo de ligação entre o componente peptídica e a componente de hidrato de carbono, as glicoproteínas são divididas em glicoproteínas O-glicosídicas e N-glicosídicas. Estas últimas apresentam como unidade central de ligação quase exclusivamente uma ligação de N-acetilglucosamina com asparagina. No contexto das funções das glicoproteínas anteriormente referidas, a síntese de aspartil-N-acetilglucosaminas glicosiladas detem uma importância especial.

A síntese de tais componentes glicoproteicas com enzimas que seguem *in vitro* a via da biosíntese de tais substâncias tem a vantagem da elevada estereoselectividade e selectividade regional, bem como de evitar o recurso a uma dispendiosa química de grupos de protecção, assegurando-se assim na maior parte dos casos um bom rendimento em comparação com a síntese química composta por numerosos passos.

A galactosil-transferase (EC 2.4.1.22) transfere a galactose para a N-acetilglucosamina de forma estereo e regionalmente específica, formando-se uma ligação $\beta(1 \rightarrow 4)$. Substratos naturais da galactosil-transferase são a glucose, que no entanto apenas é aceite pelo enzima na presença de α -lactalbumina, bem como N-glicoproteínas com N-acetilglucosamina no final da molécula.

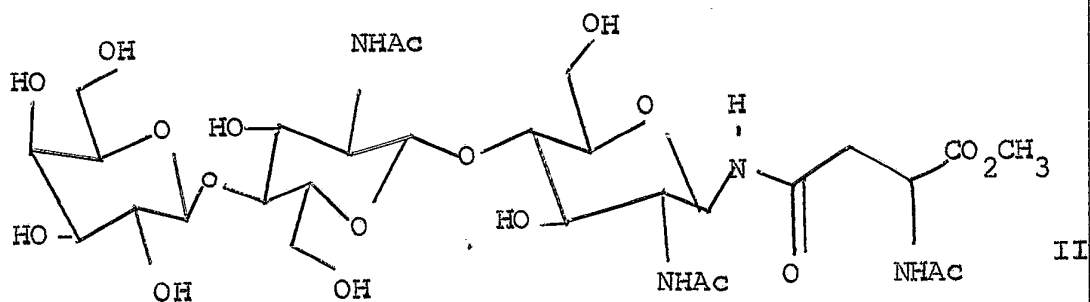
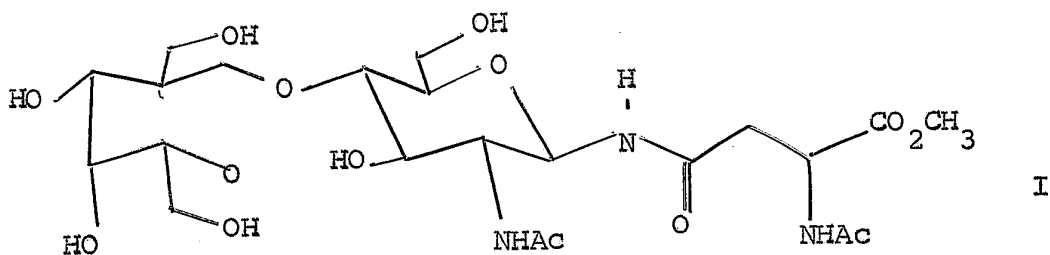
Reacções do enzima com substratos não naturais são descritas nas seguintes publicações:

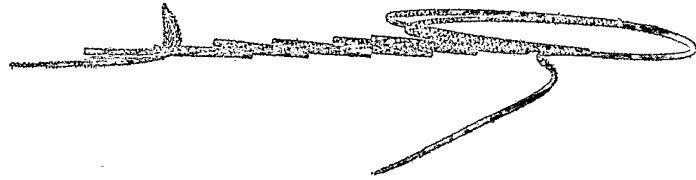
1. H.A: Nunez, R. Barker : Biochemistry 19, 489 (1980)
2. J. Thiem, W. Treder, T. Wiemann : Dechema Biotechnologi Conferences, Vol. 2, 189 (1988); Editor: D. Behrens, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim
3. C. Augé, S. David, C. Mathieu, G. Gautheron: Tetrahedron Lett. 25, 1467 (1984)
4. U. Zehavi, M. Herchman: Carbohidr. Res. 128, 160 (1984)

