



FI000100802B



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 100802 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 27.02.98

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

C 07K 14/47, A 61K 38/49

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 871175

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 18.03.87

(24) Alkupäivä - Löpdag 18.03.87

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 19.09.87

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

18.03.86 US 841075 P

04.03.87 US 021893 P

(73) Haltija - Innehavare

1. **Genentech, Inc.**, 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Hotchkiss, Adair John**, 230 Palm Beach Avenue, Half Moon Bay, CA 94019, USA, (US)

2. **O'Connor, John Vincent**, 150 Dale Avenue, San Carlos, CA 94070, USA, (US)

3. **Spellman, Michael Walter**, 468 Oak Avenue, San Bruno, CA 94066, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: **Oy Heinänen Ab**, Annankatu 31-33 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av en plasminogenaktivator av människovävnadstyp

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 853761 (C 12N 15/12), FI A 864654 (C 12P 21/00), WO A 84/01786 (C 12N 9/64),
Biochemistry vol. 23 (1984) p. 6191-6195

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää ihmisen kudostyyppisten plasminogeeniaktivaattorien valmistamiseksi, joiden plasminogeeniaktivaattorien aminohapporyhmässä 117 oleva funktionaalinen hiilihydraattirakenne on modifioitu. Plasminogeeniaktivaattorit valmistetaan saattamalla yhdistelmä-DNA-menetelmin ilmentymään DNA, joka koodaa ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria ja jossa on asemassa 117 muuta aminohappoa kuin asparagiinia koodaava kodoni.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av plasminogenaktivatorer av mänsklig vävnadstyp, varvid den i aminosyragruppen 117 av plasminoaktivatorerna belägna kolhydratstrukturen är modifierad. Plasminogenaktivatorerna framställs genom att man medelst kombinations-DNA-förfaranden exprimerar ett DNA, vilket kodar för en plasminogenaktivator av mänsklig vävnadstyp och vilket i stället i ställningen 117 har ett kodon som kodar för en annan aminosyra än asparagin.

MENETELMÄ IHMISEN KUDOSTYYPPISEN PLASMINOGEENIAKTIVAATTORIN VALMISTAMISEKSI

5 Tämä keksintö koskee menetelmää ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin valmistamiseksi, jolle menetelmälle tunnusomaiset piirteet on esitetty patenttivaa-
timuksessa. Keksinnön mukaisesti kudostyyppisessä plas-
minogeeniaktivaattorissa on 527 aminohappoa, jonka hiilihyd-
raattirakennetta modifioidaan endoglykosidaasientsyymikäsit-
10 telyllä siten, että biologinen aktiivisuus on säilynyt olennaisesti ennallaan ja jolla on lisääntynyt in vivo puoliintumisaika ja että entsyymikäsittely eliminoi funk-
naalisen hiilihydraattirakenteen aminohapporyhmästä 117, säilyttäen hiilihydraattirakenteet muilta osin modifioimat-
15 tomina.

Ihmisen kudostyyppinen plasminogeeniaktivaattori muuttaa plasminogeeniä plasmiiniksi. Siten muodostuva plas-
miini pilkkoo proteolyttisesti fibriinimatriiseja, jotka
muodostavat verihyytymien rungon. Ihmisen kudostyyppinen
20 plasminogeeniaktivaattori toimii siten verihyytymien liu-
kenemisen välittäjänä ja on siitä syystä käyttökelpoinen
erilaisten trombolyyttisten häiriöiden hoidossa.

Ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin lyhenne t-PA otettiin käyttöön ehdotuksen jälkeen, joka
25 tehtiin kokouksessa XXVIII Meeting of the International
Commitee of Thrombosis and Hemostatis, Bergamo, Italia,
27. kesäkuuta 1982. Tässä käytettyinä termit "ihmisen kudostyyppinen plasminogeeniaktivaattori", "t-PA", "ihmis-t-PA"
ja "plasminogeenin kudosaktivaattori" tarkoittavat ihmisen
30 ulkopuolista (kudostyyppistä) plasminogeeniaktivaattoria,
jota tuotetaan esimerkiksi luonnon lähteestä eristämällä ja
puhdistamalla [katso Collen et al., EP-hakemusjulkaisu 41766
(julkaistu 16. joulukuuta 1981, perustuu 11. kesäkuuta 1980
ensimmäisen kerran jätettyyn hakemukseen) ja Rijken et al.,
35 Journal of Biol. Chem. 256 (1981) 7035, jotka mainitaan
tässä viitteinä] ja yhdistelmäsolu-

viljelmäjärjestelmillä, joita kuvataan yhdessä tuotteen aminohapposekvenssin ja fysikaalisten ja biologisten ominaisuuksien kanssa esimerkiksi EP-hakemusjulkaisussa 93619 (julkaistu 9. marraskuuta 1983, perustuu 5. toukokuuta 1982
5 ensimmäisen kerran jätettyyn hakemukseen), joka mainitaan tässä viitteenä.

US-patenttijulkaisussa 4 326 033 kuvataan urokinaasin puoliintumisajan pidentämistä muuntamalla kemiallisesti sen hiilihydraattirakennetta. Urokinaasi eroaa immunologisesti ihmisen kudostyyppisestä plasminogeeniaktivaatorista. US-patenttijulkaisun 4 326 033 eikä muidenkaan tietojen perusteella ole syytä otaksua, että tällaiset urokinaasin hiilihydraatin muuntamiset olisivat sovellettavissa muihin glykoproteiineihin. Itse asiassa esimerkiksi sialii-
10 nihapon poistaminen keruloplasmiinista lyhentää tämän puoliintumisaikaa dramaattisesti; toisaalta transferriinin, erään toisen seerumiglykoproteiinin, samanlaisella käsittelyllä ei ole merkittävää vaikutusta puoliintumisaikaan [katso Sharon, Complex Carbohydrates, Addison-Wesley Publ. Co.
15 1975, s. 194-196; Ashwell et al., Adv. Enzymology 41 (1974) 99; Alexander et al., Science 226 (1984) 1328].

Kansainvälisessä patenttihakemusjulkaisussa WO84/01786, joka on julkaistu 10. toukokuuta 1984 ja perustuu 28. lokakuuta 1982 ensimmäisen kerran jätettyyn hakemukseen, kuvataan plasminogeenin kudostyyppisen aktivaattorin umpimähkäistä muuntamista, joka johtaa molekyyliin, jolla on alentunut biologinen aktiivisuus ja tarkoituksellisesti pidennetty puoliintumisaika muuntamattomaan polypeptidiin verrattuna. Tähän yksittäiseen esimerkkiin liittyy ihmisen osittain puhdistetun kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin käsittely natriumperjodaatilla, jolloin saadaan tuote, jonka aktiivisuuden ilmoitetaan olevan noin 70-90 % alkuperäisestä (muuntamattoman aktivaattorin) aktiivisuudesta. Julkaisussa WO84/01786 ei ole mitään osoitusta siitä, että olisi kiinnitetty huomiota luontaisessa
30 materiaalissa ja, mikä vielä tärkeämpää, muunnetussa
35

muodossa esiintyvien hiilihydraattirakenteiden luonteeseen ja karakterisointiin. Itse asiassa perjodaatin tiedetään muuntavan ja hajottavan hapettumisen kautta kaikkia hiilihydraattirakenteita ilman, että ne samanaikaisesti oleellislisilta osiltaan poistuisivat aminohappoketjusta.

Julkaisussa WO84/01786 ei myöskään esitetä, kuinka monta rakennetta ihmisen kudostyyppisellä plasminogeenillä on tai mikä todellinen hiilihydraattikoostumus on joko muuntamattomassa tai heidän muuntamassaan versiossa. Siten heidän perjodaatilla käsittelemänsä molekyyli oli todennäköisimmin muunnettu hapettamalla umpimähkäisesti kaikki hiilihydraattirakenteet kohdistumatta johonkin tiettyyn kohtaan.

Viime aikoina on raportoitu, etteivät glykosyloituneen ja deglykosyloituneen kudostyyppisen ihmisplasminogeeniaktivaattorin poistumisnopeudet elimistöstä in vivo olisi merkittävästi erilaisia, mikä johtaa siihen päätelmään, ettei hiilihydraattien poissaolo vaikuta ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin poistumisnopeuteen [Larsen et al., Proteases in Biological Control and Biotechnology, UCLA Symposium Park City, Utah, 9. - 14. helmikuuta 1986; Little et al., Biochemistry 23 (1984) 6191].

