

DESCRIÇÃO .
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95 992

REQUERENTE: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com
sede em D-3550 Marburg, República Federal
Alemã

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PURIFICAÇÃO DE LIPOCORTINAS"

INVENTORES: Dr. Jürgen Römisch e Prof. Dr. Norbert Heim
Durger

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

República Federal da Alemanha, em 27 de Novembro de 1989,
sob o Nº. P 39 39 169-8.



Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Jürgen Römisch e Prof. Dr. Norbert Heim Durger, residentes na Rep. Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PURIFICAÇÃO DE LIPOCORTINA"

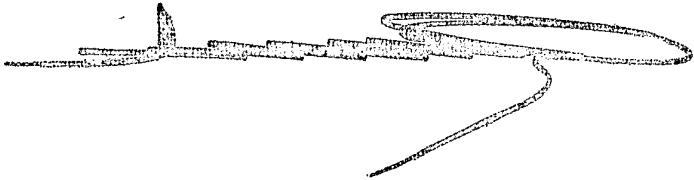
DESCRIÇÃO

A invenção refere-se a um processo para a purificação do lipocortinas, em especial das proteínas PP4-X, PAP III, p68, ancorina II e ainda 1lipocortina I e II.

Estas proteínas pertencem a uma família que se designa das lipocortinas, Calpactinas ou enexinas. podem encontrar-se em muitos organismos e ainda em seres humanos na maior parte dos órgãos ou tipos de células. As propriedades funcionais mais importantes até agora conhecidas destas proteínas são um efeito anti-coagulante. Esta família de proteínas pode ter uma influência em estados inflamatórios e distúrbios de coagulação com eles relacionados, como a coagulação intravasol disseminada (DIC), diminuindo-os ou mesmo neutralizando-os.

Os processos até agora utilizados para um isolante rápido destas proteínas (Tait, J.F.et al. (1988) Biochemistry 27, 6268-6276) não são adequados para um isolante técnico das mesmas.

O objectivo desta invenção foi por isso o desenvolvimento de um processo para a purificação das



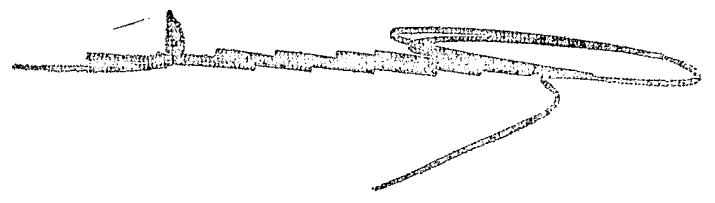
proteínas PP4-X, PAP III, p68, ancorina II e lipocortinas I e II.

Descobriu-se então surpreendentemente que estas proteínas, na presença de cálcio, apresentam afinidade para esteres do ácido poli-sulfúrico de sacáridos ou para açúcares sulfatados e se podem ligar a ésteres de ácido poli-sulfúrico de sacáridos suportados ou a açúcares sulfatados, não sendo absorvida a maior parte das impurezas proteicas. A absorção das lipocortinas pode assim efectuar-se numa coluna ou num reactor descontinuo.

O objectivo da presente invenção é um processo para a obtenção de lipocortinas, caracterizado por se pôr em contacto uma solução contendo uma ou várias lipocortinas, na presença de iões cálcio, com um éster do ácido poli-sulfúrico de um sacárido suportado ou com um açúcar poli-sulfutado suportado, se separar a solução sobrenadante, se lavar, conforme o caso, o material de suporte carregado, se eluïrem as lipocortinas isoladamente, em grupos, ou na totalidade, por aumento da força iónica.

Um dos modos de execução do processo consiste em pôr em contacto uma solução de 0.01-50 mg/ml de uma lipocortina, de pH 5.5-9.5, contendo 0.0001-0.1 mol/l de iões cálcio, por exemplo na forma de cloreto, acetato ou lactato, com um éster do ácido poli-sulfúrico de um sacárido, ligado a um suporte, ou com um açúcar sulfatado, por exemplo heparina, sulfato de dextrano, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de queratano ou sulfato de dermatano, ligado a um suporte, separar a solução sobrenadante, lavar, conforme o caso, o material de suporte carregado, com um tampão de pH 5.5-9.5, contendo 0.0001-0.1 mol/l de cálcio, e eluir a lipocortina por meio de um gradiente linear de NaCl-, LiCl- ou KCl.

No caso das Lipocortinas existirem misturadas em solução, podem também eluir-se em grupos ou na totalidade.



