



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 88208 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
C12N009/96 A C12N011/08 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1988.08.05	(73) <i>Titular(es):</i> RAMOT UNIVERSITY AUT.FOR APPL.RESE. IND.DEVEL LTD 32 UNIVERSITY STREET RAMAT AVIV, TEL AVIV. IL
(30) <i>Prioridade:</i> 1987.08.06 IL 83451	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.06.30	(72) <i>Inventor(es):</i> AMIHAY FREEMAN IL RUTH TOR IL
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 08/94 1994.08.22	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ENZIMAS ESTABILIZADOS

(57) *Resumo:*

[Fig.]

RAMOT UNIVERSITY AUTHORITY FOR APPLIED
RESEARCH AND INDUSTRIAL DEVELOPMENT LTD.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO
DE ENZIMAS ESTABILIZADOS"

A presente invenção refere-se a um produto enzimático estabilizado e a um método para a sua preparação. O produto enzimático estabilizado pode estar sob a forma de uma solução aquosa ou sob a forma de um produto liofilizado. O produto enzimático estabilizado de acordo com a presente invenção pode estar eventualmente estabilizado mediante imobilização.

LISTA DE REFERENCIAS:

1. Klibanov, A.M., Adv. Appl. Microb. 1983, 29, 1 - 28.
2. Martinek, K. e Berezin, I.V., J. Solid Phase Biochem. 1978, 2, 343 - 385.
3. Butler, L.G., Enzyme Microb. Thechnol., 1979, 1, 253-259.
4. Martinek, K., Klibanov, A.M. Goldmacher, V.S. e Berezin, I.V., Biochim. Biophys, Acta 1977, 485, 1 - 12.
5. Klibanov, A.M., Anal. Biochem. 1979, 93, 1 - 25.
6. Schmid, R.D. Adv. Biochem. Eng. 1979, 12, 41 - 118.
7. Back, J.R., Oakenfull, D. e Smith, M.B., Biochemistry 1979, 18, 5191 - 5196.
8. Tonchilin, V.P. e Martinek, K., Enzyme Microb. Technol. 1979, 1, 74 - 82.

9. Greco, e Gianfreda, L., Biotechnol. Bioeng. 1981, 23, 2199 - 2210.
10. Wykes, J.R., Dunill, P. e Lilly. M.D., Biochim. Biophys. Acta 1971, 250, 522 - 529.
11. Marshall, J.J., Trends in Biochem. Sci. 1978, 3, 79 - 83.
12. Lenders, J.P. e Crichton, R.R., Biotech. Bioeng. 1984, 26, 1343 - 1351.
13. Hixon, H.F., Biotech. Bioeng. 1973, 15, 1011 - 1016.
14. von Specht, B.U., Seinfeld, H. e Brendel. W., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1973, 354(s), 1659 - 1660.
15. Paz, M.A., Blumenfeld, O.O., Rojkind, M., Henson, E., Furfine, C., e Gallop, P.M., Arch. Biochem Biophys., 1965, 109, 548 - 559.
16. Gary W.L., Johnson, R.N. e Kho, B.T., J. Chromatog. 1978, 156, 285 - 291.
17. Freeman, A., Methods. Enzymol. 1987, 135, 216 - 222.
18. Collinson, E., Dainton, F.S. e McNaughton, G.S., Trans. Faraday. Soc. 1957, 53, 489 - 498.
19. Freeman, A. e Aharonowitz, Y., Biotech. Bioeng., 1981, 23, 2747 - 2759.
20. Reuveny, S., Mizrahi, A., Kotler, M. e Freeman, A., Biotech. Bioeng. 1983, 25, 469 - 480.
21. Blank-Koblenc, T., Tor, R e Freeman, A., Biotechnol. Appl. Biochem., 1988, 10, 32 - 41.
22. Nichols, C.S. e Cromartie, T.H., J. Chem. Educ. 1979, 56, 832 - 834.
23. Samuni, A., Anal. Biochem., 1975, 63, 17-26.

24. Malikkides, C.O. and Weiland, R.H., Biotech. Bioeng. 1982, 24, 1911 - 1914.
25. Freeman, A., Blank, T. e Haimovich, B., Annal. N.Y. Acad. Sci., 1983, 413, 557 - 559.
26. Goldstein, L. e Manecke, G., Appl. Biochem. Bioeng., 1976, 1, 23 - 126.
27. Dror, Y., Cohen, O. e Freeman, A., Enz. Microb. Technol., 1988, 10, 273 - 279.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Um dos problemas intrínsecos que frequentemente impede maior desenvolvimento de aplicações analíticas e sintéticas dos enzimas é a instabilidade inerente a muitos enzimas. Esta limitação é crucial especialmente no caso de aplicações que envolvem a exposição prolongada dos enzimas a elevadas temperaturas ou à presença de solventes orgânicos (referências 1, 2 e 3).

A perda das actividades enzimáticas pode resultar de diferentes factores que impõe o seu efeito através de mecanismos diferentes, sendo o desenvolvimento estrutural do enzima o mais frequente (referências 2 e 4).

A estabilização enzimática por meio de restrições impostas ao enzima, que limitam as suas grandes alterações de configuração foi tentada no passado através de uma das duas vias principais: rigidez da estrutura de proteína por ligação a pontos múltiplos, a suportes poliméricos insolúveis em água (referências 1, 2, 4 e 5), ou por meio de adição de diversas soluções (referências 6, 7, 8 e 9).