Nyt on havaittu, että ihmisen kudostyyppisessä plasminogeeniaktivaattorissa on aminohapporyhmässä 117 erityinen hiilihydraattirakenne, joka on huomattavasti erilainen kuin aminohapporyhmissä 184 ja 448 olevat hiilihydraattirakenteet ja joka poistettuna kokonaan (tai lukuunottamatta aminohappoon Asn liittynyttä N-asetyyli-glukosamiiniryhmää) johtaa uusiin ihmisen kudostyyppisiin plasminogeeniaktivaattoreihin, joiden biologinen aktiivisuus on suurin piirtein ennallaan ja puoliintumisaika in vivo odottamattomasti pidentynyt.

Tämä keksintö koskee menetelmää ihmisen kudostyyppien plasminogeeniaktivaattoreiden valmistamiseksi, joista puuttuu funktionaalinen hiilihydraattirakenne aminohapporyh-

mästä 117, joiden hiilihydraattirakenteita (aminohapporyhmissä 184 ja/tai 448) ei ole muuten muunnettu funktionaalisesti ja joiden biologinen aktiivisuus on suurin piirtein kokonaan säilynyt ja puoliintumisaika in vivo pidentynyt (verrattuna "luontaiseen" ihmisen kudostyyppiseen plasminogeeniaktivaattoriin, jossa on alkuperäinen hiilihydraattirakenne aminohapporyhmässä 117).

Esitetyn mukaisesti on mahdollista aikaansaada vastaavia biologisesti aktiivisia ihmisen kudostyyppisiä plasminogeeniaktivaattoreita, joiden kokonaissekvenssissä on yksi tai useampi erilainen aminohappo, mutta joiden hiilihydraattimalli on samanlainen kuin keksinnön mukaisella menetelmällä aikaansaatu.

Eräs ekvivalenttinen ihmisen kudostyyppinen plasminogeeniaktivaattori on niin kutsuttu yksiketjuinen mutantti, jossa aminohappojen 275 ja 276 välissä oleva pilkkoutumiskohta on tuhottu poistamalla proteolyyttisten entsyymien tunnistama aminohapposekvenssi. Tämän sekvenssin eliminointi saadaan aikaan muuttamalla tiettyjä aminohappoja aiheuttamalla esimerkiksi mutaatioita vastaaviin DNA-kodoneihin menetelmällä, joka on kuvattu tässä hakemuksessa.

Kuvio 1 esittää käsittelemättömän (kaista 1) ja Endo H-käsitellyn (kaista 2) kudostyyppisen ihmisplasminogeeniaktivaattorin Coomassie-värjättyä SDS-PAGE:a. Suurta molekyylipainoa vastaava vyöhyke on 1-ketjuinen t-PA; muut päävyöhykkeet ovat tyyppin I silmukka (KI), tyyppin II silmukka (KII) ja proteaasi (P).

Kuvio 2 esittää pelkistetyn karboksimeetyloidun t-PA:n glykosidaasi-pilkkomistuotteita. Kaista 1: -N-glykanaasi; kaista 2: +N-glykanaasi; kaista 3: -endo H; kaista 4: +endo H. Vyöhykkeiden merkitykset kuten kuviossa 1.

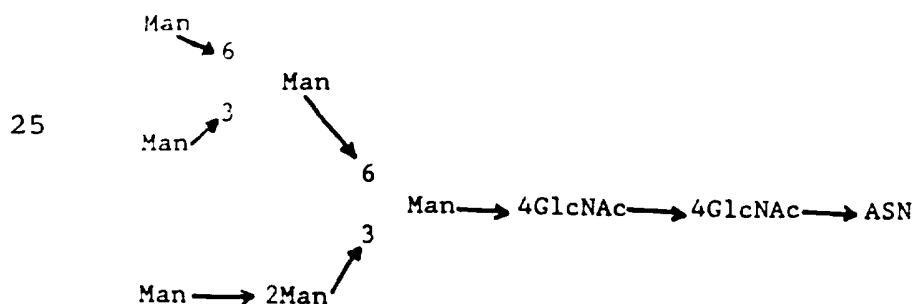
Kuvio 3 esittää lähtöplasmidin pUCPA Δ HD restriktio-karttaa.

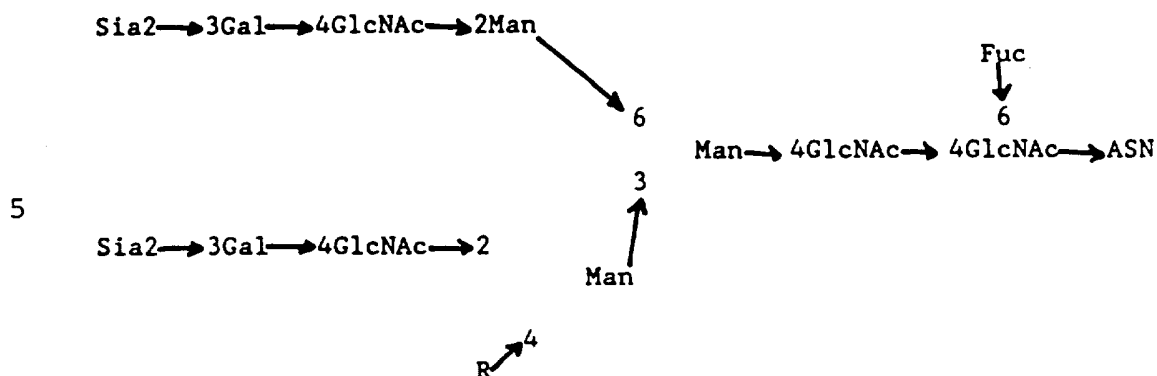
Kuvio 4 esittää saostettavissa olevan trikloorietikahappo(TCA-)radioaktiivisuuden muuttumista ajan funktiona vertailuaineelle, ihmisen kudostyyppiselle plasminogeeniaktivaattorille (■) ja ihmisen kudostyyppiselle plasminogeeniaktivaattorille, joka on käsitelty endo H -menetelmällä ilman entsyymiä (▲) ja endo H:lla käsitellylle ihmisen kudostyyppiselle plasminogeeniaktivaattorille (●). Tulokset ovat keskiarvoja $\pm$ standardipoikkeama ($n = 5$).

Kuvio 5 esittää saostettavissa olevan trikloorietikahappo(TCA-)radioaktiivisuuden muuttumista ajan funktiona vertailuaineena käytetylle ihmis-t-PA:lle (O) ja glutamiini₁₁₇-t-PA:lle (□).

Kuvio 6 esittää saostettavissa olevan trikloorietikahappo(TCA-)radioaktiivisuuden muuttumista ajan funktiona vertailuaineena käytetylle ihmis-t-PA:lle (□) ja glutamiini₁₁₇-glutamiinihappo₂₇₅-t-PA:lle (O).

On havaittu, että ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin aminohapporyhmässä 117 olevalla hiilihydraattirakenteella on seuraavan tyyppinen koostumus:





- 10 Lyhenteet: Man = mannoosi; Gal = galaktoosi; Fuc = fukoosi; GlcNAc = N-asetyyliglukosamiini; Sia = sialiinihappo; R = H tai $\text{Sia}_2 \rightarrow 3\text{Gal} \rightarrow 4\text{GlcNAc}$.

Korostettakoon, että vaikka edellä esitetyt rakenteet edustavat ihmisen kudostyyppisessä plasminogeeniaktivaatorissa esiintyvien N-kytkeytyneiden oligosakkaridien tyyppejä, ei tämä keksintö rajoitu esitettyyn rakenteeseen. Kukin glykosyloitumiskohta sisältää todennäköisesti muutamia läheistä sukua olevia epäidenttisiä rakenteita. Tämä ilmiö tunnetaan mikroheterogeenisyytenä, ja se on glykoproteiini-
 15 glykaaneille yhteinen ominaispiirre [katso J. Biol. Chem. 260 (1985) 4046]. Esimerkiksi paljon mannoosia sisältävissä oligosakkarideissa voi mannoosiyksiköiden lukumäärä vaihdella. Monimutkaisissa oligosakkarideissa mikroheterogeenisyyteen voi liittyä eroja haaroittumisen laajuudessa samoin
 20 kuin sialiinihappo-, fukoosi-, galaktoosi- ja N-asetyyliglukosamiiniyksiköiden lukumäärässä. Tällainen mikroheterogeenisyys on tarkoitettu tämän keksinnön piiriin kuuluvaksi.