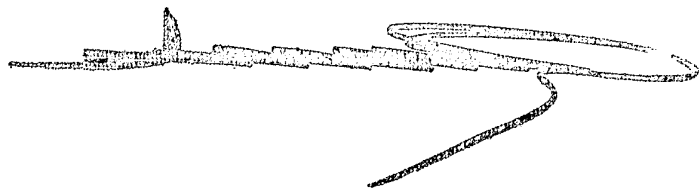
Como matriz de suporte insolúvel em água, à qual se liga o éster do ácido poli-sulfúrico de um sacárido ou um açúcar sulfatado, de modo covalente, pode utilizar-se por exemplo dextrano insolúvel, agarose, acrilamida, um polímero amino-funcionalizado e/ou copolímeros do polietileno glicol, pentaeritritol e metacrilato ou ainda combinações destes. O acoplamento do éster do ácido poli-sulfúrico de sacáridos ou de açúcares sulfatados pode efectuar-se de acordo com métodos conhecidos, p. ex. por meio de suportes pré-activados com CNBr ou epóxido, ou por meio de carbodiimida em suportes amino-funcionalizados.

Numa forma preferencial de execução do processo põe-se em contacto uma solução contendo uma lipocortina ou uma solução contendo uma combinação destas proteínas ou todas estas proteínas, na presença de 0.0002-0.03 mol/l de cálcio, a pH 6-9, com heparina ou sulfato de dextrano suportados, de preferência com uma resina de afinidade para a heparina, incuba-se a mistura durante 3-300 min a 4°-30°C, separa-se a solução sobrenadante da resina de suporte, lava-se o adsorvente, conforme o caso, com uma solução a pH 6-9 contendo 0.0002-0.03 mol/l de cálcio, e eluem-se as proteínas isoladamente por aumento de condutividade, de preferência por meio de um gradiente salino linear, em grupo por meio de uma eluição em passos, ou na totalidade, de preferência por aumento da concentração salina a 0.6-1.0 mol/l de Na Cl, KCl Li Cl ou de um sal do ácido cítrico.

Em alguns casos pode seguir-se uma purificação posterior dos lipocortinas isoladamente ou em conjunto. Para tal existem as seguintes possibilidades:

1. Re-cromatografia com um outro éster do ácido poli-sulfúrico de um sacárido ligado a um suporte ou com um outro açúcar sulfatado.

2. Remoção do sal ou dos íons cálcio, por exemplo por diálise, e cromatografia com um éster do ácido poli-sulfúrico de um sacárido ligado a um suporte ou com um açúcar sulfatado, na ausência de cálcio ou na presença de



um reagente quelante como EDTA, EGTA ou um sal do ácido cítrico ou do ácido oxálico.

3. Cromatografia de permuta iônica, por exemplo com carboximetil-, DEAE-, QAE-^RSephacel ou Celulose (Firma Pharmacia, Suécia).

O processo de acordo com a invenção distingue-se por se poderem isolar as proteínas PP4-X, PAP III, p68, ancorina II e Lipocortinas I e II, em poucos passos, com uma elevadíssima pureza e bom rendimento mesmo em larga escala industrial.

Para o isolamento à escala industrial destas Lipocortinas a principal matéria prima é a placenta humana, que existe à disposição em quantidades suficientes e que contém estas proteínas em grandes quantidades. Para a purificação de ancorina II utilizam-se principalmente os fibroblastos especialmente ricos nesta proteína.

Lista das abreviaturas:

EDTA: ácido etilenodiamianotetraacético

EGTA: ácido bis(aminoetil)-glicoléter-N,N,N',N'-tetraacético

DEAE: dietilaminoetilo

QAE: aminoetilo quaternário

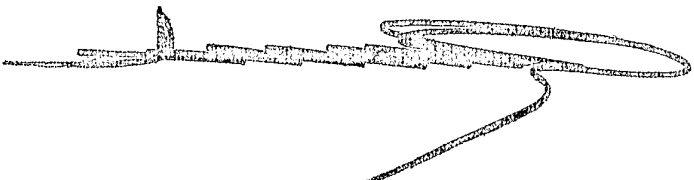
PP4-X: proteína placentária

PAP: proteína anticoagulante placentária

Os exemplos seguintes destinam-se a ilustrar a invenção:

Exemplo 1

Pulverizaram-se 36 Kg de placenta humana madura. Lavaram-se várias vezes com uma solução de 0,9g/100 ml de NaCl e Liofilizaram-se em seguida. Extraíu-se o liofilizado (3Kg) com 50 l de uma solução de 0.02 mol/l de Tris/HCl, pH 7.5, 0.15 mol/l de NaCl e 0.1 M de Tri-Citrato de sódio, adicionou-se sulfato de amônio (saturado a 33%) e incubou-se com 4 l de fenil-sepharose num processo descontí-



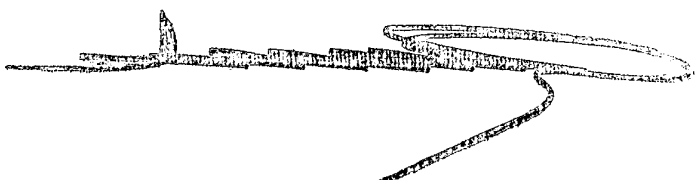
nuo ("batch"). Após lavagem da resina, eluíram-se as Lipocortinas com água à ebulição, precipitaram-se por adição de sulfato de amônio a 80% de saturação, peletizaram-se por centrifugação, tomaram-se numa solução de 0.02 mol/l de Tris/HCl, pH 8.0 (tampão A) e dialisaram-se contra o mesmo tampão. Após adição de CaCl_2 até uma concentração final de 0.05 mol/l adicionaram-se ao dialisado, num processo descontínuo, 11 de heparina-^RSepharose, agitou-se durante 60 min. à temperatura ambiente e separou-se a solução sobrenadante. lavou-se depois o adsorvente com o tampão A, sob adição de 0.005 mol/l de CaCl_2 e pré-eluiu-se com 0.06 mol/l de NaCl. As proteínas PP4-X, PAP III, p68 e as Lipocortinas I e II eluíram-se juntamente, no mesmo ensaio, com 0.8 mol/l de NaCl.

Após diálise deste eluído contra tampão A removeram-se as impurezas ainda restantes, pondo em contacto, após adição de EDTA até uma concentração final de 0.001 mol/l, a solução proteica, com 200 ml de heparina-^RSepharose, equilibrada com 0.02 mol/l de Tris/MCl, pH 8.0 e 0.001 mol/l de EDTA, agitando durante 60 min. à temperatura ambiente e separando a camada sobrenadante que contém as proteínas e Lipocortinas. As proteínas e Lipocortinas purificadas deste modo apresentaram-se em electroforese de gel de poliacrilamida SDS (PAGE) bandas correspondentes ao peso moleculares de 33KD (PP4-X), 34KD (PAP III), 68KD (p68), 36KD (Lipocortina I) e 37KD (Lipocortina II, cadeia pesada) e 10KD (cadeia leve). O isolante de cada uma das proteínas individualmente efectuou-se por meio de cromatografia de permuta iónica, como descrito no exemplo 2.

Os rendimentos das proteínas individuais situaram-se entre 70 e 90%, em relação ao eluído da fenil-^RSepharose.

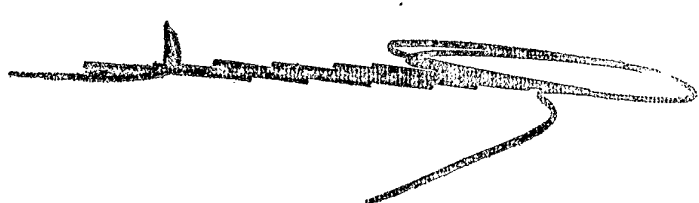
Exemplo 2

Pôs-se em contacto uma solução contendo PP4-X, PAP III, P68, e Lipocortinas I e II, como a desta no exemplo 1, com heparina-^RSepharose, e lavou-se em seguida



o absorvente. Eluíram-se separadamente, por eluição em passos, PP4-X (0.35 mol/l de NaCl) e PAP III (0.48 mol/l de NaCl). As Lipocortinas I e II e p68 eluíram-se em conjunto com 0.8 mol/l de NaCl. Libertaram-se a PP4-X ou PAP III ou p68, as Lipocortinas I e II, das restantes impurezas, como descrito no exemplo 1. A posterior purificação das proteínas eluídas com 0.8 mol/l de NaCl efectuou-se por cromatografia de permuta iónica:

Dialisou-se a solução contendo p68, Lipocortina I e II, contra tampão A e bombeou-se para uma coluna de DEAE-^RSepharose, equilibrada em tampão A. A proteína p68 absorvida eluiu-se com um gradiente de NaCl. As Lipocortinas I e II não absorvidas nesta cromatografia dialisaram-se contra um tampão de 0.01 mol/l de imidazole/HCl, pH 6.0, puseram-se em contacto, sob agitação, com carboximetilcelulose, lavou-se em seguida o absorvente e colocou-se numa coluna. As Lipocortinas I e II separaram-se por eluição com um gradiente linear de sol de 0-0.7 mol/l de NaCl. As Lipocortinas assim purificadas tinham uma pureza 795% e apresentaram na electroforese SDS-PAGE as bandas de peso molecular descritas no exemplo 1.



REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a purificação de lipocortinas, caracterizado por se pôr em contacto uma solução contendo um ou várias lipocortinas, na presença de iões cálcio, com um éster do ácido poli-sulfúrico de um sacárido ou com um açúcar poli-sulfatado, ligado a um suporte, se separar a solução sobre-nadante, se lavar, conforme o caso, o material de suporte carregado, e se eluïrem as lipocortinas isoladamente, em grupos ou na totalidade por aumento da força iônica.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as lipocortinas a purificar serem a PP4-X, PAP III, p68, ancorina II ou lipocortina I ou II.

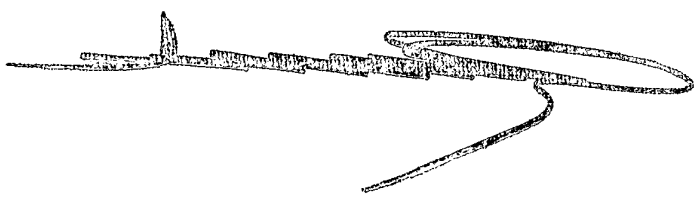
- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se purificarem posteriormente as lipocortinas na ausência de iões cálcio ou na presença de um excesso de um reagente quelante, por absorção das restantes impurezas a um éster poli-sulfúrico de um sacárido ou a um açúcar sulfatado, e separação da solução contendo as lipocortinas.

- 4ª -

Processo de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 e 3, caracterizado por o material de suporte utilizado para a purificação de lipocortinas ser dextrano insólúvel, agarose, poliacrilamida, um polímero insólúvel amino-funcionalizado ou um copolímero de polietilenoglicol, pentaeritritol e metacrilato, ou uma combinação destes.

- 5ª -



Processo de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 e 3, caracterizado por o éster polisulfúrico de um sacárido ser heparina, sulfato de dextrano, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de queratano ou sulfato, de dermatano.

- 6ª -

Processo de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 e 3, caracterizado por se utilizar para a purificação de lipocortinas heparina ou sulfato de dextrano ligados a um suporte.

- 7ª -

Processo de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 e 3, caracterizado por se utilizar para a purificação de lipocortinas heparina ligada a um suporte.

- 8ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se conduzir o processo para a purificação de lipocortinas num tampão de pH 5,5 a 9,5, contendo íons cálcio numa concentração de 0,001 e 0,1 mol/l.

- 9ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se utilizar, para a purificação de lipocortinas, como reagentes quelante EDTA, EGTA, um sal do ácido cítrico ou do ácido oxálico, ou uma combinação destes.

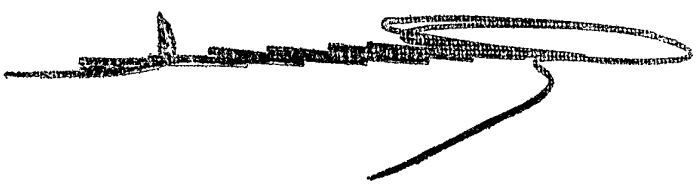
- 10ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se utilizar como reagente quelante EDTA ou EGTA.

A requerente reivindica a prioridade
do pedido alemão apresentado em 27 de Novembro de 1989, sob
o Nº P 39 39 169-8.

Lisboa, 26 de Novembro de 1990
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in dark ink, consisting of several fluid, connected strokes. The signature is positioned below the typed text of the official's name.



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PURIFICAÇÃO DE LIPOCORTINAS"

A invenção refere-se a um processo para a purificação de lipocortinas, que compreende pôr-se em contacto uma solução contendo uma ou várias lipocortinas, na presença de iões cálcio, com um éster do ácido poli-sulfúrico de um sacárido ou com um açúcar poli-sulfatado, ligado a um suporte, se separar a solução sobrenadante, se lavar, conforme o caso, o material de suporte carregado, e se eluïrem as lipocortinas isoladamente, em grupos ou na totalidade, por aumento da força iônica.