5. U. Zehavi, S. Sadeh, M. Herchman: Carbohydr. Res. 124 23 (1983)
6. U. Zehavi, M. Herchman: Carbohydr. Res. 133, 339 (1984)
7. C. Augé, C. Mathieu, C. Merienne: Carbohydr. Res. 151, 147 (1986)
8. M.M.Palcic, O.P. Srivastava, O. Hindsgaul: Carbohydr. Res. 159, 315 (1987).

Os sacarídeos ou oligossacarídeos são aqui transformados com glucose ou então com N-acetil-glucosamina no topo terminal, com o auxílio do enzima, Glicosil-transferase de aminoácidos e hidratos de carbono, em especial os respectivos derivados da asparagina, não foram até agora utilizados como substratos.

Descobriu-se agora que a galactosil-transferase também permite a síntese das glicosil-asparaginas das fórmulas gerais I e II, podendo a parte não galactosídica ser primeiro sintetizada quimicamente através da combinação de métodos conhecidos.

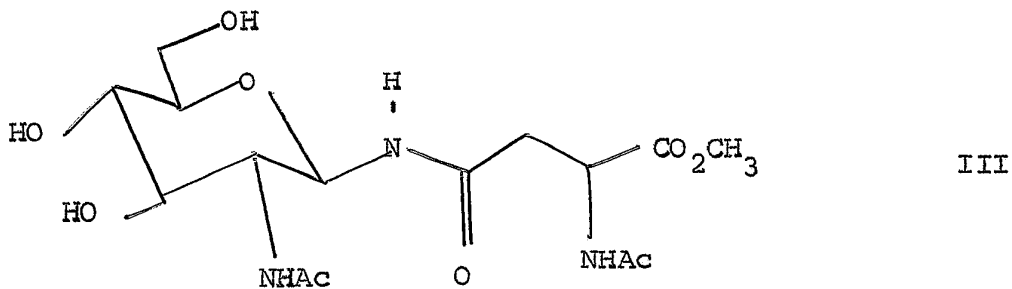


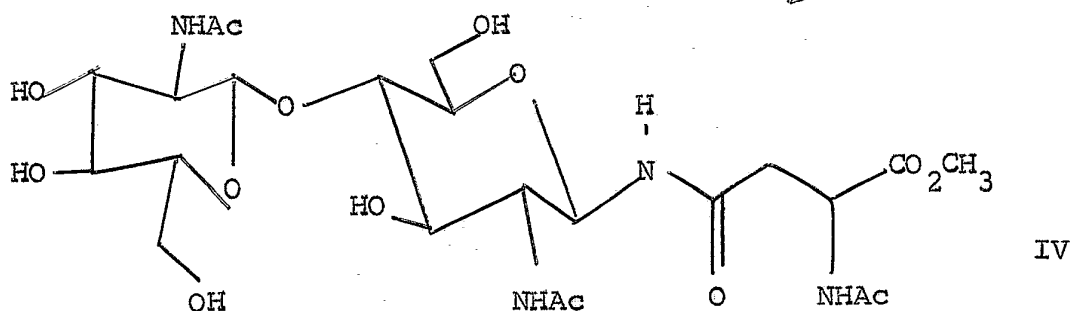


A Gal- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc- $\beta(1 \rightarrow N)$ -Asn (I) surge na sua forma completa, portanto na sua forma também bloqueada na componente aminoácido, na urina de doentes que sofrem de asartil-glucosiminil-ureia (R. J. Plitt, K. M. Pretty, *Biochem. J.* 141 (1974), 141).

A Gal- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc- $\beta(1-N)$ -L-Asn (II) encontra-se na membrana dos eritrocitos. Foi sugerida a hipótese de constituir aí o local receptor da robinia-lectina (A. M. Lesney, R. Bourrillon, S. Kornfeld, *Arch. Biochem. Biophys.* 153, (1972) 831).