Aminohapossa 117 oleva paljon mannoosia sisältävä rakenne on osoittautunut erilaiseksi kuin aminohapporyhmissä 184 ja 448 olevat monimutkaisemmat rakenteet, ei ainoastaan rakenteeltaan vaan myös siinä suhteessa, että sen poistaminen kokonaan muuttamatta samanaikaisesti funktionaalisesti asemissa 184 ja 448 olevia rakenteita johti biologisesti täysin aktiiviseen ihmisen kudostyyppiseen plasminogeeniaktivaattoriin, jonka puoliintumisaika in vivo on pidentynyt.
 35

Funktionaalisen hiilihydraattirakenteen poistaminen aminohapporyhmästä 117 tarkoittaa täydellistä poistamista, kuten tapausta, jossa glykosylaatio-signaali tuhoetaan paikkaohjatulla mutageneesilla tässä hakemuksessa kuvattavalla tavalla, tai poistamista oleellisilta osiltaan, kuten käsittelemällä endoglykosidaasilla, joka saattaa jättää jäljelle esimerkiksi Asn₁₁₇:ään kytkeytyneen koskemattoman N-asetyyli-glukosamiiniryhmän. Funktionaalisesti muuntamaton hiilihydraattirakenne aminohapporyhmissä 184 ja/tai 448 tarkoittaa joko alkuperäisten rakenteiden säilymistä tai suurin piirtein kaikkien tällaisten rakenteiden säilymistä sellaisina, että ne ovat funktionaalisesti ekvivalenttisia luontaisen proteiinin kanssa.

Eräässä edullisessa suoritustavassa funktionaalisen hiilihydraattirakenteen poistaminen aminohapporyhmästä 117 tehdään glykosylaatio-signaalia Asn-X-Ser/Thr, jossa X voi olla mikä tahansa aminohappo, vastaavan DNA:n paikkaspesifisellä mutageneesillä. Kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin ollessa kyseessä tätä signaalia edustava sekvenssi on Asn₁₁₇(Ser₁₁₈)Ser₁₁₉. Aminohapporyhmässä 117 olevan funktionaalisen hiilihydraattirakenteen poistaminen esimerkiksi aiheuttamalla mutaatio näitä aminohapporyhmiä vastaaviin kodoneihin johtaa siten signaalin funktionaalisuuden tuhoutumiseen. Mutageneesi voidaan erityisesti tehdä signaalia vastaaville kodoneille, niin että syntyy esimerkiksi ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria, jossa on muu aminohapporyhmä kuin asparagiini (Asn) asemassa 117 ja/tai muu kuin seriini (Ser) tai treoniini (Thr) asemassa 119 tai proliini (Pro) asemassa 118. Edullisemmissä suoritustavadoissa asparagiini₁₁₇ korvataan glutamiinilla, koska ne ovat rakenteellisesti läheisesti samankaltaisia, tai seriini₁₁₉ korvataan metioniinilla, koska tällöin sekvenssi on samanlainen toisella silmukka-alueella.

Mutageneesi toteutetaan sinänsä tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi menetelmillä, joista Zoller et al. ovat esittäneet katsauksen [Methods in Enzymology 100 (1983) 468].

Muuttamalla esimerkiksi asparagiinia koodaava kodoni AAC asemaa 117 vastaavassa kohdassa CAA:ksi tai CAG:ksi, mikä vaatii kahden nukleotidin muuttamista, saadaan ilmentymistuote, joka sisältää glutamiinia asemassa 117. Muut tähän
5 tarkoitukseen ajateltavissa olevat mutaatiot ovat seurausta geneettisen koodin analysoinnista.

Eräs vaihtoehtoinen menetelmä funktionaalisen hiilihydraatin poistamiseksi aminohapporyhmästä 117 sisältää endoglykosidaasin, kuten endoglykosidaasi H:n käyttämisen,
10 jolla on kyky (oleellisilta osiltaan) poistaa paljon mannoosia sisältävä hiilihydraattirakenne aminohapporyhmästä 117 (Asn) vaikuttamatta funktionaalisesti aminohapporyhmissä 184 ja 448 oleviin monimutkaisiin rakenteisiin. Tämäkin menettely toteutetaan sinänsä tunnetuin menetelmin, esimer-
15 kiksi Tarentinon et al. [J. Biol. Chem. 249 (1974) 811] ja Trimblen et al. [Anal. Biochem. 141 (1984) 515] menetelmällä.

Esimerkki 1

Käytettiin paikkaspesifistä mutageneesiä konstruoidessa ilmentymisvektori, johon sisällytettiin DNA, joka
20 koodaa kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria, jossa on glutamiini aminohapporyhmä asemassa 117, seuraavasti:

A. Oligonukleotidin valmistus

24-meerinen oligonukleotidi, jonka sekvenssi oli 5'-TGC-ACC-AAC-TGG-C*A*A*-AGC-AGC-GCG-3' (24-meeri Q117),
25 syntetisoitiin Crean et al. fosfotriesterimenetelmällä [Nucleic Acids Research 8 (1980) 2331]. Asteriskit osoittavat mutanttikodonin (Asn Gln:ksi).

B. Yhdistelmä-M13-templaatin muodostaminen

Plasmidi pUCPAAHD (kuvio 3) on plasmidin, josta käytetään merkintää pETPFR (pPADHFR-6 EP-hakemusjulkaisussa 93619, supra), johdos, jonka valmistamiseksi on tehty seuraavat muunnokset: 1) t-PA-geenin 5'-päästä on poistettu 166 emäsparin verran luetuksi tulematonta 5'-DNA:ta käyttämällä eksonukleaasia Bal 31; 2) t-PA-geenin uuteen 5'-
35 päähän on lisätty HindIII-kohta; 3) t-PA-ilmentymistä ohjaavan SV40:n varhaisen promoottorin 5'-päähän on lisätty

polykytkijä, joka sisältää tunnistuskohdat entsyymeille EcoRI, SacI, SmaI, BamHI, XbaI, SalI ja PvuII; 4) pETPFR:n asemassa 3539 ollut HindIII-kohta on tuhottu Klenow-täydennysreaktiolla.

5 Plasmidi pUCPA Δ HD (kuvio 3) pilkottiin SmaI:llä, ja eristettiin t-PA-geenin sisältävä noin 2,0 ke:n (kiloemäsparin) fragmentti PAGE:lla ja elektroeluoimalla fragmentti geelistä. Vektori M13mpl0 [Messing, Methods in Enzymology 101 (1983) 207] pilkottiin samoin SmaI:llä, uutettiin fenolilla ja kloroformilla, saostettiin etanolilla ja suspendoitiin liuokseen, joka sisälsi 50 mmol/l Tris-puskuria (pH 8,0) ja 1 mmol/l EDTA:a (TE). Plasmidista pUCPA Δ HD saatu noin 2,0 ke:n fragmentti ligatoitiin SmaI:llä pilkottuun M13mpl0:een käyttämällä T4-DNA-ligaasia, ja tuloksena olevalla DNA:lla transformoitiin E. coli JM101. Tuloksena oleva faagi eristettiin ja varmistettiin insertin läsnäolo sekä määritettiin sen orientaatio pienten faagipreparaattien restriktioanalyysillä. Valittiin eräs yhdistelmäfaagi, M13/t-PA-SMA, templaatiksi myöhempää mutageneesiä varten.

20 C. Mutageneesireaktio

Mutageneesialuke (24-meeri Q117) pariutettiin yksisäikeiseen M13/t-PA-SMA -DNA:han, ja käsiteltiin tuote E. coli -DNA-polymeraasin Klenow-fragmentillä dNTP:iden ja T4-DNA-ligaasin läsnäollessa, jolloin muodostui in vitro heterodupleksi-RF-molekyylejä [Adelman et al., DNA 2 (1983) 183]. Näillä molekyyleillä transformoitiin E. coli -kanta JM101 (ATCC n:o 33876), ja detektoitiin halutun mutaation sisältävät faagit pesäkehybridisaatiolla käyttämällä mutageneesialuketta koettimena [Adelman et al., DNA 2 (1983) 183]. Eristettiin eräs mutanttifaagi ja nimettiin se M13/t-PA-SMA-GLN117:ksi.

D. t-PA-mutantin GLN117 alakloonaus ilmentymisplasmidiin pUCPA Δ HD

35 Faagin M13/t-PA-SMA-GLN117 kaksisäikeinen DNA pilkottiin SmaI:llä, BglII:llä ja ApaI:llä, ja puhdistettiin noin 1,4 ke:n fragmentti PAGE:lla. Tällä fragmentilla korvattiin sitten vastaava pUCPA Δ HD:ssa oleva fragmentti.

