

(11) *Número de Publicação:* **PT 92187 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C07K016/06 A

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.11.03	(73) <i>Titular(es):</i> BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT - D-3550 MARBURG/LAHN DE
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.11.05 DE 3837623	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.05.31	(72) <i>Inventor(es):</i> KLAUS BOSSLET DE HANS HARALD SEDLACEK DE HERBERT WEGAND DE SILKE BOSSLET DE
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 12/94 1994.12.19	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT
(54) <i>Epígrafe:</i> PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NEOGLICOPROTEÍNAS E DE AGENTES DE DIAGNÓSTICO QUE AS CONTÊM	

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 92 187

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

EPÍGRAFE: “PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NEOGLICOPRO-
TEINAS E DE AGENTES DE DIAGNÓSTICO QUE AS
CONTÊM”

INVENTORES: Prof. Dr. Herbert Wiegand, Silke Rosslet,
Dr. Klaus Rosslet e Dr. Hans Harald Sedlacek.

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

República Federal Alemã em 5 de Novembro de 1988, sob o N.º. P 38 37 623.7.



Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, Alemanha Ocidental, (inventores: Prof. Dr. Herbert Wiegand, Silke Rosslet, Dr. Klaus Rosslet e Dr. Hans Harald Sedlacek, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NEOGLICOPROTEINAS E DE AGENTES DE DIAGNÓSTICO QUE AS CONTÊM".

Descrição

A presente invenção refere-se à síntese e utilização de neoglicoproteínas. A monosialolactose e a disialolactose são isoladas de colostro de vaca e são acopladas à albumina de soro humano (HSA) como proteína veículo, por meio de um reagente de acoplamento. Estas neoglicoproteínas são apropriadas como vacinas e ainda também como ligantes para a localização e a terapia de tecidos de tumores capazes de exprimir a lectina.

Os gangliósidos, isto é, os glicoesfingolípidos contendo ácido sialínico, são lípidos da membrana do plasma que consistem numa parte hidrófoba de cerâmica, e numa parte hidrófila de carbohidrato. Com a parte ceramida, que é composta por esfingosina e um ácido gordo de cadeia longa, estão ligados glicoesfingolípidos na membrana de plasma exterior de tal modo que as cadeias de oligossacarídeo se projectam para o espaço extracelular. Devido ao facto de formarem sobre a superfí-



cie das células padrões de diferenciação das células e específicos das espécies, admite-se que lhes caiba uma função biológica importante na história das células.

Os glicosfingolípidos são típicos de todas as células de mamíferos, mas na maioria dos casos estão presentes apenas em pequena quantidade. No entanto concentram-se nas membranas de plasma dos neurónios especialmente glicosfingolípidos contendo ácido sialínico, isto é, gangliósidos. Os gangliósidos também são expressos fortemente sobre as superfícies de células de tumores de origem neuroectodérmica (tais como melanomas, astrocitomas, neuroblastomas, etc.). Neste caso trata-se em parte de gangliósidos que só estão presentes em quantidades relativamente pequenas sobre células normais de mamíferos, mas também no cérebro e sobre as fibras nervosas. Por esta razão os gangliósidos referidos GM2, GM3, GD2 e GD3, tornaram-se interessantes como antígenos associados a tumores. Também se investiga, por parte de diversos grupos de trabalho, a possibilidade de uma imunoterapia de tumor no caso de tumores de origem neuroectodérmica, com estes gangliósidos como antígenos visados. Até agora investigam-se com algum êxito duas pistas diferentes:

- 1ª utilização de anticorpos monoclonais que se dirigem contra os correspondentes gangliósidos e
- 2ª imunização activa com os correspondentes gangliósidos.

As investigações mostraram que os anticorpos não podem ser provocados contra o gangliósido GM2 purificado em pacientes com melanoma. Somente a utilização de adjuvantes, como o bacilo Calmette-Guerin (BCG) ou Salmonella minnesota, assim como um tratamento prévio dos pacientes com ciclofosfamida, induzem anticorpos IgM contra o gangliósido GM2 (Livingston et al (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 2911-1915). Também uma vacina de células inteiras, constituída por linhas de células de melanoma ou de astrocitoma, humana ou murínicas, que possuíam um elevado teor de gangliósidos GM2, foram injectadas em pacientes com melanoma e conduziram a uma indução de anticorpos anti-GM2 do isotipo IgM (Livingston et al, obra citada acima).