A presente invenção refere-se portanto a um processo para a preparação enzimática de compostos com a fórmula geral I acima referida, ou de compostos com a fórmula geral II acima referida, caracterizado por se incubar um composto da fórmula geral III ou um composto da fórmula geral IV



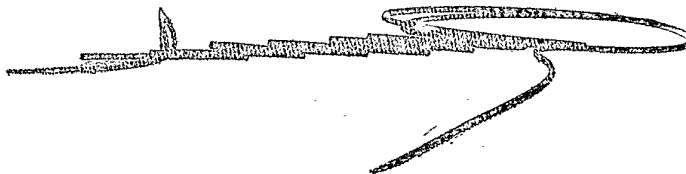


com uma galactosil-transferase, na presença de um dador de galactosilo.

Em seguida explicita-se pormenorizadamente a presente invenção e serão definidas as suas reivindicações,

A galactosil-transferase, por exemplo EC 2.4.1.22, aceita as glico-asparginas das fórmulas III e IV como substratos, que são galactosilados na posição $\beta(1 \rightarrow 4)$ da componente terminal N-acetil-glucosamina. Como dador de galactose, o enzima necessita de uridina-5'-difosfato-galactose (UDP-Gal). Este açúcar nucleotídeo é, no entanto, bastante caro, e é pois mais vantajosa a sua formação in situ, a partir de uridina-5'-difosfato-glucose (UDP-Glc) numa reacção catalizada pelo enzima uridina-5'-difosfato-galactose-4-epimerase (EC 5.1.3.2).

Para preparação dos compostos das fórmulas gerais I ou II, os substratos de partida das fórmulas III ou IV acima referidos são tratados com galactosil-transferase em solução aquosa, junto com um dador de galactosilo, como por exemplo UDP-Gal. Os substratos de partida e o dador de galactosilo são utilizados respectivamente em concentrações equimolares, de preferência numa quantidade 10 ou 15 molar. A galactosil-transferase comercializada pode ser aplicada na sua forma solúvel ou imobilizada. Quando se imobiliza dá-se preferência à silicagel como suporte, em especial por motivos de ordem económica. A reacção é realizada de preferência numa solução tamponada. Como tampão utiliza-se de preferen-



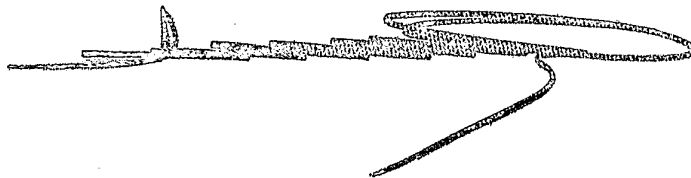
cia cacodilato de sódio. A temperatura de incubação pode situar-se, de acordo com os limites de temperatura/actividade do enzima, dentro de limites bastante latos. De preferência a reacção é realizada a 32-37°C.

Tal como foi referido anteriormente, a reacção a que se refere a presente invenção pode ser realizada através do chamado "método contínuo", iniciando-se com a preparação de UDP-Gal a partir de UDP-Glc com o auxílio de uridina-5'-difosfato-galactose-4-epimerase. Por "método contínuo" compreende-se que todos os substratos envolvidos bem como todos os enzimas envolvidos sejam introduzidos numa única mistura de reacção. Como é óbvio, a preparação de UDP-Gal a partir de UDP-Glc e a preparação dos compostos das fórmulas gerais I ou II podem também ser realizados uma a seguir à outra. No entanto, e mantendo os parâmetros de reacção acima descritos, o "método contínuo" revelou-se mais económico.

A detecção da evolução da reacção faz-se por cromatografia em camada fina. A separação dos compostos finais faz-se após eliminação dos fosfatos de nucleotideo através de cromatografia com resinas de permuta iónica, como por exemplo com Dowex 1-X8 (contra-ião: Cl^-), e cromatografase em gele, por exemplo com Bio-Gel P2, conseguindo-se um rendimento de 25-35%.