Identifioitiin yhdistelmäplasmidit, jotka sisälsivät t-PA-geenifragmentin. Plasmidit M119 ja Q117 viedään DHFR-vajauksellisiin CHO-soluihin ja lisätään niissä [Urlab et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 77 (1980) 4216] seuraavasti:

5 1) plasmidi-DNA viedään soluihin kalsiumfosfaattisaostusmenetelmällä [Graham et al., J. Virol. 52 (1973) 455];

2) selektiivisessä alustassa [alusta, josta puuttuu hypoksantiini, glysiini ja tymidiini (-HGT)] kasvavista pesäkkeistä tutkitaan t-PA-ilmentyminen epäsuorasti detektoimalla plasmiinin muodostus, jonka osoittaa fibriinin pilkkoutuminen agarmaljassa, joka sisältää fibriiniä ja plasminogeenia [Granellia et al., J. Exp. Med. 148 (1978) 223];

10 3) viidestä voimakkaimmin positiivisesta pesäkkeestä tutkitaan kvantitatiivisesti erittyneen t-PA:n määrä solua kohden käyttämällä ELISA-menetelmää; 4) t-PA:ta suurimman määrän erittävä kloonisiirrostetaan metotreksaattiin (MTX) seuraavasti: 2×10^5 solua siirrostetaan 100 mm:n maljoihin, jotka sisältävät 50, 100 ja 250 nmol/l MTX:a; 5) viisi MTX:ssa kasvavaa kloonia uutetaan ja tutkitaan kvantitatiivisesti (ELISA:lla) kuten edellä kohdassa 3); 6) suurimman määrän t-PA:ta erittävä kloonisiirrostetaan suurehkoihin MTX-pitoisuuksiin kuten edellä vaiheessa 4), minkä jälkeen tutkitaan kvantitatiivisesti viisi muodostuvaa kloonia ja valitaan paras t-PA:n tuottaja.

25 Edellä kuvattua lisäämis- ja seulomismenettelyä toistetaan, kunnes tuloksena olevien solulinjojen t-PA-tuotanto ei enää parane, ja erotetaan vastaava mutantti t-PA-käyttöä varten.

Esimerkki 2

30 Valmistettiin samankaltaisella menetelmällä kuin esimerkissä 1 vastaava Met₁₁₉-mutantti käyttämällä 24-meeriä, jonka sekvenssi oli 5'-CC-AAC-TGG-AAC-AGC-A*T*G*-GCG-TTG-G-3' (24-meeri M119), jolloin saatiin pUCPA Δ HD M119. Vastavan M119-mutantin tuottaminen ilmentymisen kautta tehtiin

35 edellä esimerkissä 1 kuvatulla tavalla.

Esimerkki 3

Glutamiini₁₁₇-glutamiinihappo₂₇₅-t-PA valmistettiin seuraavasti:

Edellä kuvatulla tavalla valmistettu plasmidi

- 5 pUCPA Δ H Δ D pilkottiin BglII:lla ja ScaI:llä, ja puhdistettiin noin 763 ep:n (emäsparin) fragmentti, joka vastaa kudostyyppipisten plasminogeeniaktivaattorin DNA-sekvenssin kodoneja 1-254, SDS-PAGE:lla sinänsä tunnetulla tavalla.

- 10 Ihmisen t-PA-DNA saatiin plasmideista pPADHFR-6 (josta käytetään myös merkintää pETPFR) ja pA25E10. Näiden kahden t-PA-plasmidin valmistusta kuvataan EP-hakemusjulkaisussa 093619, johon viitattiin edellä ja joka mainitaan tässä viitteenä.

- 15 Plasmidi pA25E10 sisältää sekvenssit, jotka koodaavat t-PA:n 508 viimeistä aminohappoa, ja 772 emäsparia 3'-pään aluetta, jolle ei tehdä luentaa. Tämä plasmidi pilkottiin SacI:llä ja BglII:lla, jolloin saatiin 744 emäsparin fragmentti, joka eristettiin tavanomaisin menetelmin edellä kuvatulla tavalla. Tämä fragmentti sisältää t-PA:n amino-
- 20 happoja 411-527 vastaavat kodonit ja osan 3'-pään aluetta, joka ei tule luetuksi.

Plasmidi pPADHFR-6 sisältää t-PA:n koko rakennegeenin ja osan 3'-pään aluetta, joka ei tule luetuksi.

- 25 Tämä plasmidi pilkottiin SacI:llä ja BglII:lla, jolloin saatiin 1230 emäsparin fragmentti, joka eristettiin. Tämä fragmentti sisältää t-PA:n valmiin muodon 410 ensimmäistä aminohappoa vastaavat kodonit.

- Nämä fragmentit ligatoitiin yhteen tavanomaisin menetelmin, ja pilkottiin tuote BglII:lla. Eristettiin 1974
- 30 emäsparin fragmentti, joka sisälsi koko valmista t-PA-sekvenssiä vastaavat kodonit ja osa 3'-pään transloitumattomasta alueesta. Kaksisäikeinen M13mp8 (Messing et al., Third Cleveland Symposium on Macromolecules Recombinant DNA, toim. A. Walter, Elsevier, Amsterdam 1981, s. 143) pilkottiin BamHI:llä ja pariutettiin BglII-pilkotun t-PA-DNA:n
- 35 kanssa, jolloin muodostui M13mp8PABglII. E. coli JM 101

-solut (ATCC n:o 33876) transformoitiin M13mp8PABglIII:n kaksisäikeisellä replikatiivisella muodolla. M13mp8PABglIII:n yksisäikeisiä ja kaksisäikeisiä (RF) muotoja voidaan eristää tällä faagilla infektoiduista E. coli JM 101 -soluista. Yksisäikeistä muotoa käytettiin t-PA:n paikkaspesifiseen mutageneesiin.

Ihmisen t-PA-rakennegeeniä muunnettiin paikkaspesifisellä mutageneesillä sellaiseksi, että se ilmentyy t-PA:na, jossa on aminohapposubstituutioita eri kohdissa. Valmistettiin seuraava synteettinen oligonukleotidi, esimerkiksi Crean et al. kiinteäfaasifosfotriesterimenetelmällä [Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75 (1978) 5765] ja käytettiin sitä tällaiseen paikkaspesifiseen mutageneesiin:

Alukkeen 2C9

Glu

15 DNA-sekvenssi G CCT CAG TTT GAA ATC AAA GGA G

t-PA-klooni, joka sisälsi synteettisen alukkeen mutanttisekvenssin, valmistettiin Adelmanin et al. yleisellä menetelmällä [DNA 2 (1983) 183, mainitaan tässä viitteenä]. t-PA-mutanttikloori M13RF2C9 muodostettiin käyttämällä aluketta, joka sisälsi edellä esitetyn yhden aminohapon mutaation. Plasmidissa pPADHFR-2 (myös pETPFR, katso EP-hakemusjulkaisu 93619, supra) luontaisen t-PA-rakennegeenin ilmentyminen on SV40-T-antigeenin varhaisen promoottorin ohjauksessa. Tämä promoottori ohjaa myös DHFR-geenin ilmentymistä. Vektorifragmentti 1 saatiin eristämällä suuri fragmentti, joka muodostui pilkottaessa pPADHFR-6 BglII:lla ja BstEII:lla. Eräs toinen fragmentti, 2, saatiin eristämällä 400 emäsparin t-PA-fragmentti, joka saatiin pilkkomalla pPADHFR-6 BglII:lla ja BstXI:llä. 1141 emäsparin t-PA-fragmentti 3, joka sisälsi halutun mutaation, saatiin pilkkomalla t-PA-mutanttikloonista M13RF2C9 peräisin oleva RF-DNA BstXI:llä ja BstEII:lla. Fragmentit 1 ja 2 ligatoitiin fragmentin 3 kanssa. Tällä DNA-seoksella transformoitiin E. coli, jolloin saatiin eukaryoottinen ilmentymisvektori pPADHFR-6 2C9.

Plasmidi pPADHFR-6 2C9, joka valmistettiin edellä ja EP-hakemusjulkaisussa 199574 (29. lokakuuta 1986) kuvatulla tavalla, sisältää DNA-sekvenssin, joka koodaa kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin glutamiinihappo₂₇₅-mutanttia. Se pilkottiin ScaI:llä ja ApaI:llä, ja puhdistettiin SDS-PAGE:lla sinänsä tunnetulla tavalla noin 630 ep:n fragmentti, joka vastaa kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin DNA-sekvenssin kodoneja 254-466.

Fragmentit BglIII-ScaI (pUCPA Δ HD) ja ScaI-ApaI (pPADHFR-6 2C9) ligatoitiin suureen BglIII(ep 531) - ApaI (ep 1926) -fragmenttiin, joka saatiin pilkotusta pUCPA Δ HD:sta, ja tuloksena oleva plasmidi, joka sisälsi glutamiini₁₁₇-glutamiinihappo₂₇₅-t-PA-mutantti-DNA:n, tutkittiin pienessä mittakaavassa tavanomaisesti. Tuloksena oleva plasmidi vietiin DHFR-vajauksellisiin CHO-soluihin ja lisättiin niissä edellä kuvatulla tavalla, ja erotettiin vastaava mutantti-t-PA käyttöä varten.