Os estudos realizados até ao presente em pacientes com melanoma mostraram que um título elevado de anticorpos contra o gangliósido GM2 está correlacionado com um tempo de sobrevivência prolongado.

Os problemas centrais na construção de uma vacina de gangliósido purificado, bem como o seu difícil isolamento. Sabe-se ainda que a fracção açúcar dos gangliósidos GM3 e GD3, a monosialolactose ou dissialolactose, são facilmente obtidas a partir do colostro de vaca. Descobrimos que a monosialolactose ou a dissialolactose, acopladas a HSA por meio de um reagente de acoplamento, reagem com anticorpos monoclonais que foram produzidos contra os gangliósidos GM3 ou GD3 respectivamente. Pelo contrário, as neoglicoproteínas acima citadas estão em condições de produzir anticorpos que reagem com os gangliósidos GM3 ou GD3 e são pois apropriadas como vacinas para a imunoterapia específica de tumores. Além disso também são apropriadas por exemplo como ligantes para a localização e a terapia de tecidos de tumores que exprimem a lectina.

Por consequência a presente invenção refere-se a:

- a) neglicoproteínas, compostas pela fracção açúcar de glicosfingolípidos, de preferência monosialolactose ou dissialolactose, com proteínas veiculos, entre as quais também enzimas, de preferência albumina de soro humano,
- b) ao processo para a sua preparação, partindo-se de preferência de colostro de vaca como fonte de açúcar,
- c) bem como a sua utilização como vacinas ou como agentes auxiliares de diagnose, por exemplo para a comprovação de gangliósidos em ensaios radioimunes competitivos no quadro do diagnóstico de tumores, bem como, como agentes terapêuticos ou agentes de diagnóstico em tumores que exprimem lectina.

A invenção é ainda elucidada pelos exemplos e pelas reivindicações.

Exemplos

- 1º Obtenção de monosialolactose e de dissialolactose a partir

do colostro de vaca

O colostro de vaca foi tratado de acordo com o método de v. Nicolai com pequenas modificações (v. Dissertation Universitat Bonn, 1971).

O colostro de vaca (10 litros) foi liberto da gordura por centrifugação e precipitou-se a proteína com 50 % de acetona a frio. Depois de nova centrifugação o sobrenadante foi evaporado em evaporador rotativo até um décimo do volume original.

A fracção bruta foi submetida à remoção dos sais através de uma coluna com Sephadex G-15 e as fracções positivas a açúcar e negativas a cloretos foram purificadas e concentradas. A separação dos açúcar individuais foi realizada por meio de permutores de iões através de uma coluna de DEAE-Sephadex A-25 em tampão 0,1 M tris/HCl, pH 7,5, com um gradiente de cloreto de sódio. As correspondentes fracções de açúcares foram purificadas, concentradas e eliminadas os sais, através de uma coluna de Sephadex G-15.

A pesquisa de açúcares nas fracções individuais das diversas fases do tratamento em coluna foi realizada com os testes de Ehrlich e Anthron, ou por separação por cromatografia de camada delgada em placas de sílica-gel com a mistura eluente piridina/acetato de etilo/ácido acético/água (6:3:1:3) e pulverização das placas com resorcina.

2º acoplamento da monosialolactose e da disialolactose sobre albumina de soro humano (HSA) por meio do reagente de acoplamento SPDO

Para o acoplamento de açúcares e proteínas há em princípio várias possibilidades. Assim, por exemplo, os açúcares podem ser acoplados directamente aos grupos epsilon-aminolisilo livres de proteína, sem a utilização, mas também através da utilização de reagentes de acoplamento homobifuncionais ou heterobifuncionais.