Diversas informações na literatura descrevem a ligação de polímeros solúveis em água a enzimas, visando a estabilização dos

enzimas na forma solúvel (para revisão consultar a referência 1). Assim, conjugados de polímero-enzima solúvel na água, preparados por meio de ligação dos enzimas a polissacáridos (referências 1, 10, 11 e 12), álcool polivinílico (referência 13), polivinilpirrolidona (referência 14) e ácido polimetacrílico (referência 4) têm sido descritos.

A estabilização eficaz de enzimas solúveis através desta via depende acentuadamente da obtenção de uma inter-acção intensa enzima-polímero multipontos, numa via complementar (referência 1 e 4). A eficácia destes conjugados enzima-polímero também depende da natureza química do radical polimérico que cria um microambiente hidrofílico ou carregado na vizinhança do enzima. O conjugado mais eficaz deste tipo parece ser o conjugado de quimiotripsina-ácido polimetacrílico, preparado por copolimerização do ácido metacrílico e de enzima tratado com cloreto de acrilóilo (referência 4). O derivado de enzima poli-aniónico resultante exibiu uma estabilidade comparável à estabilidade do enzima análogo envolvido por gel, preparado por copolimerização de metacrilamida ou acrilamida, com bisacrilamida e enzima tratado com cloreto de acrilóilo.

Resumo da Presente Invenção

De acordo com esta invenção, proporciona-se um produto enzimático solúvel na água, biologicamente activo estabilizado, caracterizado pelo facto de as moléculas enzimáticas possuírem uma estrutura protectora de duas camadas que compreende um revestimento de base de poli-aldeído ligado a grupos amino livres do enzima e sobre esta uma camada polimérica exterior reticulada, sendo os polímeros dessa referida camada exterior de uma espécie que no estado não li

gado abrange grupos amino livres e/ou grupos acil hidrazida.

A presente invenção também proporciona um método para a preparação de um produto enzimático activo biologicamente, estabilizado do tipo especificado, caracterizado pelo facto de, numa primeira fase, o produto de enzima natural reagir em solução aquosa com um excesso de um poli-aldeído solúvel em água para produzir um produto enzimático intermédio em que as moléculas do enzima estão revestidas com a referida camada de base de poli-aldeído e por numa segunda fase o referido produto enzimático intermédio reagir em solução aquosa com um reagente polimérico comportando grupos amino livres e/ou grupos acil hidrazina livres.

A estrutura protectora de duas camadas preparada de acordo com esta invenção será ocasionalmente referida aqui por "gaiola" (cage) e a sua produção por "engaiolamento". Esta proporciona diversas vantagens sobre a técnica anterior, tal como:

- o conceito de gaiola é geral e permite também a estabilização dos enzimas que suportam um pequeno número de resíduos lisilo. Este facto é devido a que o polialdeído utilizado na primeira fase amplifica o número total de fontes de reticulação formadas e, conseqüentemente, como distinto da técnica anterior (referência 4) o grau de estabilização não dependerá apenas do conteúdo de grupos lisilo do enzima (referência 4).

- o método de "engaiolamento" é baseado na utilização de reagentes poliméricos solúveis em água e é portanto virtualmente isento de efeitos tóxicos e inibidores que ocorrem quando reagentes de peso molecular reduzido têm que ser utilizados tais como por exemplo, cloreto de acrilóilo e acrilamida.

- O conceito de "gaiola" permite controlar o microambiente

do enzima "engaiolado" mediante modificação apropriada ou escolha da natureza química do reagente do polimérico utilizado na formação da camada exterior. Por exemplo, pode introduzir-se hidrofobia ou hidrofilia no referido reagente polimérico tal como requer a natureza da enzima ou o fim a que se destina.

- devido ao efeito associado de duas camadas de constituição da "gaiola". A estabilização da enzima é mais eficaz quando comparada com conjugados polímero-enzima com uma só camada.

A natureza dos reagentes na primeira e segunda fases referidas não é crítica. Assim, na primeira fase pode utilizar-se qualquer poli-aldeído solúvel em água susceptível de reagir com grupos amino livres formando parte de resíduos lisilo da enzima, sendo um exemplo típico o poliglutaraldeído. Do mesmo modo não é crítica na escolha do reagente polimérico solúvel em água a utilizar na segunda fase desde que este comporte grupos amino e/ou acil hidrazida livres, uma vez que são estes grupos que fazem reticulação com grupos carbonilo do revestimento com base de poli-aldeído.

Exemplos típicos de reagentes poliméricos utilizados na segunda fase são as poliacrilamidas, poliacrilamidas N-alquiladas, derivados de acil hidrazida ou de amina de poliacrilamidas, polivinil-hidrazidas, polivinilaminas, polilisina, diversas proteínas e outros.

Se apropriado um produto enzimático estabilizado com as moléculas da enzima "engaioladas" de acordo com a presente invenção pode ser depois estabilizada por meio de imobilização. Como a camada exterior da enzima estabilizada de acordo com a presente invenção é feita de poliacrilamida-amina ou derivados de acil hidrazida, a sua imobilização é facilmente obtida quer por ligação química quer por reticulação. Este último método é particularmente apropriado

uma vez que a solução de enzima estabilizada obtida no fim da segunda fase contém um grande excesso de polímero não ligado que pode ser utilizado para formar uma matriz mediante reticulação adequada.

A imobilização de enzimas por meio de matrizes de gel é conhecida e foi utilizada com sucesso para a imobilização de enzimas em gel de poliacrílamida-hidrazida reticulada com glioxal (referência 21 e 25).

Acredita-se que a estabilização de enzimas "engaioladas" de acordo com a presente invenção resulta de uma associação de dois efeitos, por um lado ocorre a supressão física do processo de desenvolvimento pela "gaiola" polimérica reticulada construída em volta da enzima. Por outro lado ocorre uma supressão química das altera^{ções} de configuração devido ao efeito de microambiente da fracção polimérica hidrofílica ligada.

