

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95 421

REQUERENTE: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede
em D-6230 Frankfurt am Main 80, República
Federal Alemã

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO DE
UMA PROTEÍNA DE FUSÃO NUMA MISTURA DE PROTEÍNA
DE FUSÃO E DE PRODUTO DE DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA"

INVENTORES: Dr. Rudolf Bender

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

República Federal Alemã, em 27 de Setembro de 1989, sob
o N.º. P 39 32 180.0.

Descrição referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã, (inventor: Dr. Rudolf Bender, residente na República Federal da Alemanha), para "PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO NUMA MISTURA DE PROTEÍNA DE FUSÃO E DE PRODUTO DE DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA"

D E S C R I Ç Ã O

Na fermentação de estreptomicetas recombinantes para a preparação de uma proteína de fusão com uma parte de Tendamistato, verifica-se uma degradação proteolítica da proteína segregada por proteases que se obtêm na fermentação juntamente com a proteína de fusão. Por actuação das proteases, obtém-se como componente da proteína de fusão a Tendamistato como produto da degradação, essencialmente. Porque se sabe que a Tendamistato é um inibidor de péptido da alfa-amilase do pâncreas, a formação do produto total de uma cultura de estreptomicetas, ou seja, o teor de proteína de fusão, incluindo o produto de degradação, é determinado pelo ensaio de inibidor de alfa-amilase.

No entanto, é inconveniente o grande intervalo de tempo que é necessário para determinar o teor de proteína de fusão pura o qual é importante para o intervalo

de tempo da colheita da amostra ou para isolamento do produto. Assim, a determinação da proteína de fusão de acordo com o processo de electroforese com dodecil-sulfato de sódio (SDS) necessita de pelo menos oito horas e, de acordo com o ensaio de rádio-imunidade de insulina pelo método (RIA), precisa de cerca de vinte e quatro horas. A presente invenção pretende proporcionar um meio auxiliar para evitar esse inconveniente.

Reivindica-se um processo para a determinação da proporção da proteína de fusão numa mistura de proteína de fusão e de produtos de degradação proteolítica que se caracteriza pelo facto de se diluir a mistura constituída pela proteína de fusão e pelo produto de degradação proteolítica com albumina de soro de vitelo, se misturar uma parte da mistura diluída com solução de alfa-amilase, se incubar a 37°C durante um intervalo de tempo maior ou igual a trinta minutos, se adicionar reagente de alfa-amilase e se medir espectrofotometricamente a reactividade da solução de alfa-amilase, se misturar a outra parte da mistura diluída com reagente de alfa-amilase, se tratar a solução de alfa-amilase depois de mistura e se medir espectrofotometricamente a cinética (decurso da reacção), se compararem todos os valores medidos com padrões de proteína de fusão, Tendamistato, produto de degradação e reacção de alfa-amilase inibida e, a partir da comparação, determinar-se o teor de proteína de fusão existente na mistura.

Neste método, de acordo o qual se pode determinar o teor de proteína de fusão intacta presente em mistura com produto de degradação, em menos do que duas horas, com uma margem de erro de $\pm 10\%$, utilizam-se as diferentes constantes de velocidade da reacção de proteína de fusão purificada, produto de degradação e de Tendamistato com alfa-amilase.

Em seguida, esclarece-se a presente invenção mais completamente por meio de um exemplo.

Centrifuga-se ou filtra-se o caldo do fermentador para separar os microrganismos, assim como os componentes do meio insolúveis. O sobrenadante da centrifugação ou o filtrado corresponde à mistura acima definida de proteína de fusão e de produto de desagregação proteolítica. Esta mistura é neutralizada com HCl ou com NaOH - sempre que o seu valor de pH seja diferente de 7 de $\pm 1,5$ - e, em seguida, dilui-se com solução de albumina de soro de vitelo a 0,1% na proporção de 1 : 100 e ensaia-se a mistura diluída num processo em duas fases relativamente à inibição de alfa-amilase.

Na primeira fase, mistura-se 0,1 ml da mistura diluída com 0,4 ml de solução de alfa-amilase. Prepara-se a solução de alfa-amilase por dissolução de 8 mg de alfa-amilase de pâncreas de porco fornecido pela firma Merck, Darmstadt, Número de Encomenda 16 312 em 1 litro de solução que contém 100 milimoles de tampão de Hepes (pH 7), 2 mM de CaCl_2 , assim como 0,4% de albumina de soro de vitela. Além disso, adiciona-se 0,1 ml de solução a 0,1 % de albumina de soro de vitela como controlo da reacção não inibida, assim como 0,1 ml de solução de tendamistate pura com a concentração de 1 mg por litro de solução a 0,1 % de albumina de soro de vitela como padrão inibidor com respectivamente 0,4 ml de solução de alfa-amilase.