A seguir são descritas as reacções de acoplamento com utilização de 3-(2-piridiltio)-propionato de N-suc-

cinimidilo (SPDP) como reagente de acoplamento. Os passos da reação correspondem genericamente ao método já divulgado (J. Carlsson et al (1978), Biochem. J. 173, 723-737).

a) redução-animação da monosialolactose ou disialolactose

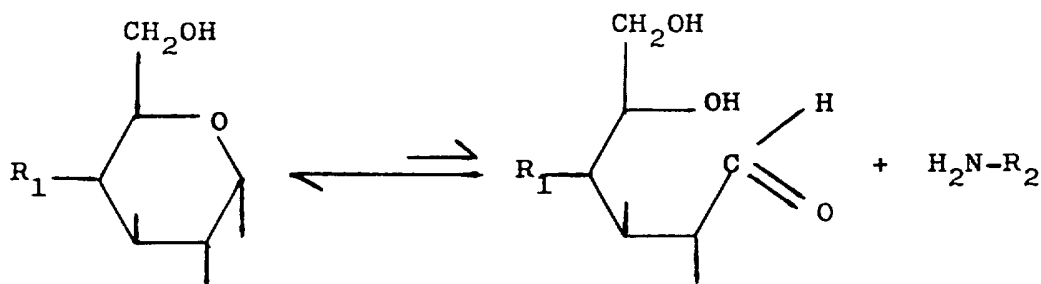
De acordo com o método de Wiegandt, a monosialolactose foram submetidas a redução-aminação, em solução metanólica de acetato de amônio, com adição de cianoborohidreto de sódio, no átomo C₁ da glucose (H. Wiegandt. W. Ziegler (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol, Chem. 355, 11-18).

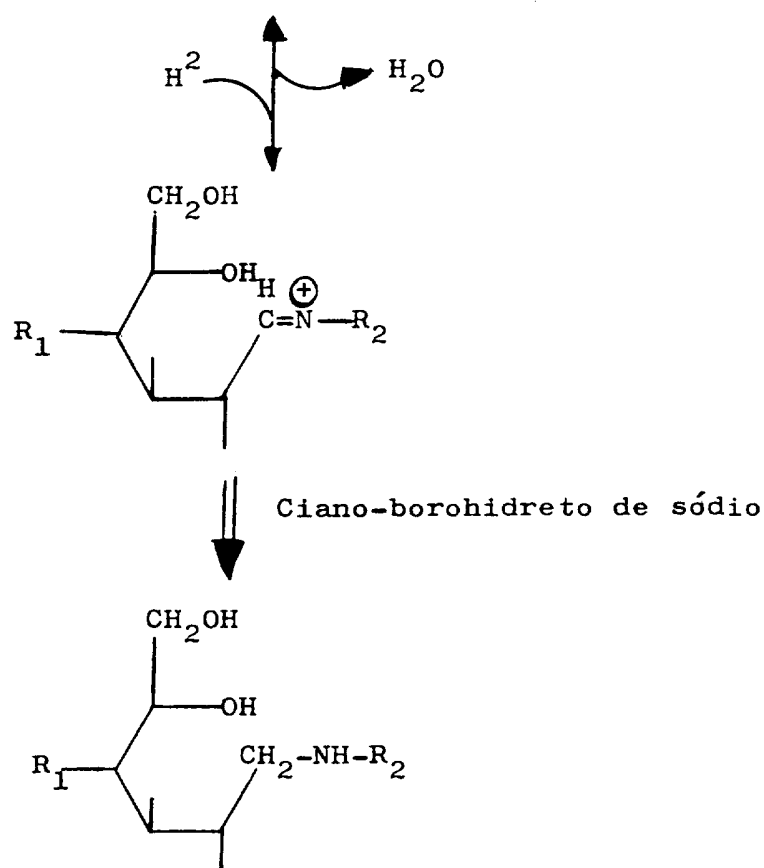
O derivado de açúcar reduzido-aminado foi purificado através de uma coluna de Biogel P2.