Esimerkki 4

t-PA:n aminohapposekvenssi sisältää 4 mahdollista N-kytkeytynyttä glykosylaatiokohtaa [Asn-X-Ser/Thr; Ann. Rev. Biochem. 41 (1972) 673]. Nämä ovat asparagiiniryhmät 117, 184, 218 ja 448 [Nature 301 (1983) 214]. On kuitenkin havaittu, ettei t-PA:ssa tapahdu glykosyloitumista asemassa 218. Asemassa 184 tapahtuu glysylation tyypin I t-PA:ssa, mutta ei tyypin II t-PA:ssa [Biochemistry 23 (1984) 3701].

Pronaasilla pilkotun rt-PA:n geelisuodatuskromatografiassa erottui kaksi ryhmää N-kytkeytyneitä oligosakkarideja (taulukko I). Suurempimolekyyllisen materiaalin koostumus sopi yhteen fukosyloituneiden monimutkaisten oligosakkaridien kanssa. Pienempimolekyyllisellä materiaalilla on koostumus, jota voitiin odottaa pieneltä, paljon mannoosia sisältävältä oligosakkaridilta (todennäköisesti Man₆GlcNac₂).

Paljon mannoosia sisältävän oligosakkaridin liittymiskohta määritettiin käyttämällä glycosidisia entsyymejä, joilla oli erilainen spesifisyys. Käytetyt entsyymit olivat endo- β -N-asetyyli-glukosamidaasi H (endo H; Genzyme, Inc.),

joka poistaa paljon mannoosia sisältäviä oligosakkarideja, mutta ei vaikuta monimutkaista tyyppiä oleviin oligosakkarideihin, ja peptidi-N-glykosidaasi F (N-glykanaasi, Genzyme, Inc.), joka poistaa sekä paljon mannoosia sisältäviä että monimutkaisia oligosakkarideja. Näihin kokeisiin käytetty t-PA oli muutettu kaksiketjuiseen muotoon plasmiinilla ja sitten pelkistetty ja karboksimeytyloitu.

SDS-PAGE erottaa pelkistetyn karboksimetyloidun kaksiketjuisen rt-PA:n tyyppin I silmukaksi (glykosylaatio asemassa 117 ja 184), tyyppin II silmukaksi (glykosylaatio asemassa 117) ja proteaasiksi (glykosylaatio asemassa 448). t-PA:n pilkkominen N-glykanaasilla saa aikaan silmukkavyöhykkeiden yhteensulautumisen asemaan, joka vastaa hieman suurempaa liikkuvuutta kuin tyyppin II silmukalla on, ja suurentaa myös proteaasin liikkuvuutta (kaista 2, kuvio 2).

t-PA:n pilkkominen endo H:lla suurentaa kummankin silmukkavyöhykkeen liikkuvuutta elektroforeesissa, mutta ei vaikuta proteaasivyöhykkeen liikkuvuuteen (kaista 4, kuvio 2). Tämä endo H:lla saatu tulos osoittaa, että sekä tyyppin I että tyyppin II silmukka sisältää paljon mannoosia sisältävää oligosakkaridia; tämän täytyy sijaita asemassa 117, joka on ainoa asema, joka on glykosyloitunut sekä tyyppin I että tyyppin II silmukassa. Käsittely endo H:lla ei muuta tyyppin I silmukkaa tyyppin II silmukaksi; siksi ryhmä 184, joka on glykosyloitunut tyyppin I, mutta ei tyyppin II, silmukassa, sisältää monimutkaisen oligosakkaridin. Asemassa 448 täytyy myös olla monimutkainen rakenne, koska N-glykanaasikäsittely suurentaa rt-PA:n proteaasiosan liikkuvuutta, kun taas endo H:lla ei ole tähän vaikutusta.

Taulukko I

Pronaasilla pilkotusta t-PA:sta^a saatujen oligosakkaridifraktioiden hiilihydraattikoostumus

Näyte	Fuc	Man	Gal	GlcNAc	Sia ^b
5 Monimutkainen tyyppi ^c	1,0	3,0	2,8	4,2	2,4
Paljon mannoo- sia sisältävä tyyppi ^d	0,6	6,2	vähän	2,0	0
10 ^a Lyhenteet: Fuc = fukoosi, Man = mannoosi, Gal = galaktoosi, GlcNAc = N-asetyyli-glukosamiini, Sia = sialiinihappo					
^b Tiobarbituurihappomääritys					
^c Normalisoitu 3 mannooksiyksikköä sisältäväksi					
15 ^d Normalisoitu 2 GlcNAc-yksikköä sisältäväksi					

Esimerkki 5

Endo- β -N-asetyyli-glukosamidaasi H (endo H) ostettiin yhtiöstä Genzyme, Incorporated. SDS-PAGE toteutettiin Laemmlin mukaisesti [Nature 227 (1970) 680]. 0,2 mg ihmisen kudostyyppistä plasminogeenin aktivaattoria (valmistettiin EP-hakemusjulkaisun 93619, supra, mukaisesti) (0,2 ml:ssa formulointipuskuria, joka sisälsi 0,2 mol/l arginiinifosfaattia, pH 6, ja 0,01 % Tween 80:ä) sekoitettiin endo H:n (1 yksikkö 0,05 ml:ssa 25 mM natriumfosfaattiliuosta, pH 6) ja natriumatsidin kanssa (0,02 %). Näytettä inkuboitiin 20 tuntia lämpötilassa 37°C. Ihmisen kudostyyppinen plasminogeeniaktivaattori -vertailunäyte preparoitiin ja inkuboitiin muuten samalla tavalla, mutta käytettiin natriumfosfaattipuskuria (0,05 ml 25 mM liuosta) endo H -liuoksen tilalla. Inkuboinnin jälkeen näytteet laimennettiin kokonaistilavuuteen 0,75 ml formulointipuskurilla ja dialysoitiin perusteellisesti samaa formulointipuskuria vastaan. Näytteet suodatettiin (0,4 μ m:n HV-suodattimet, Amicon) ja säilytettiin lämpötilassa 4°C.

35 Deglykosylaatiota seurattiin SDS-PAGE:lla pelkistykseen ja karboksimeetyloinnin jälkeen. Näytteitä siten valmis-

tetusta ihmisen kudostyyppisestä plasminogeeniaktivaattorista (0,05 mg 0,01 ml:ssa formulointipuskuria) sekoitettiin 25 mM natriumfosfaattiliuokseen, pH 6, (0,015 ml) ja väkevyydeltään kaksinkertaiseen Laemmlin näytepuskuriin, joka sisälsi 20 mmol/l ditiotreitolia (0,025 ml). Näytteitä pidettiin 5 min lämpötilassa 95°C ja annettiin niiden jäähtyä. Lisättiin jodietikkahappoa (0,015 ml 0,67 M liuosta 1 N NH₄OH:ssa), ja inkuboitiin näytteitä 3 tuntia pimeässä huoneen lämpötilassa. Pelkistyneet karboksimeityloittuneet näytteet analysoitiin SDS-PAGE:lla.

Tässä analyysissä käsittelemätön 2-ketjuinen ihmisen kudostyyppinen vertailuplasminogeeniaktivaattori erottuu kolmeksi päävyöhykkeeksi, jotka vastaavat tyyppin I silmukkaa (glykosylaatio asemissa 117 ja 184), tyyppin II silmukkaa (glykosylaatio asemassa 117) ja proteaasia (kaista 1, kuvio 1). Ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin endo H -pilkkominen suurentaa kummankin silmukkavyöhykkeen liikkuvuutta elektroforeesissa, mutta ei vaikuta proteaasi-
vyöhykkeen liikkuvuuteen (kaista 2, kuvio 1).

Endo H käsitellyn kudostyyppisen ihmisplasminogeeniaktivaattorin fibrinolyttistä vaikutusta tutkittiin in vitro Collenin et al. hyytymänhajotuskokeella [J. Clin. Path. 21 (1968) 705]. Endo H:lla käsitellyn kudostyyppisen ihmisplasminogeeniaktivaattorin aktiivisuutta ei pystytty erottamaan käsittelemättömän vertailunäytteen aktiivisuudesta tässä kokeessa.