De acordo com os trabalhos de diferentes autores, os receptores de galactosilo das fórmulas III e IV, podem ser sintetizados quimicamente (D.E. Cowley, L. Hough, C. M. Peach, Carbohydr. Res. 19, (1971) 231; M. Spinola, R. W. Jeanloz, J. Biol. Chem. 245 (1970) 4158; H. Kunz, H. Waldmann, Angew. Chem. 97 (1985) 885).

No caso da aspartil-N-acetil-glucosamina da fórmula III, a N-acetil-glucosamina é transformada com cloreto de acetilo no seu α -cloreto peracetilado, que em



seguida é transformada na β -azida por via catalítica de transferência de fases em água/clorofórmio. Após redução com hidrogénio e paládio de modo a obter a β -amina, pode acoplar-se com N-acetil-asparginato de α -metilo, numa reacção de condensação suportada por etil-2-etóxi-1,2-dihidroquinolina-1-carboxilato (EEDQ). Após des-O-acetilação com metanolato de sódio obtém-se o receptor de galactosilo da fórmula geral III, que tem ainda de ser purificado por cromatografia sobre gel de antes da galactosilação enzimática.

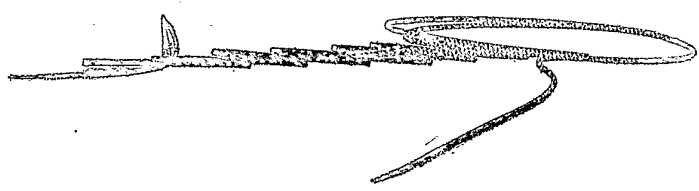
Para a síntese das aspartil-chiobiosilamina da fórmula IV procede-se em primeiro lugar à cisão acetolítica da chitina de modo a obter uma mistura de oligómeros, a partir da qual se pode isolar o octacetato de chitobiose através de cromatografia rápida. Este é transformado no cloreto de α -chitobiosilo peracetilado através de suspensão em cloreto de acetilo e introdução na solução de gás hidrocloreídrico. De acordo com a síntese do composto da fórmula geral III o α -cloreto é transformado com azida de sódio de modo a obter a β -azida, é depois reduzida de modo a obter a β -amina, acoplada com N-acetil-asparaginato de α -metilo e por fim O-acetilada. A aspartil-chiobiosilamina da fórmula geral IV pode, após purificação por cromatografia sobre gel, ser utilizada para a galactosilação enzimática acima descrita.

Seguidamente, a presente invenção é melhor ilustrada com o auxílio de alguns exemplos:

EXEMPLO

1. Processo para galactosilação das glicosil-asparaginas das fórmulas III e IV

- a) A reacção é realizada em tampão de cacodialto de sódio (25 mM, pH 7,7/, na presença de cloreto de manganês (5 mM). Após adição de UDP-galactose (13 mM), glicosilasparagina (III ou IV. 13 mM), albumina



sérica de bovino (1 mg/ml) e desoxigenação com azoto, adiciona-se a galactosil-transferase (EC 2.4.1.22, 10 U). Ap fim de dois dias a 37°C, trata-se com resina de permuta aniónica (Dowex 1-X8, forma cloreto) e em seguida purifica-se através de cromatografia sobre gel Bio-Gel P2,

b) A reacção é realizada em tampão de cacodilato de sódio (25 mM, pH 7,7), na presença de cloreto de manganês (5 mM). Após adição de UDP-glucose (13 mM), glicosilasparagina (III) ou IV, 13 mM), albumina séria de bovino (1 mg/ml) e desoxigenação com azoto, adicionar galactosil-transberase (EC 2.4.1.22, 1 U) e UDP-galactose-4-epimerase (EC.5.1.2.2, 10 U). Passados dois dias a 37°C tratar com resina de permuta aniónica (Dowex 1-X8, forma cloreto) e em seguida purifica através de cromatografia sobre gel Bio-Gel P2.

