

(11) *Número de Publicação:* PT 88198 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)  
C07K015/00 A

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

|                                           |                  |                                                                                                                          |
|-------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (22) <i>Data de depósito:</i>             | 1988.08.04       | (73) <i>Titular(es):</i><br>LABORATÓRIO NAC.ENG.E<br>TEC.IND.DEP.TEC.IND.QUÍMICA<br>ESTRADA DAS PALMEIRAS 2745 QUELUZ PT |
| (30) <i>Prioridade:</i>                   |                  |                                                                                                                          |
| (43) <i>Data de publicação do pedido:</i> | 1990.03.08       | (72) <i>Inventor(es):</i><br>MARIA EUGENIA MEIRINHOS DA CRUZ PT<br>MARIA BÁRBARA DOS ANJOS FIGUEIRA MARTINS PT           |
| (45) <i>Data e BPI da concessão:</i>      | 08/94 1994.08.03 | (74) <i>Mandatário(s):</i><br>AMÉRICO DA SILVA CARVALHO<br>RUA CASTILHO 201 3º AND. ESQ. 1070 LISBOA PT                  |

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS

(57) *Resumo:*

[Fig.]

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 88 198**

**REQUERENTE:** LABORATORIO NACIONAL DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA INDUSTRIAL PELO DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE INDUSTRIAS QUIMICAS, portuguesa, Organismo Oficial, com sede em Queluz de Baixo, Estrada das Palmeiras.

**EPÍGRAFE:** " PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS "

**INVENTORES:** Maria Bárbara dos Anjos Figueira Martins e Maria Eugénia Meirinhos da Cruz.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

*Wifama*

P.I. Nº. 88.198

MEMÓRIA DESCRITIVA DO INVENTO

para

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS QUÍMICAMENTE MODIFICADAS"

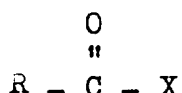
que apresenta

LABORATÓRIO NACIONAL DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA INDUSTRIAL--  
PELO DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE INDÚSTRIAS QUÍMICAS, por  
tuguesa, Organismo Oficial, com sede em  
Queluz de Baixo, Estrada das  
Palmeiras

R E S U M O

=====

A invenção refere-se ao processo para a preparação de proteínas quimicamente modificadas, com ou sem actividade catalítica, e efeito terapêutico que disponham de grupos  $\zeta$ -NH<sub>2</sub> reactivos, caracterizado por compreender a reacção de ligação covalente desses grupos ao carbono carbonílico de um ou vários agentes acilantes de fórmula



em que R e X têm os significados indicados nas reivindicações, um meio micelar contendo o agente acilante e a proteína com uma razão molar compreendida entre 50 e 900, e na presença ou não de agente acilante eventualmente seguida da reacilação realizada em condições semelhantes.

Esta invenção relaciona-se com a produção de pro-

*W. F. A. M.*

teínas modificadas por via química.

Diversas proteínas apresentam potencialidades terapêuticas consideráveis, porém o seu uso clínico diário é limitado pelas reacções imunológicas que desencadeiam quando administradas por via intravenosa, tal como descrito por R.W.E. Watts e D.A. Gibbs in *Lysosomal Storage Diseases: Biochemical and Clinical Aspects*, Taylor & Francis, London and Philadelphia, 1986 e por P. Boivin, J. Boisse, H. Iestradet e A. Gajdos in *Enzymopathies*, Fasc. V. Masson, Paris, 1979.

Quando uma proteína é imobilizada em vesículas lipídicas, designadas por lipossomas, é possível utilizar as suas capacidades terapêuticas diminuindo consideravelmente as reacções adversas do organismo, e ao mesmo tempo aumentar o seu tempo de circulação e impedir a respectiva degradação.

A modificação química de proteínas hidrofílicas com reagentes contendo grupos hidrofóbicos possibilita uma ligação termodinamicamente estável entre a proteína e a camada lipídica de lipossomas, tal como descrito por V.P. Torchilin e A.L. Klibanov em *Enzyme Microb. Technol.*, 1981, 3, 297-364.

A afinidade da proteína modificada para a membrana lipídica é directamente proporcional ao grau de modificação obtido, de acordo com V.P. Torchilin, V.G. Omel'Yanenko, A.L. Klibanov, A.I. Mikhailov, V.I. Gol'Danskii e V.N. Smirnov em *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 602, 511-521. Quando a proteína actua como catalisador, como é o caso das enzimas, a eficácia terapêutica do sistema enzima/lipossoma é também função da actividade catalítica retida pela enzima modificada.