Ihmisen kudospasminogeeni -näytteet jodattiin Iodobead-menettelyllä [Markwell, Anal. Biochem. 125 (1982) 427] ominaisaktiivisuuteen noin 2, uCi/ug. Kaikissa käsittelyissä käytettiin puskurina liuosta, joka sisälsi 0,2 mmol/l arginiinia ja 0,1 mol/l sitraattia (pH 6,0) sekä 0,01 % Tween 80:ä. Kaikki näytteet dialysoitiin tätä puskuria vastaan ennen jodausta. pH säädettiin arvoon 8,2 Tris-emäksellä ennen jodausta. Jodausseos johdettiin PD-10-kolonnin (Pharmacia) läpi, joka oli tasapainotettu puskurilla pH 6,0, yhdistettiin huokostilavuudesta saadut radioaktiiviset

fraktiot, tehtiin SDS-PAGE ja kuivatulle geelille autoradiografia. Leimattujen ihmisen kudostyyppisten plasminogeeniaktivaattoreiden autoradiografia osoitti, että yli 95 % radioaktiivisuudesta meni ihmisen kudostyyppiseen plasminogeeniaktivaattoriin.

Kutakin leimattua ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria sekoitettiin leimaamattomaan materiaaliin suhteessa 1:200 (leimattu:leimaamaton, painosuhde), ja injektointiin i.v. kaniineihin, joiden korvassa oli valtimokatetri. Kullekin kaniinille annettiin 1 mg/kg leimaamatonta ja 10 μ Ci/kg leimattua ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria. Leimaamatonta ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria käytettiin kantaja-aineena pienelle määrälle leimattua ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria terapeuttisten pitoisuuksien saavuttamiseksi ja farmakokinetiikkamuutosten, joita voisi aiheutua poistumisreiteissä pitoisuusriippuvuudesta, välttämiseksi. Kerättiin sarja valtimoverinäytteitä 26 min:n aikana ja laitettiin ne heti putkiin, jotka sisälsivät kylmäkuivattua D-phe-pro-arg-kloorimetyyliketenin (PPACK, loppupitoisuus 1 μ mol/l) ja EDTA:n (loppupitoisuus 4,8 mmol/l) seosta. Putket laitettiin jäähauteeseen ja erotettiin plasma. Kustakin plasmanäytteestä mitattiin trikloorietikkahapolla (TCA:lla) saostettavissa oleva (ihmisen muuntamattoman kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin) ja kokonaisradioaktiivisuus. Immuunireaktiivinen ihmisen kudostyyppinen plasminogeeniaktivaattori määritettiin myös kerros-ELISA-menettelyllä, jossa käytettiin polyklonaalisia vasta-aineita ja jonka tehokas herkkyys oli vähintään 30 ng/ml.

Kaniineilla tehdyistä in vivo -poistumistutkimuksista saatiin kahden tyyppisiä tuloksia. Toinen tulos koskee immuunireaktiivista ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria, ja sen pitäisi olla mittana leimaamattoman materiaalin poistumiselle. Toinen tulostyyppi liittyy TCA:lla saostettavissa olevaan radioaktiivisuuteen, joka edustaa yli 95 % muuntamattomasta ihmisen kudostyyppisestä

aktivaattorista. Käyrät, jotka kuvaavat pitoisuutta plas-
massa ajan funktiona ja joita saatiin immuunireaktiivisuus-
mittauksissa ja TCA:lla saostuvan radioaktiivisuuden las-
kennassa, sovitettiin asianmukaisiin moniekspONENTTIMALLEI-
5 hin, ja verrattiin saatuja farmakokineettisiä parametrejä
keskenään.

Esimerkki 6

Ihmisen endo H -käsitellyn kudostyyppisen plasmino- geeniaktivaattorin farmakokinetiikka

10 Ihmisen endo H -käsitellyn kudostyyppisen plasmino-
geeniaktivaattorin ja kahden vertailuaineina toimivan ku-
dostyyppisen ihmisplasminogeeniaktivaattorin, jotka oli
käsitelty samanlaisissa reaktio-olosuhteissa kuin endo H
-käsitelty ihmisen kudostyyppinen plasminogeeniaktivaattori
15 entsyymien poissaollessa, farmakokineettiset käyrät esite-
tään kuviossa 4. Kahden vertailunäytteen suurin piirtein
identtiset käyrät osoittavat, että käsittelyt, jotka olivat
välttämättömiä yksinkertaisen sokerin poistamiseksi ase-
masta 117, eivät muuttaneet ihmisen kudostyyppisen plasmino-
20 geeniaktivaattorin eliminoitumista. Endo H -käsitelty ihmi-
sen kudostyyppinen plasminogeeniaktivaattori poistuu pal-
jon hitaammin. Tulosten analysointi osoittaa, että tapah-
tuu alfa-vaiheen poistumisnopeuden kasvu sen lisäksi, että
ajanhetkeen nolla ekstrapoloitu pitoisuus kasvaa beeta-vai-
25 heen ollessa kyseessä. Endo H -käsittelyllä ihmisen kudos-
tyyppisellä plasminogeeniaktivaattorilla on suurentunut
hyötyosuus mitattuna ajan ja pitoisuuden tulon integraalil-
la; tämä on hyötyosuutta suhteellisen todenmukaisella ta-
valla kuvaava arvo, jota kutsutaan käyrän alle jääväksi
30 pinta-alaksi ja jonka endo H -käsittely nostaa noin kaksin-
kertaiseksi.

Kullekin testiryhmälle annettiin kantaja-annos lei-
maamatonta ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaatto-
ria. Ihmisen leimaamattoman kudostyyppisen plasminogeeni-
35 aktivaattorin farmakokineettiset käyrät eivät eronneet
toisistaan millään tutkitulla ryhmällä. Tämä toimii sisäisenä

kontrollina sen varmistamiseksi, että kuhunkin ryhmään valituilla kaniineilla ei sattumalta ollut epätavallisia eliminointiominaisuuksia.

5 Gln₁₁₇-t-PA- ja Gln₁₁₇Glu₂₇₅-t-PA-mutanttien farmakokinetiikka

Kuvio 5 esittää glutamiini₁₁₇-t-PA:n ja vertailu-ihmis-t-PA:n farmakokinetiikkaa. Glutamiini₁₁₇-t-PA poistui paljon hitaammin kuin vertailuaine.

10 Esimerkissä 3 kuvatulla tavalla valmistetulla glutamiini₁₁₇-glutamiinihappo₂₇₅-t-PA:lla oli samankaltainen käyrä, kuten kuviosta 6 ilmenee.

Fibriinisitoutumisominaisuudet

Sitoutuminen fibriiniin on äärimmäisen tärkeä tekijä, joka otaksuttavasti liittyy suoraan ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin fibriinispesifisyyteen in vivo. Ihmisen endo H:lla käsitellyn kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin sitoutumista fibriiniin arvioitiin kahdella menettelyllä. Ensimmäisessä menettelyssä käytettiin hyväksi ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin tarttumista fibriiniin, jolla on päällystetty tavanomaisen mikromaljan syvennys; kukin syvennys pestään sitten, ja lisätään plasminogeenin ja plasmiinin kromogeenisen substraatin (S-2251, Kabi) liuosta. Kehittyvä väri on verrannollinen alkuvaiheessa tarttuneen kudostyyppisen ihmis-

25 plasminogeeniaktivaattorin määrään [Angles-Cano, Thrombosis and Haemostasis 54 (1985) 171]. Toisen tyyppisessä fibriinisitoutumismäärityksessä mitataan liuokseen jäävän kudostyyppisen ihmisplasminogeeniaktivaattorin määrää (ELISA:lla), kun lisätään trombiinia plasmiinigeenivapaan fibrinogeenin

30 ja ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin liuokseen [Rijken et al., J. Biol. Chem. 257 (1982) 2920]. Tällä hetkellä on epäselvää, kumpi määritys ennustaa riittävän hyvin ihmisen muunnetun kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin sitoutumista fibriiniin in vivo. Näistä kokeista

35 saatujen tulosten perusteella voidaan päätellä, että ihmisen endo H -käsitellyn plasminogeeniaktivaattorin fibriinispesifisyys on ainakin ennallaan ellei parantunut.

Vastaavasti esimerkin 3 mukaisen glutamiini₁₁₇-glutamiinihappo₂₇₅-t-PA:n fibriinisitoutumistestitulokset osoittivat, että glutamiini₁₁₇-glutamiinihappo₂₇₅-t-PA on samankaltainen kuin glutamiinihappo₂₇₅-t-PA ja ylivoimainen
5 vertailu-t-PA:han nähden fibriinin stimuloinnissa ja ominaisaktiivisuudessa.