1.1) 2-Acetamido-4-O-(β-D-galactopiranosil)-1-N-(N-acetil-1-metil-4-L-aspartil)-2-desóxi-β-D-glucopiranosilamina (I)

Tomas: 64,5 mg (100 μmol) UDP-Gal

39 mg (100 μmol) de composto da fórmula III

Controle por CCF : eluente n-propanol / ácido acético/
/ água 85:12:3

valores de Rf : GlcNAc-Asn (III) 0,22

Gal-GlcNAc^oAsn (IV) 0,08

Rendimento : 20 mg (35%)

Dados seleccionados da ¹H-RMN (300 MHz, D₂O): S =

5,06 (d, 1H, H-1); 4,40 (d, 1H, H-1'); 2,95 (dd, 1H, β-Asn); 2,82 (dd, 1H, β¹-Asn); J_{1.2} = 9,4; J_{1.2'} + 7,6; J_{α.β} = 5,55; J_{β.β'} = 17,1; J_{α.β'} = 7,63 Hz.

1.2) 2-Acetamido-4- β -2-acetamido-2-desóxi-4-(β-D-galactopiranosil))-β-D-glucopiranosil)-1-N-(N-acetil-1-metil-4-L-aspartil)-2-desóxi-β-D-glucopiranosilamina (II)

Reagentes: 32,0 mg (50 μ mol) UDP-Gal

29,0 mg (50 μ mol) de composto da fórmula IV

Controle por CCF : eluente n-butanol / ácido acético /
/ água 2:4:1

valores de Rf: GlcNac-GlcNac-Asn

(IV) 0,31

Gal-GlcNac-GlcNac-Asn (II) 0,19

Rendimento: 10 mg (25%)

Dados seleccionados da $^1\text{H-RMN}$ (330 MHz, D_2O):

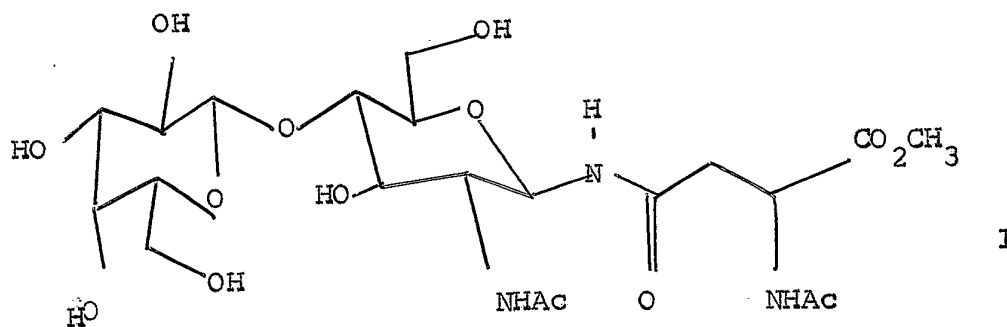
δ = 5,09 (d, 1H, H-1); 4,62 (d, 1H, H-1'), 4,47
(d, 1H, H-1''); 2,06, 2,02, 2,01 (respectivamente s,
respectivamente 3H, respectivamente NAc);

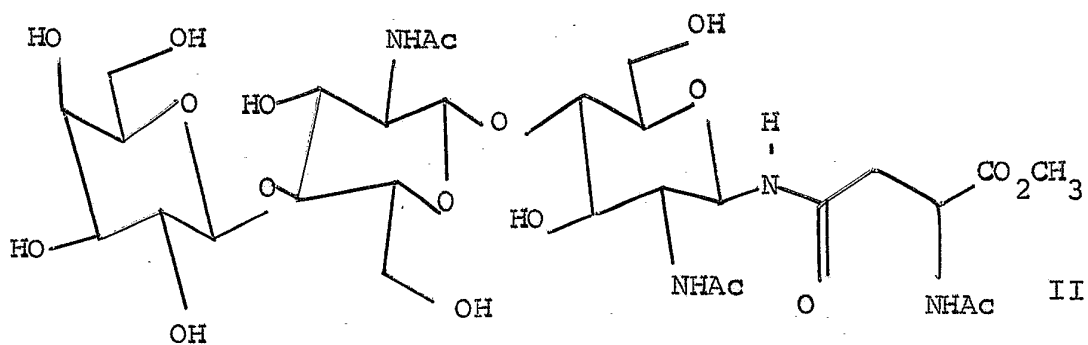
$J_{1.2}$ = 9,6 Hz; $J_{1'.2'}$ = 8,1 Hz; $J_{1''.2''}$ = 7,7 Hz.