Definem-se em seguida R₁ e R₂ do seguinte modo:



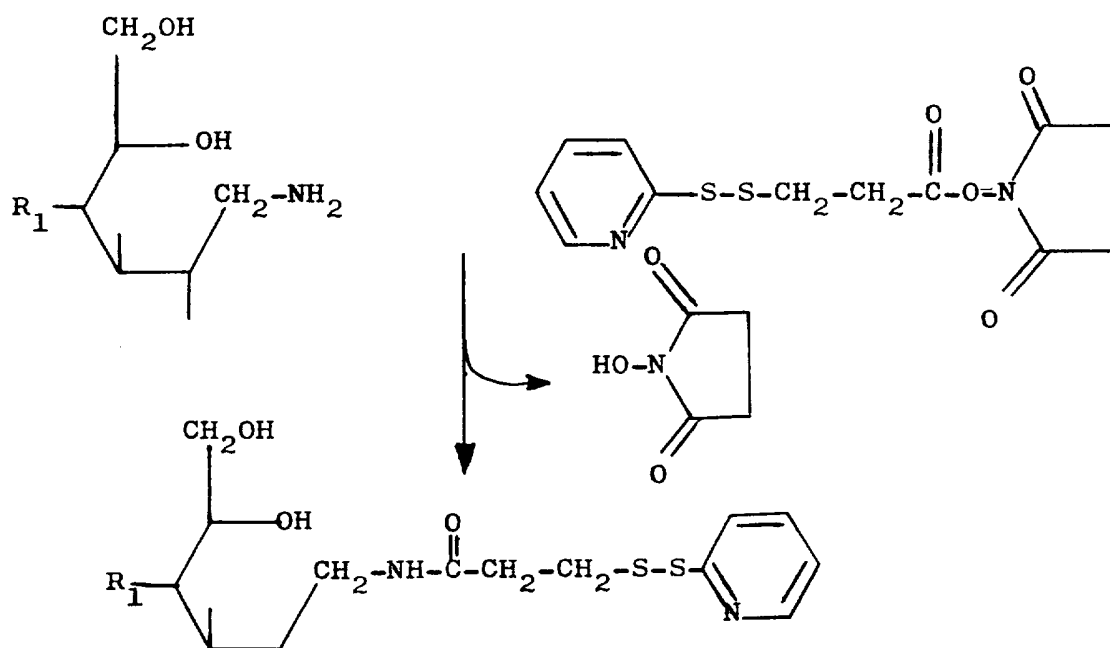
Abreviaturas: Gal: galactose
NeuAc: ácido N-acetilneuramínico





b) Reacção do açúcar reduzido-aminado com SPDP

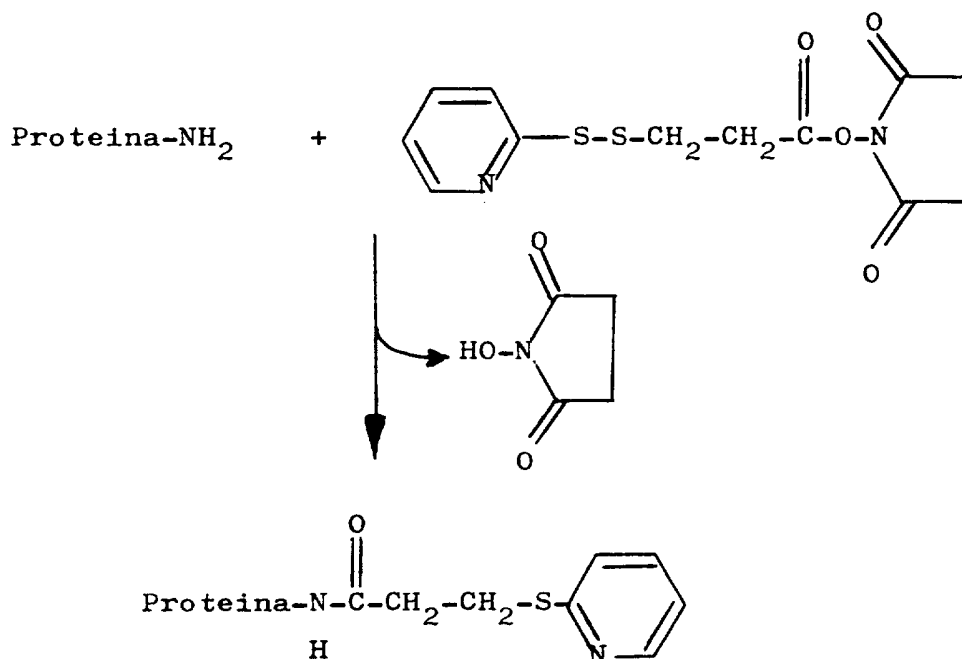
A formação do derivado foi realizada em tampão de fosfato de sódio 0,1 M + cloreto de sódio 0,1 M, pH 7,5, com um excesso 3 a 5 vezes molar de SPDP. O tempo de reacção à temperatura ambiente foi de 2 a 12 horas.