Esimerkki 7

Esimerkeissä 1 ja 2 kuvatulla tavalla valmistetuista gln₁₁₇- ja met₁₁₉-mutanteista tutkittiin kummastakin fibri-
10 nolyttinen aktiivisuus, jolloin saatiin samanlaisia tuloksia kuin edellä kuvatulla endo H -käsitellyllä materiaalilla. Molempien aineiden farmakokinetiikka on myös samankaltainen kuin endo H -käsitellyllä materiaalilla verrattuna
15 edellä kuvatulla tavalla ihmisen kudostyyppisiin vertailu-plasminogeeniaktivaattoreihin.

Esimerkki 8

Farmaseuttiset koostumukset

Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet voidaan formuloida tunnetuin menetelmin farmaseuttisesti käyttökelpoisten
20 koostumusten valmistamiseksi, joissa menetelmissä keksinnön mukainen ihmisen kudostyyppinen plasminogeeniaktivaattori-tuote yhdistetään farmaseuttisesti hyväksyttävään kantajaan. Soveltuvia kantajia mukaan luettuina muut ihmisproteiinit, esimerkiksi ihmisen seerumialbumiini, ja niiden formuloin-
25 tia kuvataan esimerkiksi teoksessa E. W. Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, joka mainitaan tässä viitteenä. Tällaiset koostumukset sisältävät vaikuttavat määrän keksinnön mukaista proteiinia ja sopivan määrän kantajaa isännälle tehokkaasti annettaviksi soveltuvien farmaseuttisesti
30 hyväksyttävien koostumusten valmistamiseksi.

Keksinnön mukaista ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria voidaan antaa esimerkiksi parenteraalisesti sydän-verisuonisairauksia tai -tiloja poteville. An-
nostus ja antonopeus voi olla samansuuntainen kuin se, mi-
35 tä nykyisin käytetään muiden kardiovaskulaaristen, trombo-lyyttisten aineiden kliinisisissä tutkimuksissa, esimerkiksi

noin 1-2 mg/painokilo laskimon- tai valtimonsisäisenä annoksena 1,5-12 tunnin aikana potilaille, joilla on sydäninfarkti, keuhkotulppa jne.

Eräänä esimerkkinä asianmukaisesta annostusmuodosta on pullo, joka sisältää 50 mg ihmisen kudostyyppistä plasminogeeniaktivaattoria, arginiinia, fosforihappoa ja polysorbaatti 80:ä, ja jonka sisältö voidaan saattaa annettavaksi soveltuvaan tilaan sekoittamalla se 50 ml:aan injektioihin soveltuvaa vettä ja sekoittaa sopivaan määrään 0,9-%:ista natriumkloridi-injektioliuosta.

Ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin pidentynyt puoliintumisaika saattaa soveltua nopeaan injektointiin i.v. Tämä poistaisi monimutkaisten antomenettelyjen tarpeen ja saattaa lisätä mahdollisuuksia käyttää t-PA:ta tilanteissa, joissa lääketieteellisiä laitteita on rajoitetusti, kuten ambulansseissa, jotka on miehitetty hoitohenkilökunnalla, jolla ei ole lääkärikoulutusta. Ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin pidentynyt puoliintumisaika saattaa myös mahdollistaa alempia, turvallisempia alkuannoksia ja voisi ylläpitää trombolyyttisesti vaikuttavia plasmiinipitoisuuksia jopa 45 min tai pidempään. Ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin pidentynyt puoliintumisaika saattaa olla käyttökelpoinen myös pitkäaikaiseen hoitoon pienillä annoksilla, joka voi olla tarpeen onnistunutta akuuttia trombolyyysiä seuraavan uudelleen-tukkeutumisen välttämiseksi tai pitkäaikaisessa trombolyyssissä, joka voi olla tarpeen ääreislaskimotukoksissa.

Vaikka edellä esitetty viittaa tiettyihin edullisiin suoritusmuotoihin, ymmärrettäneen, ettei keksintö rajoitu niihin. Alan ammattimiehille lienee ilmeistä, että esitettyjä suoritusmuotoja voidaan muuntaa eri tavoin ja että tällaiset muunnokset on tarkoitettu kuuluviksi tämän keksinnön piiriin.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä ihmisen kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että kudostyyppisessä
- 5 plasminogeeniaktivaattorissa on 527 aminohappoa, jonka hiilihydraattirakennetta modifioidaan endoglykosidaasientsyymikäsittelyllä siten, että biologinen aktiivisuus on säilynyt olennaisesti ennallaan ja jolla on lisääntynyt in vivo puoliintumisaika ja että entsyymikäsittely eliminoi
- 10 funktionaalisen hiilihydraattirakenteen aminohapporyhmästä 117, säilyttäen hiilihydraattirakenteet muilta osin modifioimattomina.

PATENTKRAV

1. Förfarande för framställning av en plasminogenaktivator
av människovävnadstyp, kännetecknat av att plasminogenakti-
5 vatorn av vävnadstyp innehåller aminosyra 527 vars kol-
hydratstruktur modifieras med en endoglykosidasenzymbe-
handling så att den biologiska aktiviteten har hållit sig
väsentligen oförändrad och som har ökad in vivo -halverings-
tid, och att enzymbehandlingen eliminerar den funktionella
10 kolhydratstrukturen ur aminosyregrupp 117 men annars bibe-
håller den kolhydratstrukturerna omodifierade.

Fig. 1.

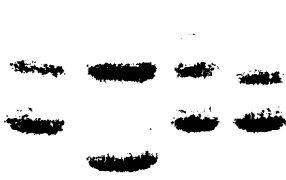
1 2

K I →
K II →
P →

Fig. 2.