REIVINDICAÇÕES

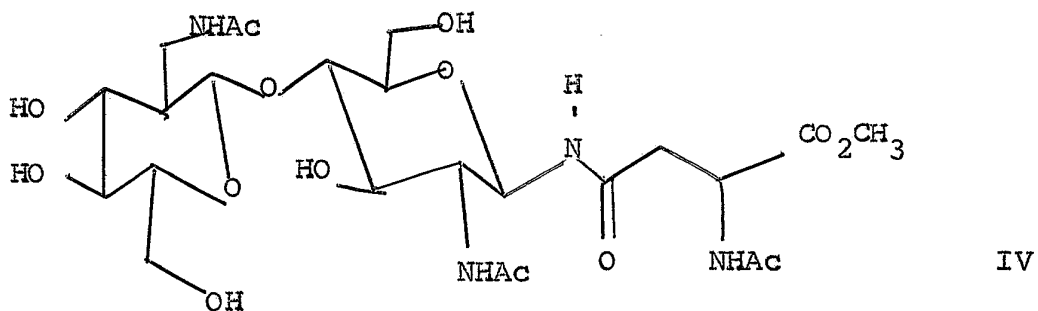
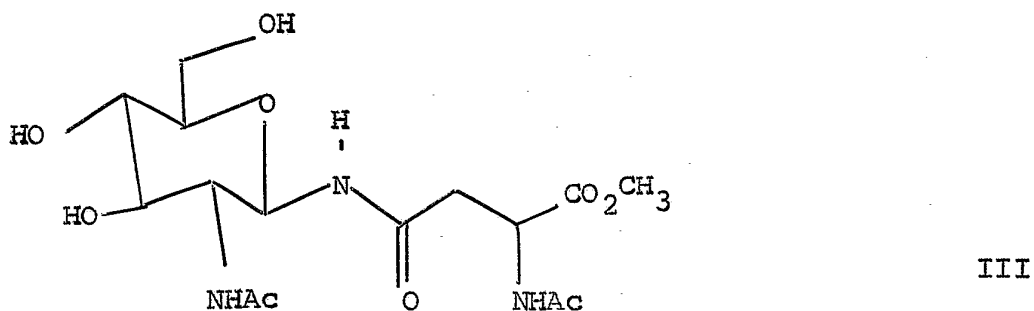
- 1ª -

Processo para a preparação enzimática
de compostos da fórmula geral I ou II





caracterizado por se incubar um composto da fórmula geral III ou um composto da fórmula geral IV



com galactosil-transferase, na presença de um dador de galactosilo.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se utilizar como dador de galactosilo UDP-Gal.

- 3ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por a UDP-Gal ser sintetizada a partir de UDP-Glc, sob catálise da UDP-galactose-4-epimerase.

- 4ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, caracterizado por a reacção ser realizada numa solução tamponada.

- 5ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 4, caracterizado por a reacção ser realizada a 32-37°C,

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 23 de Agosto de 1989, sob o nº P 39 27 801.8.