O derivado açúcar-NH₂-SPDP foi separado da N-hidroxissuccinimida e do SPDP reagido através de uma coluna de Biogel P2. No caso de se formarem impurezas de SPDP do derivado realizou-se um passo adicional de purificação através de uma coluna de sílica-gel que foi eluída com uma mistura de dissolventes de polaridade crescente.

c) Reacção de HSA com SPDP

A formação de derivado de proteína foi realizada nas mesmas condições que a formação de derivado de açúcar, em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, com um excesso 3 a 5 vezes molar de SPDP referido aos grupos epsilon-aminolisilo livres.

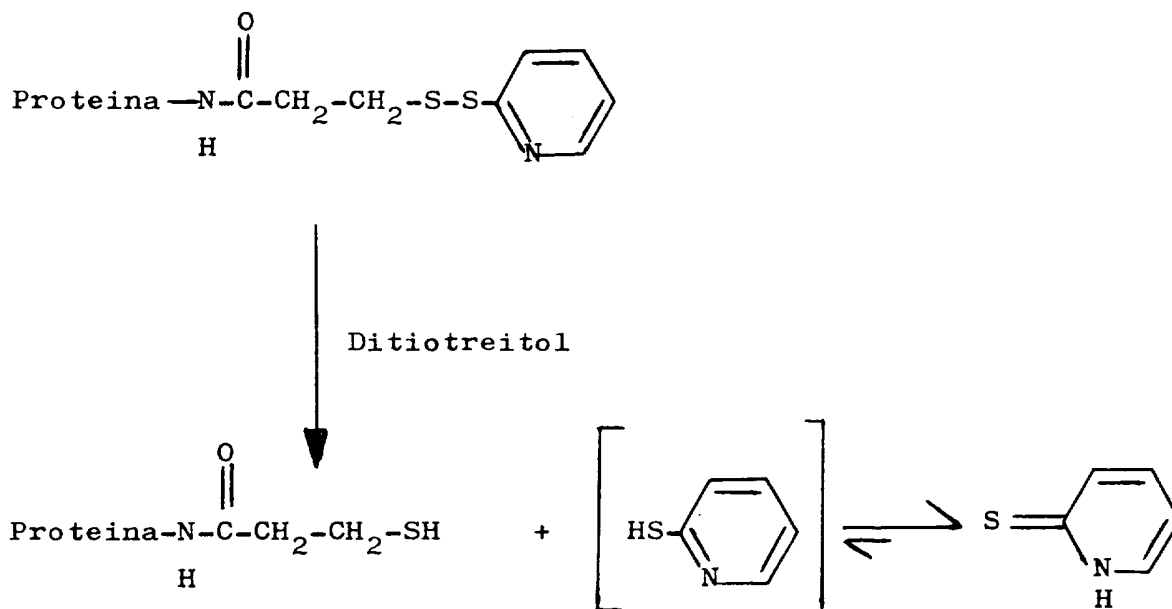


A separação do derivado proteína-SPDP é realizada através de uma coluna de Sephadex G-25 que foi eluída com o tampão para as reacções subsequentes (tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 6, EDTA 5 mM).

d) Redução do derivado HSA-SPDP

Mediante a adição de 25 mM de ditioneitol reduziram-se as pontes de dissulfureto do derivado HSA-SPDP, introduzidas de novo pela formação do derivado, em tampão fosfato de sódio 0,1 molar, pH 6, 5 mM EDTA, com dissociação de 2-tio-