Um período enzimático estabilizado de acordo com a presente invenção pode ser armazenado em solução aquosa ou liofilizado sob a forma de um pó seco e guardado como tal. Descobriu-se surpreendentemente que, de acordo com esta invenção a liofilização do produto enzimático "engaiolado" aumenta ainda mais a sua estabilidade. Além disso, a imobilização da enzima "engaiolada" liofilizada em glioxal reticulado com gel de poliacrílamida-hidrazida resulta numa ampliação máxima desta via de estabilização.

Os produtos enzimáticos estabilizados e eventualmente imobilizados de acordo com a presente invenção podem ser utilizados numa variedade de processos químicos catalisados pelas enzimas realizados de uma só vez ou continuamente.

Descrição dos Desenhos

Para maior compreensão da presente invenção esta será agora descrita através da referência aos desenhos anexados, em que:

- a figura 1, representa um diagrama de estabilização da estearase de fígado de porco mediante "engaiolamento" de acordo com a presente invenção expresso pela resistência a temperatura associada - efeitos de desnaturação de co-solvente por três solventes diferentes, em comparação com o comportamento da carboxilestearase natural sob condições semelhantes;

- a figura 2, representa um diagrama da estabilidade térmica de estearase de fígado de porco "engaiolada" liofilizada envolvida num gel de poliacrilamida-hidrazida, de acordo com a presente invenção, em comparação com o comportamento da estearase de fígado de porco natural sob condições idênticas; e

- a figura 3, é uma representação esquemática da formação de uma gaiola protectora de duas camadas de acordo com a presente invenção.

Descrição da Invenção

Foi estudada a estabilização de enzimas "engaioladas" de acordo com esta invenção em solução aquosa e na presença de solventes orgânicos miscíveis com a água. A estabilização para evitar a desnaturação por co-solventes orgânicos é de grande valor prático porque estes co-solventes podem ser utilizados para o reforço do substrato e solubilidades do produto e a inversão das vias de reação "naturais" (referência 3 e 21). O efeito de estabilização foi avaliado através da determinação da constante da taxa de inactivação (KINA) para as enzimas naturais e "engaioladas" (liofilizadas)

incubadas à temperatura de 55°C na presença de um co-solvente. Co-solventes que representam o grupo que exhibe apenas uma interferência moderada com a retenção da estabilidade da enzima na sua presença (por exemplo, etileno glicol, dimetil sulfóxido, referência 21), assim como co-solventes que exibem o efeito de desnaturação forte (por exemplo, etanol) foram utilizados e a estabilização de acordo com a presente invenção verificou-se ser eficaz com solventes de ambos os grupos.

Na figura 1, os círculos não a cheio representam, uma carboxilestearase "engaiolada" estabilizada de acordo com esta invenção e os círculos negros a cheio representam a enzima natural, sendo claro que a taxa de inactivação da primeira é muito menor que a taxa de inactivação da última. Esta estabilidade reforçada contra a desnaturação pelo etileno glicol, dimetil sulfóxido e etanol, permite um aumento significativo do conteúdo do co-solvente presente, sem prejudicar a actividade enzimática. Produtos enzimáticos estabilizados de acordo com esta invenção podem portanto ser utilizados com vantagem como catalisadores na realização das reacções em que são necessários dos co-solventes provenientes do exterior ou que se formam no decurso da reacção.

A figura dois indica que um produto enzimático imobilizado e "engaiolado" liofilizado de acordo com a presente invenção (círculos não a cheio) reteve a sua actividade para além de dezasseis dias, virtualmente sem qualquer alteração, enquanto que a da enzima natural (círculos a negro) decaiu bruscamente, no primeiro dia e a partir daí, essa actividade aproximou-se assintoticamente do valor zero.

Nestes testes as enzimas foram incubadas à temperatura de 55°C em tampão 0,05 M Tris, pH 8, e as actividades verificadas periodicamente.

A figura 3, representa esquematicamente a formação de um "engaiolamento" de duas camadas de acordo com a presente invenção, Como se mostra, na primeira fase uma molécula de enzima reage com um polialdeído para proporcionar uma enzima com um revestimento base. Este produto em seguida reage com um "polímero 2" solúvel na água e transportando grupos amino e/ou acil hidrazida, para formar uma enzima numa gaiola de duas camadas de acordo com a presente invenção.

A presente invenção será agora mais detalhada através da descrição dos exemplos seguintes que não são limitativos. Todas as indicações de temperatura são em graus centígrados.

EXEMPLO 1

Estabilização de glicose oxidase (E.C. 1.1.3.4) por engaiolamento de duas camadas.

1. Preparação de reagentes poliméricos :

a) glutardialdeído polimérico solúvel em água:

Num frasco de fundo redondo de 100 ml, à temperatura constante de 50°C, adicionaram-se 20 ml de K_2CO_3 1 M, pH 10, e em seguida 20 ml de glutardialdeído a 25% (p/v) (Merck, Cat Nº 4239). A reacção de polimerização ficou a processar-se durante duas horas à temperatura de 50° C. A mistura reaccional foi em seguida arrefecida para a temperatura ambiente e o pH corrigido para 7, mediante a adição de ácido clorídrico concentrado e os precipitados reti

rados por centrifugação a 7000 rotações por minuto durante 10 minutos. A solução restante foi em seguida adicionada com dez vezes o seu volume de acetona para eliminar o carbonato de potássio e os sais por precipitação. A solução foi em seguida separada, a acetona evaporada e a restante solução liofilizada e conservada à temperatura de -20°C (rendimento: 3,3 g correspondente a 66%).