A modificação de proteínas pela ligação covalente

**BAD ORIGINAL**

-3-  
Wifama

entre os grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> dos resíduos de lisina existentes na proteína e os resíduos de palmitoílo, provenientes do cloreto de palmitoílo, é descrita por V.P. Torchilin e colaboradores em Biochim. Biophys. Acta, 1980, 602, 511-521. O processo de modificação descrito por estes autores consiste em submeter a tratamento com ultrassons uma solução tampão fosfato contendo colato de sódio, à qual foi adicionada uma solução de cloreto de palmitoílo em acetona, a mistura obtida é adicionada à proteína, incubada, o precipitado formado separado por centrifugação e a proteína modificada recolhida no sobrenadante. Em particular, os autores do processo descrevem a modificação da enzima quimotripsina, obtendo uma molécula modificada em 22% ou 6% dos grupos amino, com retenção de actividade catalítica de respectivamente 60% e 85%.

Utilizando o mesmo processo de modificação, R. Koelch, J. Lash, A.L. Kibanov e V.P. Toschilin, em Acta Biol. Med. Germ., 1981, 40, 331-335, descrevem a modificação de duas outras enzimas, carboxipeptidase e tripsina, tendo obtido um grau de modificação de respectivamente 6-12% e 7-13%, com 80% de retenção da actividade catalítica em ambos os casos. Recorrendo ao mesmo processo, V.S. Goldmacher descreve em Biochem. Pharmacology, 1983, 32, 1207-1210 uma modificação de tripsina de 15%, com uma retenção de actividade de 63-68%.

A enzima L-asparaginase foi também modificada pelo processo de Toschilin, segundo trabalho de E. Classen e N. van Rooijen em Preparative Biochemistry, 1983, 13, 167-174, com perda de 35% de actividade catalítica, mas estes autores não especificam o grau de modificação obtido.

Os resultados de modificação de proteínas pelo processo de Toschilin e colaboradores mostram que o grau de modificação máximo conseguido é de 22% e que todas as modi-

BAD ORIGINAL

4 -  
Wifama

ficações apresentadas conduzem à redução de actividade catalítica.

A presente invenção consiste num processo com duas variantes fundamentais para melhorar a modificação química de proteínas e que, em relação ao processo já descrito, tem a vantagem de, respectivamente, aumentar a percentagem de grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> modificados e consequentemente a afinidade da proteína para a camada lipídica de lipossomas, e de diminuir a perda de actividade catalítica resultante da modificação química com consequente eliminação dos inconvenientes que essa perda de actividade acarreta.

De acordo com uma das variantes do processo da presente invenção, o aumento da percentagem de grupos modificados numa proteína é conseguido por adição à proteína de uma suspensão de micelas mistas de agente acilante e de um agente tensioactivo, por exemplo colato de sódio, em tampão, obtidas por acção de ultrassons. A mistura reaccional assim preparada é deixada com agitação lenta à temperatura ambiente, centrifugada e a proteína recolhida do sobrenadante, sendo seguidamente dialisada e liofilizada. A proteína pré-modificada obtida é de seguida sujeita a reacilação pelo mesmo método, sendo a reacilação a etapa crucial deste processo, pois permite aumentar significativamente o número de grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> modificados relativamente à modificação conseguida numa única reacção de acilação.

De acordo com a segunda variante do processo da presente invenção, a eliminação de perda de actividade catalítica de uma proteína por modificação é conseguida por adição à proteína de uma suspensão de micelas mistas de agente acilante e de um agente tensioactivo, por exemplo colato de sódio, em tampão, contendo um agente protector do centro activo da proteína. A mistura reaccional é mantida com agitação lenta à temperatura ambiente, centrifugada

*Wifama*

e a proteína recolhida do sobrenadante. Por este processo obtém-se uma proteína com retenção total de actividade catalítica.

Para completa elucidação da presente invenção, descrevem-se de seguida exemplos da forma de realização preferida das duas variantes do processo de acordo com a presente invenção também a título ilustrativo.

### EXEMPLOS DE APLICAÇÃO

#### EXEMPLO 1

#### PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO COM ELEVADO GRAU DE MODIFICAÇÃO

Adicionar cloreto de palmitoílo a uma solução tampão de carbonato 50mM, pH 9,4, contendo 1% de colato de sódio, de modo a obter uma concentração de 9,12mmoles  $l^{-1}$  de agente acilante. Sonicar de imediato durante 90 segundos e juntar a suspensão obtida a albumina de soro bovino até à concentração de  $1,52 \times 10^{-5} M$  na mistura, agitando lentamente à temperatura ambiente durante 2 horas. O ácido palmítico formado é separado por centrifugação a 20.000xg durante 30 minutos. É obtida uma albumina de soro bovino pré-modificada em 35% dos grupos  $\epsilon-NH_2$ .