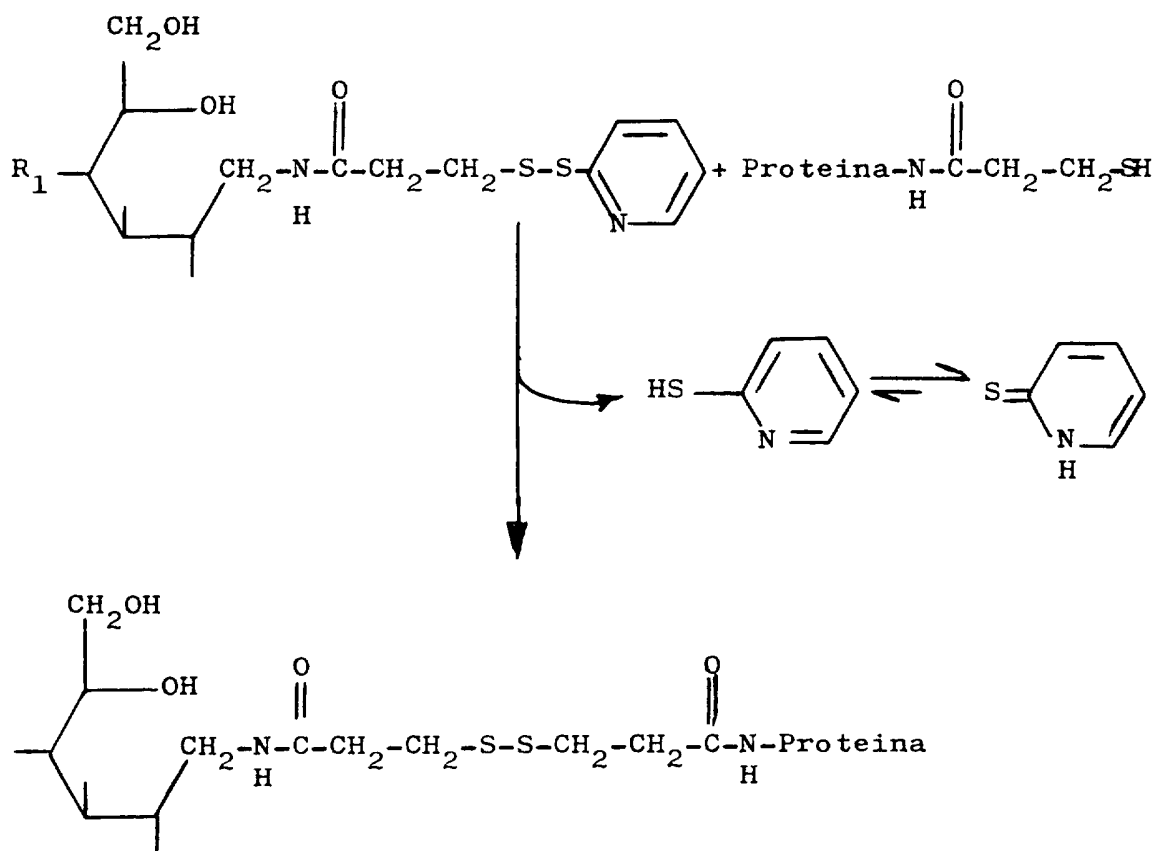
piridona. Nestas condições da reacção não são reduzidas as pontes de dissulfureto nactivas da proteína. A reacção é realizada à temperatura ambiente e o tempo de reacção é de 1 a 2 horas.



A separação do derivado reduzido de HSA-SPDP é realizada através de uma coluna de Sephadex G-25 com tampão de fosfato de sódio 0,1 molar, pH 6, 5 mM EDTA como tampão de eluição.

e) Acoplamento do derivado de açúcar e de proteína

O derivado reduzido HSA-SPDP foi submetido imediatamente a reacção com o derivado açúcar-NH₂-SPDP: o derivado açúcar-NH₂-SPDP foi utilizado num excesso de 2 a 5 vezes molar, referido aos grupos epsilon-aminolisilo da proteína, e o tempo de reacção foi de 24 a 48 horas à temperatura ambiente.



O produto de acoplamento ou a neoglicoproteína foi separada dos restantes produtos de reacção por cromatografia de coluna através de Sephadex G-25.