O glutaraldeído polimérico solúvel na água obtido deste modo continha 0,35 milimoles de grupos aldeídicos por grama em peso seco, determinado de acordo com J.S. Tompson e G.D. Shockman, 1968 Analytical Biochemistry 22, 260 - 268 e os seus pesos moleculares avaliados, por filtração de gel (Biogel P-6) contra a padrões de proteína, em 1000.

b) Preparação de poliacrilamidas:

b-1) Poliacrilamida de peso molecular 8000:

Num frasco de fundo redondo de um litro, equipado com um agitador magnético, adicionaram-se 680 ml de água. A temperatura foi mantida a 4°C por meio de um banho de gelo e adicionaram-se 4 g (0,056 moles) de acrilamida monomérica sob atmosfera de azoto. A seguir à total dissolução do monómero, adicionaram-se 4,6 ml (0,034 mole) de N,N,N,N-tetrametiletelenodiamina e em seguida imediatamente 20 ml de persulfato de amónio 0,8777M (4g em 20 ml). A reacção de polimerização ficou a processar-se durante uma hora sob gelo e atmosfera de azoto.

A solução de polímero foi em seguida adicionada gota a gota a 3,5 litros de metanol arrefecido em gelo, o precipitado separado por filtração, conservado durante a noite à temperatura de

4°C sob metanol, separado e seco num evaporador rotativo durante 30 minutos à temperatura de 40°C. O polímero foi finalmente seco sobre vácuo em P₂O₅. O polímero seco foi conservado num vaso fechado cuidadosamente à temperatura ambiente (rendimento 3,2 g correspondente a 80%).

b-2) Derivado de alquilamina:

Num frasco de fundo redondo de 250 ml equipado com um agitador magnético colocaram-se 100 ml de etileno glicol e ajustou-se a temperatura para 50°C em banho de óleo. Adicionou-se 1 g de poliacrilamida e a dissolução ficou a processar-se a essa temperatura durante a noite. Em seguida subiu-se a temperatura para 100°C e adicionaram-se 13 ml (0,13 mole) de 1,4 diaminobutano. A reacção de aminólise processou-se à temperatura de 100°C durante três horas. Em seguida a solução foi arrefecida com gelo e misturada com 100 ml de ácido clorídrico 2N arrefecido com gelo. O pH desta solução foi corrigido para 6,3 e a solução foi dialisada quatro vezes contra cinco litros de fosfato 0,02 M, pH 6,3; fosfato 0,02 M, pH 6,3; fosfato 0,02 M pH 6,3 e finalmente água.

O polímero foi finalmente recolhido por liofilização (rendimento essencialmente quantitativo, conteúdo de amina 2 mil equivalentes por grama de polímero seco, conversão de 12,5 % determinada titimetricamente de acordo com J.F. Inman e H.M. Dintzis (1969) Biochemistry 8, 4074 - 4082) e conservado à temperatura de -20°C.

2. "Engaiolamento de duas camadas de glicose oxidase

2-a) Num balão de 20 ml equipado com um agitador magnético e conservado à temperatura de 4°C, adicionaram-se 9,8 ml de uma solução

ção de 10 mg/ml de guataraldeído polimérico em fosfato 0,2 M, pH 8,2, e em seguida 0,2 ml de uma solução de glicose oxidase a 50 mg/ml em fosfato 0,2 M pH 6,0. A reacção de ligação ficou a processar-se durante 3 horas à temperatura de 4°C. O polímero não ligado foi retirado por diálise (3 vezes contra tampão de fosfato 0,2 M, pH 8).

2-b) Num balão de 20 ml equipado com um agitador megnético e à temperatura de 4°C, adicionaram-se 16 ml de um derivado aminobutílico de uma solução de poliacrilamida (0,25 mg/ml em fosfato 0,2 M, pH 8,0) e em seguida 4 ml de uma solução de glicose oxidada revestida com poliglutaraldeído (obtido como descrito anteriormente). A reacção foi deixada a processar-se durante 3 horas à temperatura de 4°C e o pH corrigido para 6,0 mediante diálise contra fosfato 0,2 M, pH 6,0.

A enzima estabilizada foi conservada sob a forma de solução à temperatura de 4°C ou sob a forma de pó liofilizado.

3. Estabilização de glicose oxidase para inactivação térmica:

A estabilização de glicose oxidase para a desnaturação térmica foi demonstrada mediante a avaliação da velocidade de inactivação da enzima natural ou da enzima estabilizada a uma temperatura elevada fixada em 50°C. A constante de velocidade definida como:

$$K_{INA} = - \frac{1}{T} \ln \frac{E(T)}{E(0)}$$

em que: E(T) = actividade enzimática determinada no tempo "T"

$E(0)$ = actividade enzimática determinada no tempo "0" (para a descrição deste método ver a referência 24).

Os dados estão representados no Quadro 1.

Quadro 1: Efeito de "engaiolamento" de duas camadas na estabilidade térmica de glicose oxidase

Enzima	KINA (h^{-1} , $55^{\circ}C$)	KINA relativa (%)	Actividade residual após 5h a $55^{\circ}C$ (%)
nativa (controlo)	0,19	100	43
tratado com <u>po</u> liglutaraldeído	0,066	35	60
"gaiola" de duas camadas	0,032	17	80

4. Estabilização de glicose oxidase para a inactivação resultante na presença de co-solventes orgânicos.

A estabilização da glicose oxidase contra o efeito de desnaturação de solventes orgânicos miscíveis com a água foi demonstrada mediante a avaliação de velocidade de inactivação (KINA) para a enzima natural e a enzima estabilizada a uma temperatura fixada em $50^{\circ}C$ na presença de co-solvente 3,5 M (20 %). Os dados estão representados no Quadro 2.