Incubam-se as três misturas reaccionais a 37°C durante ≥ 30 minutos. De cada mistura incubada, misturam-se 20 microlitros com 1 ml de reagente de alfa-amilase (WAK Chemie, Bad Soden), que é previamente temperada a 37°C . Imediatamente depois da mistura, determinam-se fotometricamente as taxas de reacção V, ao comprimento de onda previamente indicado de 405 nanómetros durante cerca de cinco minutos e

registra-se a extensão ΔE em função do tempo (t). A velocidade de reacção V varia linearmente com o reagente de alfa-amilase utilizado.

Como se mostra na Figura 1, essa velocidade é igual, no caso da mistura de proteína de fusão e de produto de degradação, a 0,10 ΔE por minuto, para a reacção de controlo 0,3 ΔE por minuto e para a reacção de tendamistate 0,16 ΔE por minuto. Como a velocidade de reacção V é directamente proporcional à concentração de inibidor C, pode determinar-se a concentração de inibidor C_G da mistura de proteína de fusão e produto de degradação por meio dos seguintes sistemas de equações:

$$V_G = -mC_G + V_K$$

$$V_T = -mC_T + V_K.$$

nas quais

V_G é a velocidade da reacção da mistura (G),

V_T é a velocidade da reacção da solução de tendamistate (T),

V_K é a velocidade da reacção da solução de controlo (K),

C_G é a concentração de proteína de fusão + produto de decomposição (mg/l) na mistura,

C_T é a concentração de Tendamistato na solução de Tendamistato.

Como se escolheu $C_T = 1 \text{ mg/l}$, resulta do sistema de equações para

$$C_G = \frac{V_K - V_G}{V_K - V_T} = \frac{0,3 - 0,1}{0,3 - 0,16} = 1,43 \text{ mg/l}$$

Na segunda fase, misturam-se 150 microlitros, da mistura diluída 1 : 100 da proteína de fusão e do produto de degradação com 800 microlitros de reagentes de alfa-amilase (WAK Chemie, Bad Soden) e aquece-se a 37°C. Igualmente, misturam-se 150 microlitros de solução de albumina de soro de vitela a 0,1%, como controlo, com 800 microlitros de reagente de alfa-amilase e aquece-se a 37°C. Realiza-se a reacção da mistura por adição de 50 microlitros de solução de alfa-amilase, como se indicou na operação 1 - **multo** embora com uma concentração de alfa-amilase igual a 2,5 mg/litro - inicia-se a reacção e regista-se o progresso da reacção (cinética) fotometricamente durante cerca de dez minutos a 405 nm e regista-se a extinção (ΔE) em função do tempo (Figura 2).

Em presença de inibidores, a velocidade de reacção diminui continuamente a partir do início da reacção. O progresso da reacção da solução de albumina de soro de vitela (controlo) é linear; a velocidade de reacção de V_K é igual a 0,26 ΔE por minuto nesta reacção. Da Figura 2, conclui-se que a velocidade de reacção V_G para a mistura de proteína de fusão e de produto de degradação, entre o quinto e o sexto minuto, é igual a 0,02 ΔE por minuto.

As velocidades de reacção determinadas a partir do progresso da reacção na fase 2, V_G e V_K , são representadas graficamente em escala semilogarítmica em função nas velocidades de reacção V_G , V_T e V_K da concentração determinada de C_G da mistura da proteína de fusão e de produto de degradação (Figura 3). Obtêm-se uma linha recta cuja inclinação constitui uma medida do teor de proteína de fusão na mistura constituída por proteína de fusão e produtos de degradação. Compara-se este valor com o aumento das curvas padrão (rectas) que foram obtidos de acordo com o mesmo método a partir de produto de degradação puro e de proteína de fusão pura.

REIVINDICAÇÃO

Processo para a determinação da proporção de uma proteína de fusão numa mistura de proteína de fusão e de degradação proteolítica, caracterizado por se diluir a mistura da proteína de fusão e do produto da degradação com albumina de soro de vitelo, misturar-se uma parte da mistura diluída com solução de α -amilase, incuba-se a 37°C durante um tempo igual ou maior do que 30 minutos, adicionar-se reagente de α -amilase e se medir espectrofotometricamente a actividade residual da solução de α -amilase, se misturar a outra parte da mistura diluída com reagente de α -amilase, depois da mistura se adicionar solução de α -amilase e se medir espectrofotometricamente a cinética da enzima (avanco da reacção), se comparar todos os valores determinados com padrões de proteína de fusão, tendamistato, produto de desagregação e reacção com α -amilase não inibida e, a partir da comparação destes valores, se determinar o teor de proteína de fusão na mistura.