No processo descrito acoplam-se açúcares reduzido-aminados através de SPDP aos grupos epsilon-aminolisilo livres da proteína. Como alternativa podem também ser reduzidas as pontes de dissulfureto da proteína e acoplar-se o açúcar reduzido-aminado através de SPDP aos grupos sulfidridlo, agora livres, do radical cisteína.

3º Métodos de comprovação para identificação dos produtos intermediários

Utilizaram-se os seguintes métodos de comprovação, conforme apropriado, para identificação dos produtos intermediários:

A) Para monosialolactose ou disialolactose e os correspondentes derivados

a) Comportamento de eluição modificado em cromatografia de camada delgada depois da redução-aminação, e for-

mação de derivados de SPDP sobre placas de sílica-
-gel G-60 nos eluentes:

piridina/acetato de etilo/ácido acético/água
(6:3:1:3)

clorofórmio/metanol/cloreto de cálcio, solução aquo-
sa 0,2 % (60:35:8) e aptidão à coloração das bandas
com vapor de iodo, ninhidrina e resorcina.

- b) Quantificação da obtenção de derivados de SPDP por determinação ligeiramente modificada do ácido neuramínico com 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenzeno, (S. Hara et al, (1986) J. Chromatography 377, 111-119) e por dissociação de 2-tiopiridona com ditiotreitól. A quantidade de 2-tiopiridona libertada, que corresponde à quantidade de açúcar convertido em derivado de SPDP, pode ser determinada por medição do aumento da extinção no comprimento de onda de $\lambda = 343$ nm num fotómetro, e a concentração é então calculada com auxílio da lei de Lambert-Beer. O coeficiente de extinção molar para 2-tiopiridona a $\lambda = 343$ nm é de $7,06 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (D. R. Grassetti & J.F. Murray (1967) Arch. Biochem. Biophys, 119, 41-49).
- c) Análise de cromatografia em fase gasosa (GC) dos derivados de açúcar individuais, depois da redução-aminação, e obtenção de derivados de SPDP de acordo com J. Lechner et al (1985) J. Biol. Chem. 260, 860-866.

B) Para HSA

- a) A determinação da proteína foi realizada com o Bio-Rad Protein Assay.
- b) A formação de derivados de SPDP foi quantificada por determinação da proteína com o Bio-Rad Protein Assay e por dissociação de 2-tiopiridona com ditiotreitól. A 2-tiopiridona libertada, que corresponde à quantidade de SPDP ligado, foi determinada pelo acréscimo de extinção ao comprimento de onda $\lambda = 343$ nm em fotómetro, e calculou-se a concentração com o auxílio da lei de Lambert-Beer. O coeficiente de ex-

tinção molar para 2-tiopiridona e $\lambda_{\text{max}} = 343 \text{ nm}$ é de $7,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Grasseti & Murray, ver obra citada acima)

- c) A HSA e o derivado HSA-SPDP mostram na electroforese por SDS-gel, colorida com azul de Coomassie, diversos comportamentos de eluição.

4º Síntese do conjunto disialolactose-HSA

Num preparado de ensaio característico submeteram-se a redução-aminação 10 mg (10,75 μmol) de disialolactose em 2 ml de uma solução metanólica de acetato de amónio, com adição de 20 mg de cianoborohidreto de sódio. O açúcar reduzido-aminado purificado através de uma coluna de Biogel-P2, foi em seguida submetido a reacção com 13 mg de SPDP, dissolvidos em 1050 μl de etanol, em 13 ml de tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, e o derivado disialolactose- NH_2 -SPDP foi purificado através de uma coluna de Biogel-P2 e de uma coluna de sílica-gel. O rendimento, medido por determinação de ácido neuramínico com 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenzo e por dissociação de 2-tiopiridona com ditioteitol, foi de cerca de 50% (4,8-5,2 μmol) de quantidade utilizada de disialolactose.

Para a formação de derivados de HSA 5,6 mg de SPDP foram dissolvidos em 450 μl de etanol e adicionados a 6mg de HSA em 5550 μl de tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5. Depois da purificação através de uma coluna de Sephadex G-25 obtêm-se cerca de 4,8 mg do derivado HSA-SPDP com uma taxa de derivação de 45-53 moléculas de SPDP por molécula de HSA.