Quadro 2: Efeito de "engaiolamento" de duas camadas na tolerância da glicose oxidase para os solventes orgânicos.

Co-solvente (todos a 3,5 M)	KINA (h^{-1} , 55°C)		Relativa (b/a,%)
	Enzima natural (a)	Enzima "engaiolada" (b)	
nenhum	0,19	0,055	29
etilenoglicol	0,16	0,074	46
DMSO	0,019	0,075	40
DMF	0,40	0,22	55
etanol	1,020	0,40	39
formamida	1,74	0,50	29

EXEMPLO 2.

Estabilização de estearase de fígado de porco (E.C. 3,1,1,1) por "engaiolamento" de duas camadas.

1. Preparação dos reagentes poliméricos:

Prepararam-se poliglutaraldeído polimérico e poliacrilamida como se descreveu no Exemplo número 1.

Um derivado de acil hidrazida de poliacrilamida foi preparado do seguinte modo: num frasco de fundo redondo de 100 ml equipado com um agitador magnético foi mantido à temperatura de 50°C, verteram-se 38 ml de água e 1,5 g de poliacrilamida. Após a dissolução completa adicionaram-se 12 ml (0,23 mole) de hidrato de hidrazina e a reacção de hidrazinólise processou-se durante 4 horas. O derivado de acil hidrazida obtido sete modo foi separado por pre

cipitação induzida pela adição gota a gota da solução reaccional aquosa a 250 ml de metanol, recolheu-se por centrifugação, dissolveu-se e precipitou-se de novo como referido antes, conservou-se durante a noite à temperatura de 4°C sob metanol, separou-se e secou-se num evaporador rotativo, 30 minutos à temperatura de 40°C, e finalmente secou-se sob o vácuo com pentóxido de fósforo. O polímero seco (conteúdo em acil hidrazida: 1,5 milimole/g determinado de acordo com a referência 19, rendimento essencialmente quantitativo) foi conservado à temperatura de -20°C.

2. "Engaiolamento" de duas camadas de estearase de fígado de porco.

2-a) Num frasco de 50 ml equipado com um agitador magnético e mantido à temperatura de 4°C, adicionaram-se 19,7 ml de uma solução de poliglutaraldeído a 4 mg/ml em fosfato 0,05 M, pH 8,0 e em seguida 0,3 ml de uma solução de enzima a 11 mg/ml (Sigma Cat. No E-3128). A reacção de ligação ficou a processar-se à temperatura de 4°C durante 3 horas e o excesso de poliglutaraldeído foi retirado por meio de diálise (três vezes contra fosfato 0,05 M, pH 8,0).

2-b) Num frasco de 100 ml equipado com agitador magnético e mantido à temperatura de 4°C, adicionaram-se 41 ml de derivado de acil hidrazida de poliacrilamida em fosfato 0,05M pH 8 a 5 mg/ml e em seguida 19 ml de uma solução de enzima de poliglutaraldeído (obtida como descrito antes). A reacção ficou a processar-se durante 3 horas à temperatura de 4°C e finalmente foi dializada contra tampão 0,05M Tris pH 8. A enzima estabilizada foi conservada sob a forma de solução à temperatura de 4°C ou sob a forma de pó liofilizado.

3. Estabilização de estearase de fígado de porco para inactivação térmica.

A estabilização de estearase de fígado de porco para desnaturação pelo calor foi demonstrada pela determinação de KINA (h^{-1} , $55^{\circ}C$) como descrito no Exemplo 1. Os dados estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3. Efeito de "engaiolamento" de duas camadas na estabilidade térmica da estearase de fígado de porco.

Enzima	KINA (h^{-1} , $55^{\circ}C$)	KINA rela tiva (%)	Actividade residual após 5 h a $55^{\circ}C$ (%)
natural (controlo)	0,140	100	47
tratada com po liglutaraldeído	0,047	34	50
"engaiolamento" de duas camadas	0,032	23	82

4. Estabilização de estearase de fígado de porco para a presença de solventes miscíveis com a água.

A estabilização para o efeito de desnaturação de co-solventes miscíveis com a água presentes numa concentração de 3,5 M (aproximadamente 20 %) foi demonstrada de acordo com a descrição do exemplo 1. Os dados estão representados no Quadro 4 e são relativos a preparações enzimáticas "engaioladas" e liofilizadas.

Quadro 4: Efeito de "engaiolamento" de duas camadas na tolerância da estearase de fígado de porco aos solventes orgânicos.

Co-dissolvente (todos a 3,5 M)	KINA (h^{-1} , 55°C)	
	Enzima natural	Enzima "engaiolada" (liofilizada)
nenhum	0,14	0,00
etilenoglicol	0,24	0,00
DMSO	0,24	0,01
propilenoglicol	0,50	0,00
etanol	2,95	0,093

EXEMPLO 3.

Estabilização de β -Lactamase (E.C. 3,5,2,6) por "engaiolamento" de duas camadas.

1. Preparação de reagentes poliméricos: o poliglutaraldeído foi preparado como descrito no Exemplo 1. A poliacrilamida com grupos acil hidrazida como substituintes parciais foi preparada como descrita no Exemplo 2.

2. As duas fases do processo foram realizadas essencialmente como descrito no Exemplo 2 para a estearase do fígado de porco.