1 2 3 4

K I →
K II →
P →



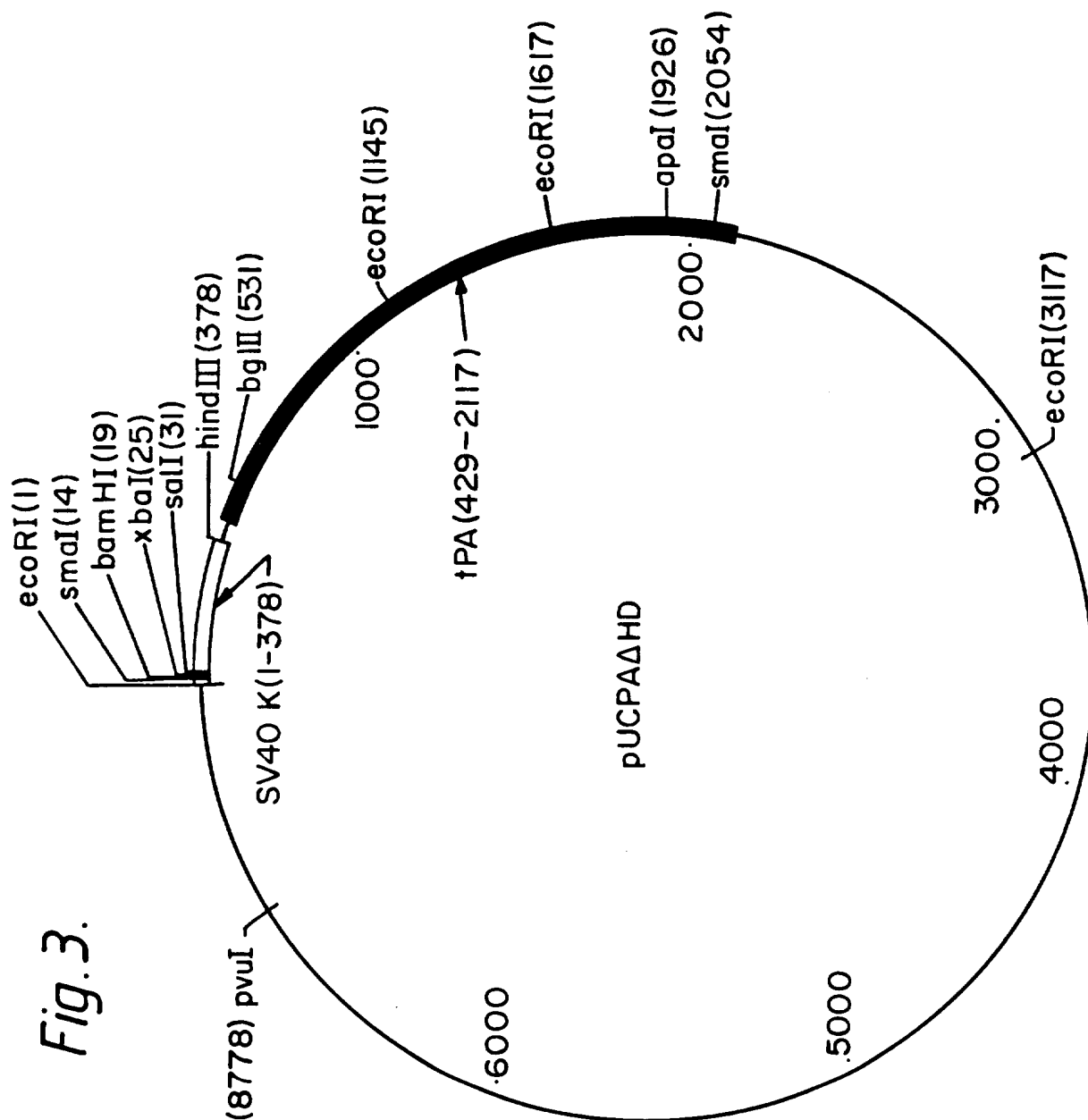


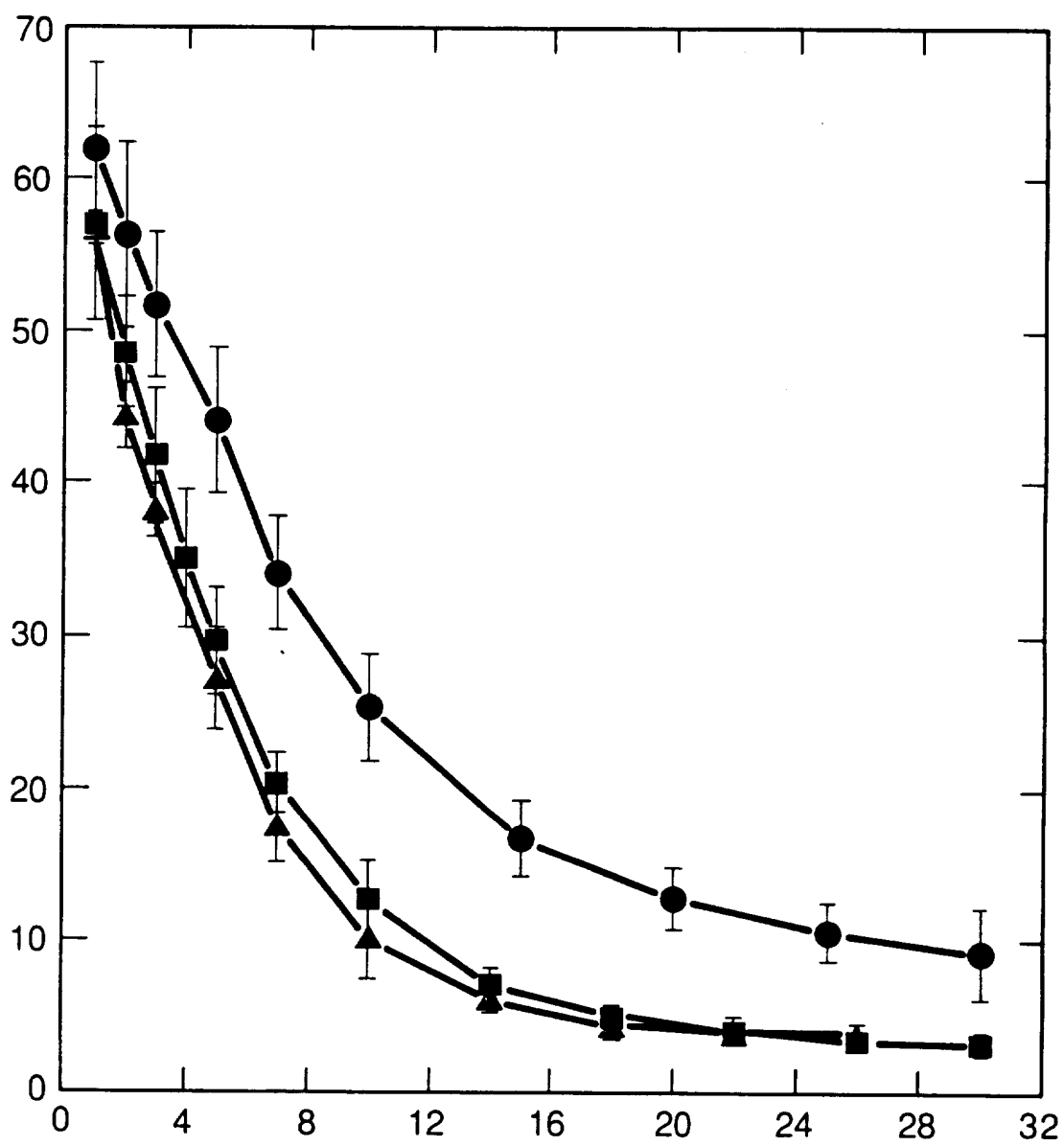
Fig.4.

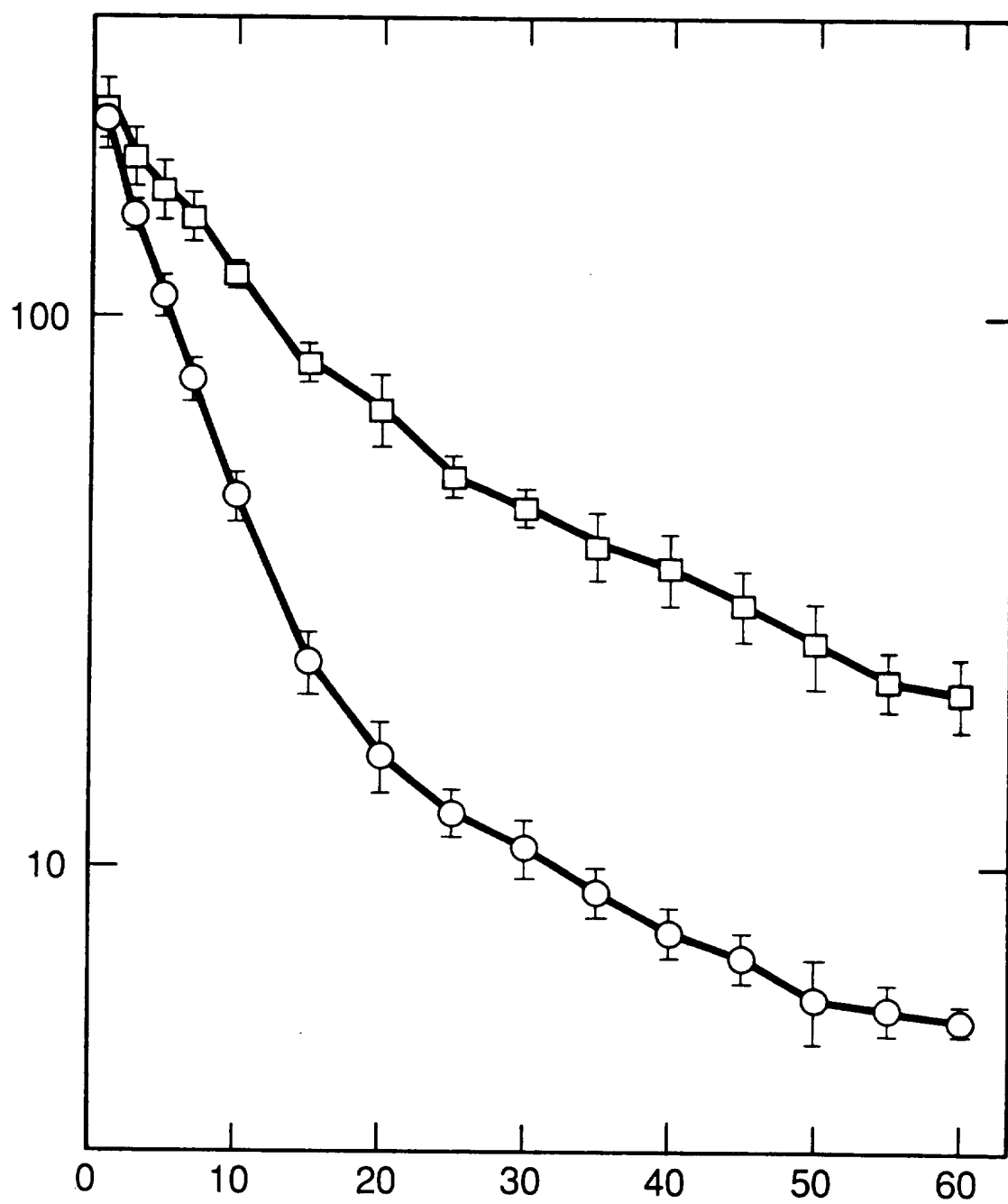
Fig.5.

Fig.6.