As pontes de dissulfureto introduzidas de novo no derivado HSA-SPDP foram dissociadas em tampão de fosfato de sódio 0,1 M + 5 mM EDTA, pH 6, com 25 mM de ditiotreitól. O tempo de reacção à temperatura ambiente foi de 1 hora. Depois da purificação através de uma coluna de Sephadex G-25, o derivado reduzido de HSA-SPDP foi imediatamente submetido a reacção com o derivado disialolactose- NH_2 -SPDP em tampão de fosfato de sódio 0,1 M + 5 mM EDTA, pH 6. A reacção de acoplamento pôde ser acompanhada fotometricamente pelo aumento de extinção ao comprimento de onda $\lambda = 343 \text{ nm}$ devido à dissociação

da 2-tiopiridona. Depois de 24 a 48 horas já não se obtinha aumento de extinção, e a reacção de acoplamento estava terminada.

Depois da purificação do produto de acoplamento através de uma coluna de Sephadex G-25, obtiveram-se 2,1 a 2,5 mg do conjugado disialolactose-HSA, que apresentava uma taxa de derivação de 30 a 33 moléculas de disialolactose por molécula de HSA.

O grau de derivação do produto de acoplamento foi determinado por 1º) determinação da proteína com o Bio-Rad Protein Assay, e 2º) a) por determinação de ácido neuramínico do produto de acoplamento com 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenzo, b) por cálculo da concentração de 2-tiopiridona libertada (no último passo de acoplamento) por medição da extinção ao comprimento de onda $\lambda = 343$ nm e introdução do correspondente parâmetro na fórmula de Lambert-Beer, e c) por determinação da concentração de derivado disialolactose-NH₂-SPDP recuperado, não reagido, com os métodos citados em a) e b).

5º Reacções imunológicas do conjugado disialolactose-HSA

O produto de acoplamento (conjugado disialolactose-HSA) foi em seguida ensaiado no Bio-Dot-Assay com anticorpos anti-GD3 monoclonais: tanto o mab 704/16 como o mab 624/253 (ambos dirigidos contra o gangliósido GD3) reagiram com a neoglicoproteína.

Também se pode verificar, de acordo com a electroforese em SDS-gel, em condições não redutoras, e em seguida um ensaio Western-Blot, a reacção do anticorpo monoclonal mab 704/16 e mab 625/253 com o conjugado disialolactose-HSA.

Os ensaios de imunização em ratos mostraram que o conjugado disialolactose-HSA é essencialmente mais imunógeno do que o gangliósido GD3, isto é, causa uma resposta imune humoral mais forte.



R E I V I N D I C A Ç Ã O

- 1ª -

Processo para a preparação de neoglicoproteínas, caracterizado pelo facto de se acoplar a fracção açúcar de glicosfingolípido a proteínas veículo por meio de um reagente de acoplamento.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o reagente de acoplamento originar uma ligação covalente.

- 3ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se utilizar como fracção açúcar a monosialolactose ou a disialolactose.

- 4ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo facto de se utilizar como proteína veículo albumina de soro humano (HSA).

- 5ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo facto de se utilizar como fonte de açúcar colostro de vaca.

- 6ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo facto de se utilizar como reagente de acoplamento 3-(2-piridilditio)-propionato de N-succinimidilo (SPDP).

- 7ª -

Processo para a preparação de uma vacina caracterizado pelo facto de se incorporar como substância activa neoglicoproteínas, quando obtidas pelos processos das reivin-

- dicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, em combinação com substâncias veiculares e estabilizadores comerciais.

- 8ª -

Processo para a preparação de um agente de diagnóstico caracterizado pelo facto de se incorporar como ingrediente activo neoglicoproteínas, quando obtidas pelos processos das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 5 de Novembro de 1988, sob o No. P 38 37 623.7.

Lisboa, 3 de Novembro de 1989
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NEOGLICOPROTEINAS E DE AGENTES
DE DIAGNÓSTICO QUE AS CONTÊM"

A invenção refere-se a um processo para a
preparação de neoglicoproteínas, que compreende acoplar-se a
fracção açúcar de glicosfingolípido a proteínas veículo por
meio de um reagente de acoplamento.

•
•
•