3. A estabilização de β -Lactamase à desnaturação pelo calor mediante "engaiolamento" de duas camadas de acordo com a presente invenção foi demonstrada pela avaliação de KINA (h^{-1} , 55°C) como descrito no Exemplo 1. Os dados estão representados no Quadro 5.

Quadro 5: Efeito de "engaiolamento" de duas camadas na estabilidade térmica de β -Lactamase

Enzima	KINA (h ⁻¹ , 55°C)	KINA re- lativa (%)	Actividade residual após: 5 h a 55°C (%)
nativa (controlo)	0,52	100	10
tratada com <u>po</u> liglutaraldeído	0,10	19	28
bi-fase "engaiolada"	0,03	6	70

EXEMPLO 4

Estabilização de enzimas "engaioladas" por liofilização

A liofilização das enzimas "engaioladas" resultou numa melhoria bastante significativa da estabilidade da enzima. Este efeito está em contraste com o efeito corrente de liofilização nos enzimas naturais; em muitos casos a sua estabilidade diminui, e em outros permanece inalterável.

O efeito de liofilização na estabilidade de enzimas "engaioladas" está representado no Quadro 6 para a estearase de fígado de porco e para β -Lactamase.

Quadro 6: Efeito de liofilização na estabilidade térmica de enzimas naturais e enzimas "engaioladas"

Enzima	KINA (h^{-1} , $55^{\circ}C$)	
	antes da liofilização	após liofilização
Estearase de fígado de porco natural	0,12	0,14
Estearase de fígado de porco "engaiolada"	0,032	0,00
β -lactamase - nativa	0,52	2,59
β -lactamase - "engaiolada"	0,03	0,00

EXEMPLO 5

Imobilização e estabilização de enzima "engaiolada" liofilizada. Processo de imobilização.

Numa solução de 1,5 g de poliacril-hidrazida (peso molecular de 100 000) em 8,5 ml de água destilada adicionou-se com uma agitação cuidadosa 0,5 ml de tampão de fosfato 1 M, pH 8. A solução tamponada de uma estearase de fígado de porco "engaiolada" liofilizada, preparada como no Exemplo 2 (150 mg em 1 ml de fosfato 0,05 M, pH 8, 30 UE) foi adicionada em seguida, agitada cuidadosamente mediante um agitador magnético e a solução obtida deste modo injectada (injector exterior 2 ml) numa solução de glioxal a 1% arrefecida em gelo. As porções gelificadas obtidas deste modo foram deixadas a endurecer durante uma hora e em seguida divididas em fragmentos de 2 ml por meio da passagem através de uma seringa sob pressão (diâmetro exterior 2 mm). O gel foi em seguida incubado à

temperatura de 4°C durante 20 horas e novamente fragmentado em partículas de cerca de 0,25 mm por meio de um homogeneizador de lâmina ("Sorval Omnimixer", 7000 rotações por minuto, 1 minuto). As partículas de gel foram lavadas com 1 litro de tampão 0,05 M de Tris arrefecido com gelo (pH 8), fez-se de novo a sua suspensão em 50 ml do mesmo tampão e conservadas à temperatura de 4°C até à sua utilização.

A estabilidade térmica a 55°C desta preparação está representada na figura 2.



Reivindicações

1.- Processo para a preparação de produtos enzimáticos biologicamente activos, estabilizados e solúveis na água em que as moléculas do enzima possuem uma estrutura protectora com duas camadas que comportam um revestimento de base polialdeídica ligada aos grupos amino livres do enzima e, reticulado com esta, um revestimento polimérico exterior, sendo os polímeros que constituem o citado revestimento exterior de um tipo que, no estado não-ligado compreendem grupos amino e/ou acil-hidrazida livres, caracterizado pelo facto de se fazer reagir, em uma primeira fase, um produto de enzima natural em solução aquosa com um excesso de um polialdeído solúvel na água para se obter um produto de enzima intermédio em que as moléculas do enzima são revestidas com o referido revestimento de base polialdeídica e de, em uma segunda fase, se fazer, reagir o produto de enzima intermédio em solução aquosa com

um reagente polimérico que comporta grupos amino e/ou acil-hidrazida livres.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se liofilizar o produto obtido na segunda fase referida .

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se imobilizar o produto de enzima por meio de uma matriz.

4.- Processo para a preparação de produtos de enzima imobilizados de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se submeter a uma reacção de reticulação a solução aquosa obtida no final da segunda fase referida na reivindicação 1, que contém o polímero que não reagiu.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se preparar o produto de enzima sob a forma de uma solução aquosa.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se obter o produto de enzima sob uma forma liofilizada anidra.

7.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1, 3, 5 ou 6, caracterizado pelo facto de o referido revestimento de base ser constituído por poliglutaraldeído.

8.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1, 3, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo facto de se obter o referido revestimento exterior a partir de um polímero escolhido no grupo constituído por poliacrilamidas, poliacrilamidas N-alquiladas e derivados de acil-hidrazida de poliacrilamidas.

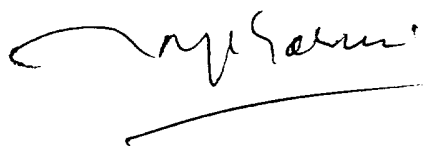
9.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1, 3, 5, 6, 7 e 8, caracterizado pelo facto de o enzima ser α -glicose-oxidase.

10.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1, 3, 5, 6, 7, e 8, caracterizado pelo facto de o enzima ser estearase de fígado de porco.