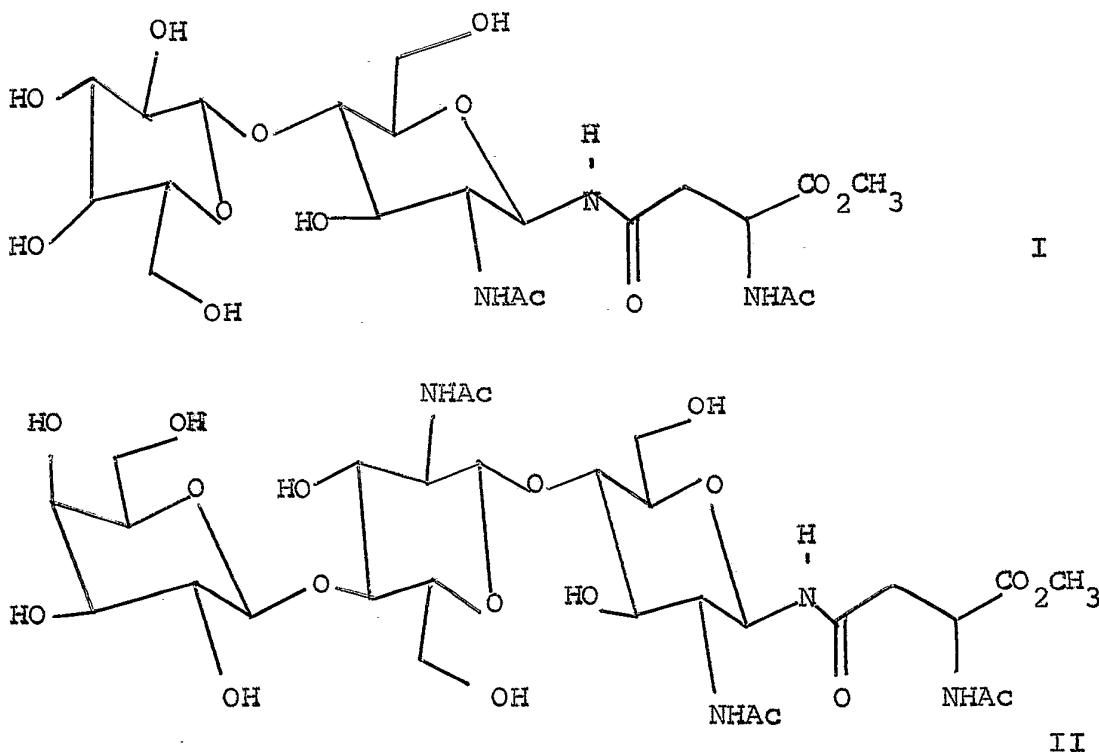
Lisboa, 22 de Agosto de 1990
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



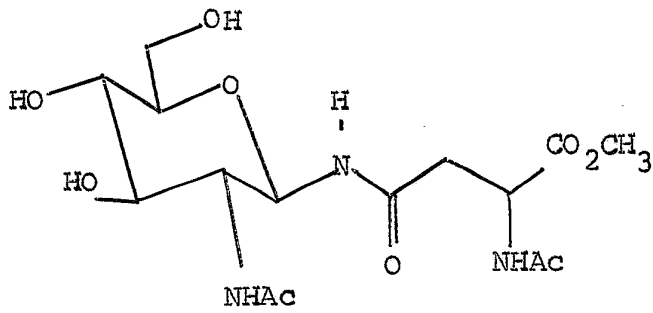
RESUMO

"PROCESSO PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE COMPONENTES GLICOPROTEICAS GALACTOSILADAS"

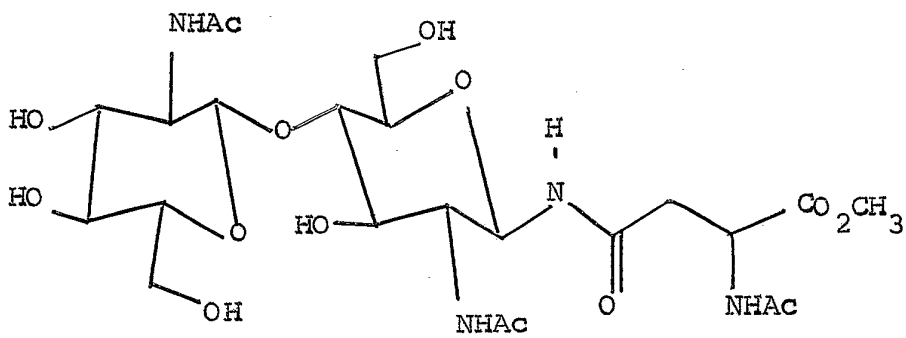
A invenção refere-se a um processo para a preparação enzimática de compostos da fórmula geral I ou II



que compreende incubar-se um composto da fórmula geral III ou um composto da fórmula geral IV



III



IV

com galactosil-transferase, na presença de um dador de galactosilo.