A proteína pré-modificada é separada por diálise contra água em volume 2.000 vezes superior ao volume da amostra durante 13 horas, congelada em azoto líquido e liofilizada durante 16 horas. O produto obtido é sujeito a reacilação pelo mesmo método até ao passo de centrifugação, recolhendo-se no sobrenadante uma proteína contendo 59% de grupos  $\epsilon-NH_2$  modificados, tal como determinado pela ligação de uma molécula fluorescente, por exemplo, fluorescamina [4-fenil-espiro[furano-2(3H), 1' (3'H)-isobenzofurano]7-

BAD ORIGINAL

6 -  
Wifama

-3,3'-diona<sup>7</sup>, aos grupos livres da proteína modificada e da nativa.

## EXEMPLO 2

### PROCESSO DE PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE MODIFICADA COM ELE- VADO GRAU DE RETENÇÃO DE ACTIVIDADE CATALÍTICA

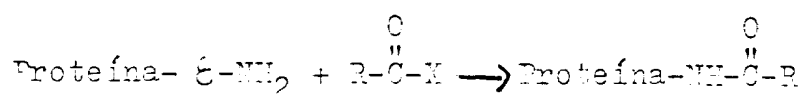
Adicionar cloreto de palmitoílo a uma solução tam-  
pão carbonato 50mM, pH 9,4, contendo 1% de colato de sódio  
e L-asparagina 8mM, de modo a obter uma concentração de  
 $2,0 \mu\text{moles.ml}^{-1}$  de agente acilante. Sonicar de imediato du-  
rante 90 segundos e juntar à suspensão obtida L-asparagi-  
nase (L-asparagina amido-hidrolase EC 3.5.1.1) até à con-  
centração de 4,61mM na mistura, agitando lentamente à tem-  
peratura ambiente durante 2 horas. O ácido palmítico for-  
mado é separado por centrifugação a  $20.000 \times g$  durante 30  
minutos. É obtida uma L-asparaginase modificada em 30% dos  
grupos  $\epsilon\text{-NH}_2$  e com actividade catalítica igual à da pro-  
teína nativa, isto é, retenção de 100%, determinada pela  
medição da velocidade inicial de formação de amoníaco pelo  
método descrito por A.L. Chaney e E.P. Marbach em Clinical  
Chem., 1962, 8, 130-132.



*W. F. ...*

## REIVINDICAÇÕES

1ª. - Processo para a preparação de proteínas quimicamente modificadas, com ou sem actividade catalítica, que disponham de grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> reactivos, caracterizado pelo facto de compreender a reacção de ligação covalente desses grupos ao carbono carbonílico de um ou vários agentes acilantes em meio micelar, de acordo com o esquema:



em que R é um grupo alquilo, amino, tiol ou éter, saturado ou insaturado com 1 ou mais átomos de carbono formando uma cadeia cíclica ou acíclica e X é um grupo hidroxilo, halogéneo, alcóxi ou acilo, e em que a razão molar entre o agente acilante e a proteína é de 50-900.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a modificação da proteína se realizar na presença de um agente protector do seu **centro activo**, para produzir uma proteína com retenção de actividade catalítica superior a cerca de 35%.

3ª. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo facto de o agente acilante ser o cloreto de palmitoílo.

4ª. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pelo facto de compreender a separação da proteína modificada do meio micelar, seguida de congelação, liofilização e reacilação, para se obter uma proteína com grau de modificação superior ao obtido com uma única reacção de acilação.

73-  
Wifama

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de na reacilação a razão molar entre o agente acilante e a proteína pré-modificada ser de 50-300.

6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo facto de o agente acilante ser o cloreto de palmitoílo.

7ª. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo facto de a proteína modificada ser incorporada em lipossomas.

8ª. - Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se misturar pelo menos uma proteína quimicamente modificada, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7, com as substâncias veiculares e/ou diluentes fisiologicamente aceitáveis.

Lisboa, 4 de Agosto de 1983

/ O Agente Oficial da Propriedade Industrial

Américo da Silva Carvalho

**Américo da Silva Carvalho**

Agente Oficial da Propriedade Industrial

R. Castilho, 201-3. E-1000 LISBOA

Tele. 65 13 39-65 46 13

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA  
Adjunto

BAD ORIGINAL