11.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1, 3, 5, 6, 7 e 8, caracterizado pelo facto de o enzima ser β -lactamase,

Lisboa, 5 de Agosto de 1988

O Assessor da Propriedade Industrial



RESUMO

"Processo para a preparação de enzimas
estabilizados"

Descreve-se um processo para a obtenção de produtos de enzimas estabilizados por meio de "engaiolamento" em camada dupla, que consiste em revestir, em uma primeira fase, o enzima com uma base polialdeídica ligada aos grupos amino do referido enzima e, em uma segunda fase, em ligar de forma reticular uma camada polimérica exterior, constituída por um tipo de polímero tal que, no estado não ligado, comporta grupos amino e/ou acil-hidrazida livres.

Eventualmente, o enzima estabilizado pode apresentar-se imobilizado numa matriz.

Lisboa, 5 de Agosto de 1988



4.

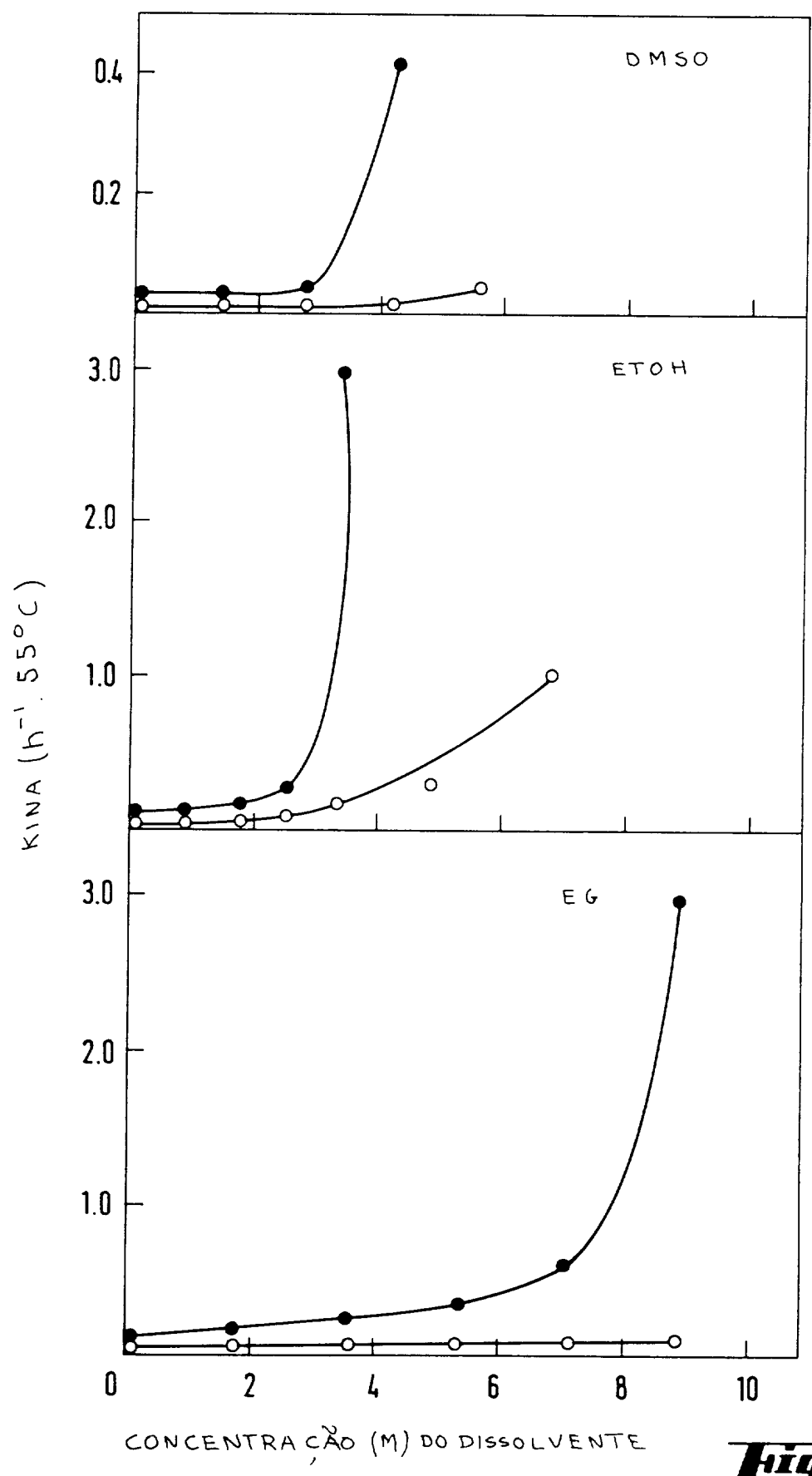


Fig: 1

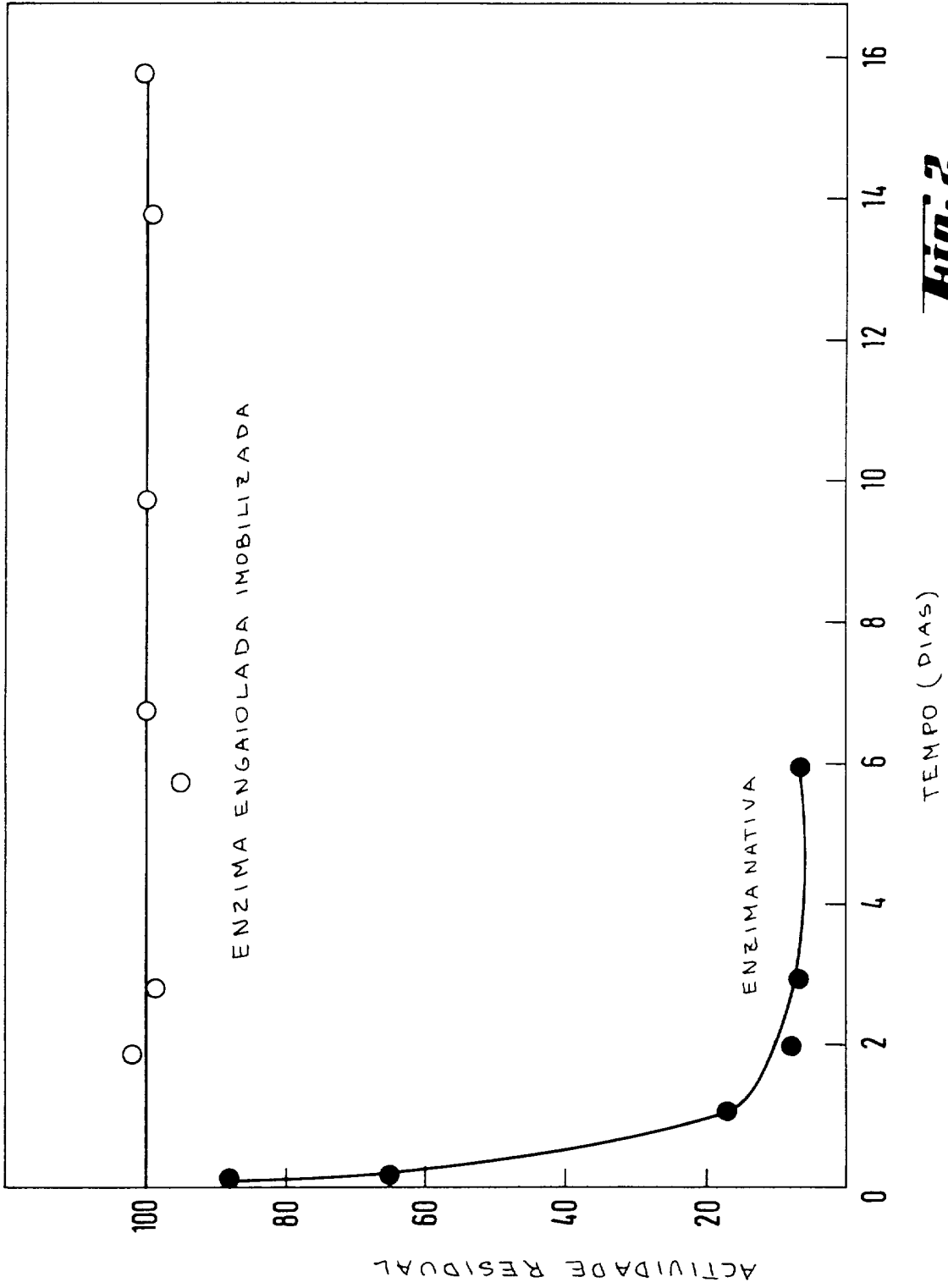


Fig. 2

Handwritten signature or mark.

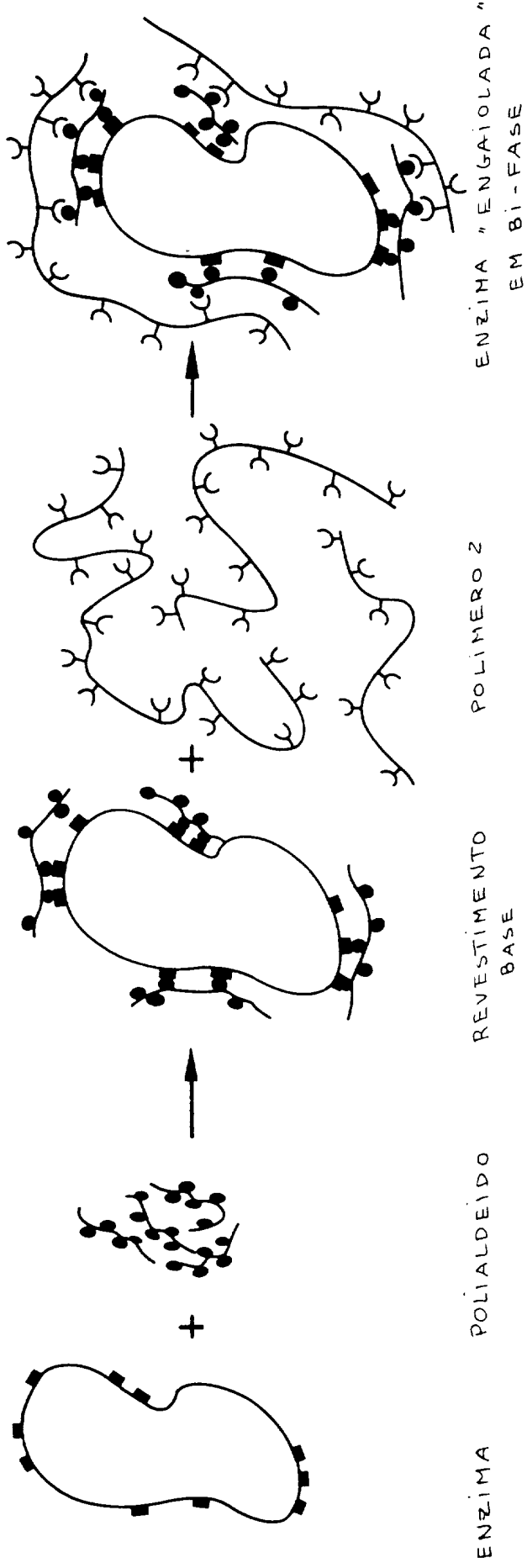


Fig. 3

4