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 27 de Setembro de 1989, sob o Nº. P 39 32 180.0.

Lisboa, 26 de Setembro de 1990.

D. ABRILHES DANCANHO, INDEPENDENTE E NÃO ESTRELA



RESUMO

"PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO NUMA MISTURA DE PROTEÍNA DE FUSÃO E DE PRODUTO DE DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA"

No processo para determinação da proporção de uma proteína de fusão numa mistura de proteína de fusão e de produto de degradação proteolítica, dilui-se a mistura da proteína de fusão e de produto de degradação com albumina de soro de vitelo. Mistura-se uma parte de mistura assim diluída com solução α -amilase, incuba-se a 37°C durante mais um tempo igual ou maior do que 30 minutos, adiciona-se reagente de α -amilase e mede-se espectrofotometricamente a actividade residual da solução de α -amilase. Mistura-se a outra parte da mistura diluída com reagente de α -amilase, depois do que se adiciona à mistura solução de α -amilase e mede-se espectrofotometricamente a cinética da enzima (avanço da reacção); Todas as determinações são comparadas com padrões de proteína de fusão, tendamistado, produto de desagregação e reacção de α -amilase não inibida e, a partir da comparação, determina-se o teor de proteína de fusão na mistura.

[Handwritten signature]

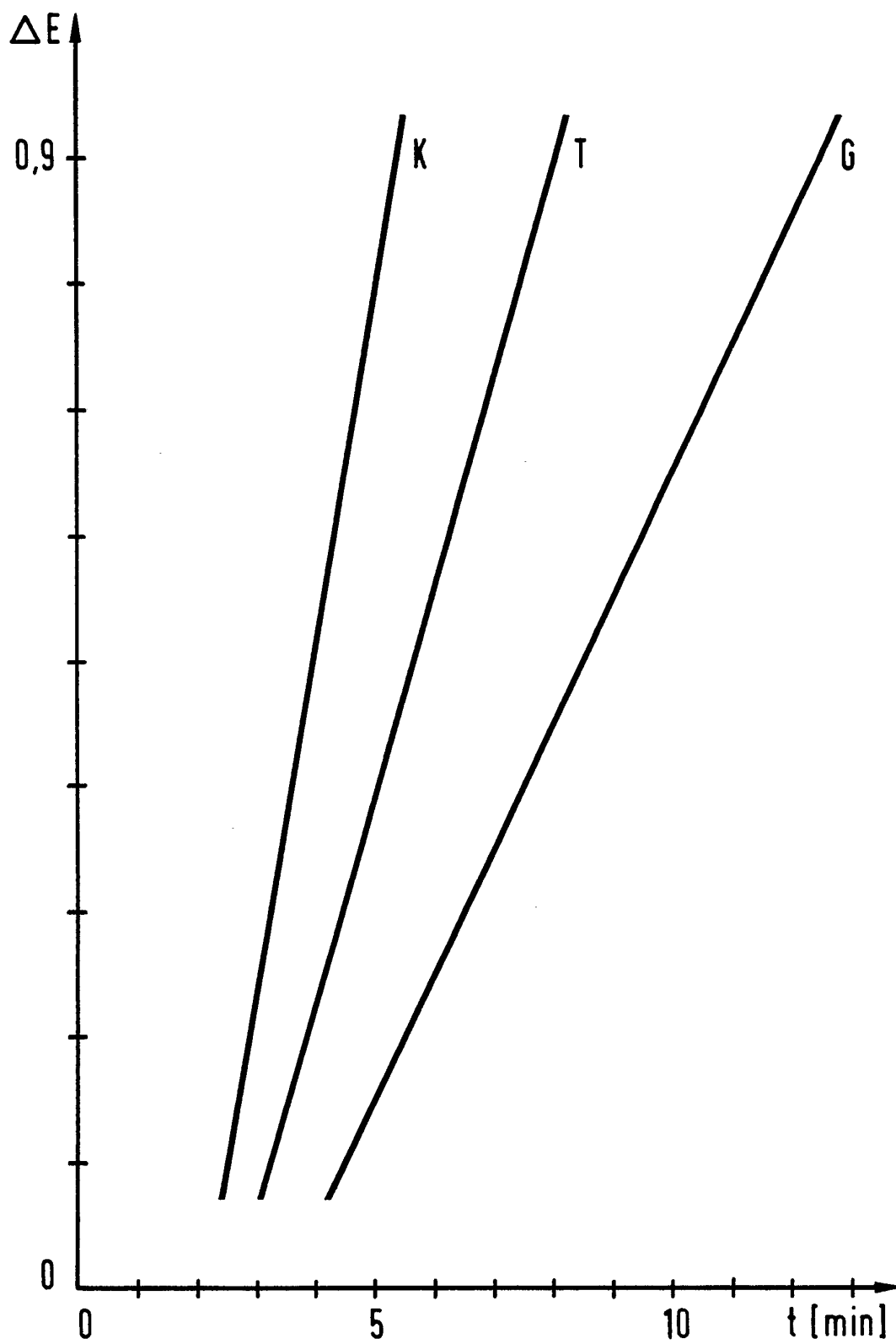


Fig. 1

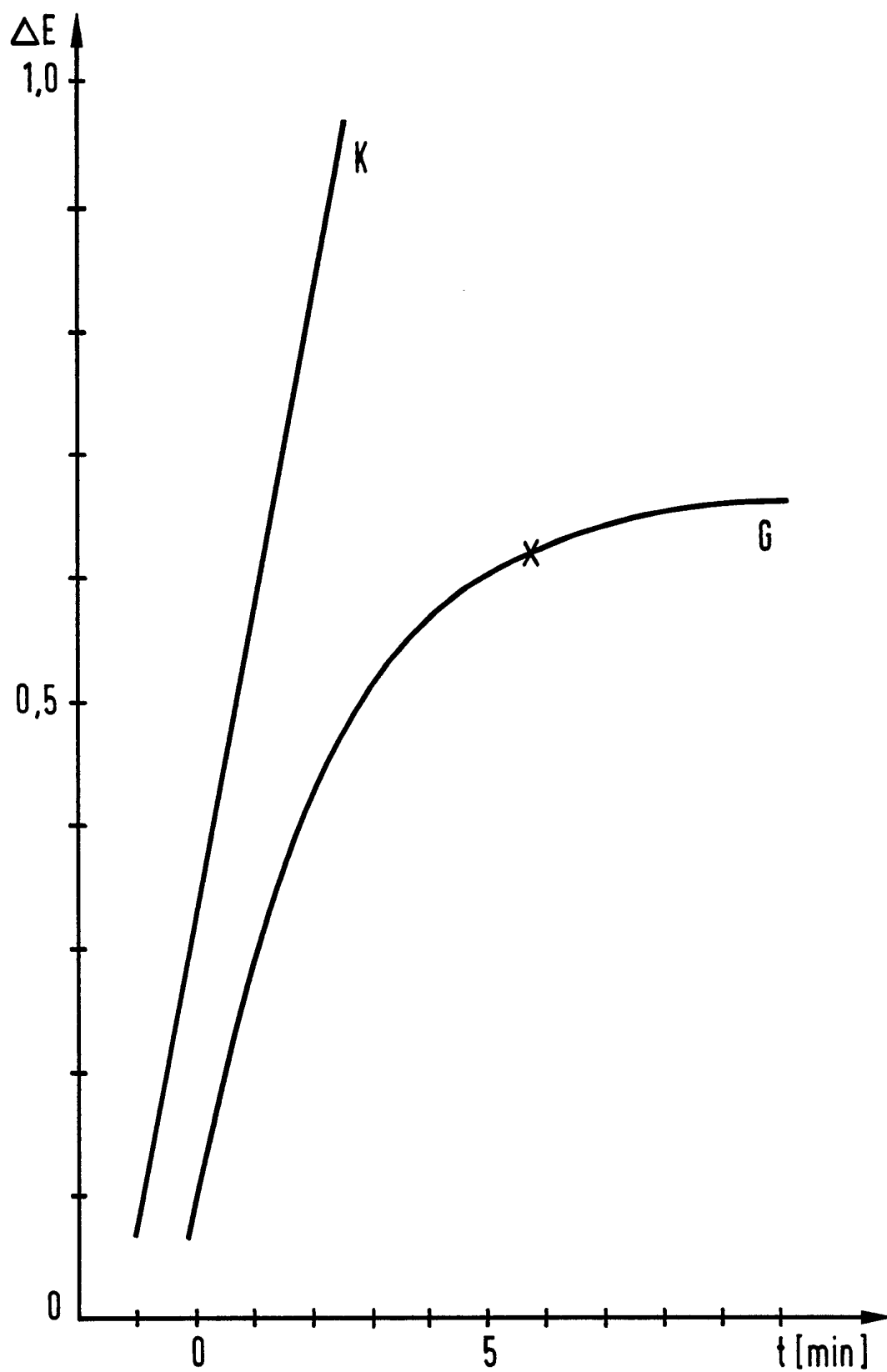


Fig. 2

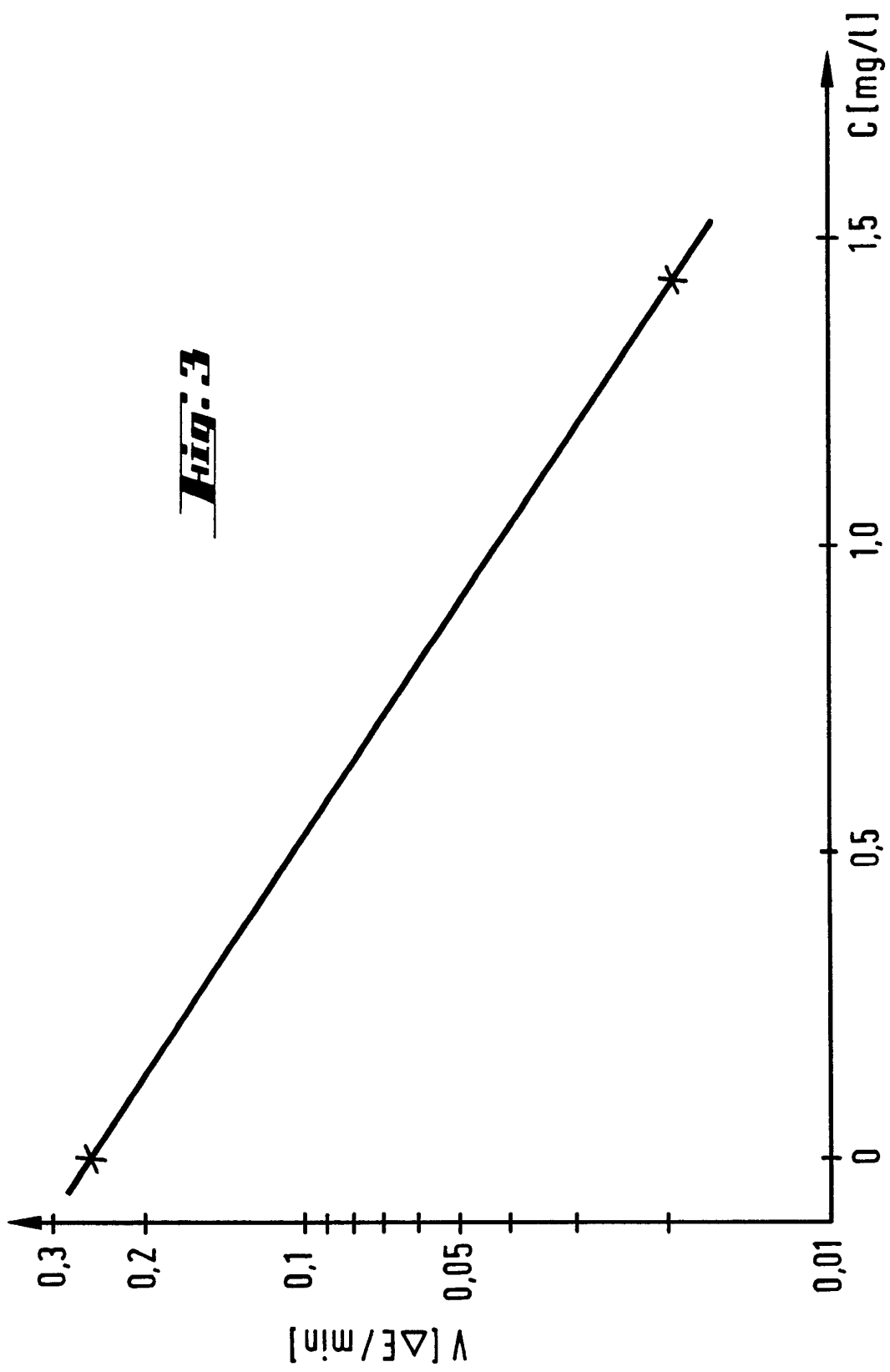


Fig. 3

[Handwritten signature]