

**MEMÓRIA DESCRITIVA**

**DA**

**PATENTE DE INVENÇÃO**

**Nº 93.757 G**

**NOME:** VASCULAR LABORATORY, INC.

**EPÍGRAFE:** MÉTODO PARA PRODUIR UM COMPLEXO ACTIVADOR PLASMINOGÉNICO DE PRO-UROQUINASE PURA LIGADA COVALENTEMENTE POR MEIO DE UMA PONTE DE DISSULFURETO A ALBUMINA DO SORO HUMANO"

**INVENTORES:** VICTOR GUREWICH ; JEROME BRETON

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

1989/04/13 ; US; Nº 337.321

1990/03/23 ; US; Nº. 498.210

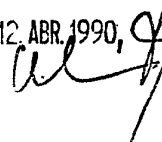
12. ABR. 1990



## - R E S U M O -

"MÉTODO PARA PRODUZIR UM COMPLEXO ACTIVADOR PLASMINOGÉNICO DE PRO-UROQUINASE PURA LIGADA COVALENTEMENTE POR MEIO DE UMA PONTE DE DISSULFURETO, A ALBUMINA DO SORO HUMANO"

Descreve-se um método para produzir um complexo de pro-uroquinase consistindo em pro-uroquinase ligada covalentemente, por uma ligação de dissulfureto a albumina do soro humano para formar um complexo activador plasminogénio, fibrinolíticamente activo, com uma semi-vida do plasma mais longa do que a da própria pro-uroquinase.

12. ABR. 1990, 

1

5

O presente invento refere-se a um método para produzir um complexo activador plasminogénio de pro-uroquinase pura ligada covalentemente por meio de uma ponte de dissulfureto a albumina do soro humano.

10

Esta invenção refere-se ao uso de pro-uroquinase como agente trombolítico para dissolver coágulos de fibrina em pacientes humanos.

15

A pro-uroquinase (pro-UK) é um precursor (jímogénio), de cadeia simples, 55K dalton, da uroquinase de cadeia dupla (UK). A pro-UK é descrito em Husain e outros U.S. Re. 32.221, aqui incorporado para referência. A activação da pro-UK de cadeia simples, por meio da sua conversão enzimática na forma de uroquinase de cadeia dupla, é uma característica da família serina-protease à qual ela pertence. É conhecido que a pro-UK tem um rápido tempo de eliminação (cerca de 5 a 8 minutos) do plasma quando injectada intravenosamente. Este tempo de eliminação é em certa medida mais curto do que o do ser derivado activo, de grande peso molecular, a UK de dupla cadeia.

20

25

A presente invenção refere-se a um complexo activador plasminogénio de pro-UK pura covalentemente ligada a albumina do soro humano (HSA), que de forma marcada retarda a eliminação da pro-UK do plasma mas ao mesmo tempo preserva as suas propriedades fibrinoléticas. No sentido aqui usado, "pro-UK" significa naturalmente pro-UK efectiva ou de recombinação, qualquer pro-enzima mutante de substituição da pro-UK, ou qualquer cadeia simples, derivado biologicamente activo ou fragmento de pro-UK que contenha um resíduo de cis-

30

35

12. ABR. 1990

1 tina disponível para obter a permuta tiol-dissulfureto com a  
cisteína livre da HSA, como a seguir é descrito com maior de-  
talhe. No sentido aqui usado, "HSA" significa naturalmente  
HSA efectiva ou de recombinação. No sentido aqui usado, "pu-  
5 ro" significa que o complexo antes de ser usado é substan-  
cialmente (95% ou mais em peso) livre de outros materiais,  
por exemplo, outros componentes do sangue ou de cultura de  
tecidos.

10 Dado que o complexo da invenção tem in vivo  
uma semi-vida muito mais longa do que a própria pro-UK, a  
sua utilidade na terapêutica trombolítica é maior. Mais ain-  
da, o complexo da invenção pode ser usado na prevenção da  
trombose assim como na prevenção de longa duração das doen-  
15 ças cardiovasculares, tais como a arteriosclerose, que, como  
é bem conhecido, está associada a uma actividade fibrinoli-  
ticamente diminuída.

20 O complexo pro-UK:HSA da invenção, por causa  
da sua melhorada semi-vida in vivo, pode ser administrado em  
uso terapêutico por injeção intravenosa. Isto representa um  
melhoramento sobre o uso terapêutico da própria pro-UK, a  
qual, devido à sua curta semi-vida in vivo, tem que ser admi-  
nistrada por contínua infusão intravenosa, o que complica  
25 grandemente a terapia, especialmente fora dum hospital.

30 Outras características e vantagens da inven-  
ção tornar-se-ão patentes a partir da descrição que se segue  
das suas realizações preferidas e a partir das reivindica-  
ções.

São descritos primeiramente os desenhos

#### Desenhos

35 A Fig. 1 (a) é um diagrama esquemático da to-  
talidade da cadeia simples da molécula de pro-UK (Holmes e

12. ABR 1990  


1 outros, Biotecnologia (1985), 3, 923-929); a Fig 1 (b) é uma  
ilustração diagramática de pro-UK de cadeia simples covalen-  
temente ligada a albumina.

5 A Fig. 2 mostra a cromatografia de filtração  
da mistura de incubação pro-UK/HSA (4 h a 37°C). Fracções de  
0,5 ml foram colhidas e analisadas para avaliação do conteú-  
do de proteína e da actividade fibrinolítica (0).

10 A Fig. 3 é um zimograma de pro-UK incubada  
em amortecedor (faixa 2), em albumina do soro humano (HSA)  
(faixa 3), em plasma CBS (faixa 4), em plasma CBS e HSA (fai-  
xa 5), e um plasma (faixa 6). As faixas 7 a 10 são de pro-UK  
15 incubada com HSA depois de ter passado através de uma coluna  
α(UK)-Sephadex.

A Fig. 4 é um zimograma do complexo purifica-  
do (faixas 2,3), do complexo purificado incubado com α(HSA)  
durante 1 hora (faixa 4), e do complexo purificado passado  
20 através de uma coluna α(HSA)-Sephadex. A amostra na faixa 3  
foi fervida durante 2 minutos em amortecedor SDS antes da  
electroforese em vez de ser tratada pelo procedimento stan-  
dard envolvendo a incubação em amortecedor SDS a 37°C duran-  
te 30 minutos.

25 A Fig. 5 é um zimograma de pro-UK incubada  
com HSA purificada sob pH 5 (2), pH 9 (4), e sob pH 7,5 (3)  
com Zn<sup>++</sup> (6), CA<sup>++</sup> (7), Zn<sup>++</sup>, CA<sup>++</sup> (8) e com uma razão pro-  
-UK/HSA dez vezes mais alta (9).

30 A fig. 6 é um zimograma de pro-UK incubada  
em amortecedor (faixa 2), em plasma durante 0 h (faixa 3),  
1 h (faixa 4), 2 h (faixa 5), e 6 h (faixa 6), e de UK em a-  
mortecedor (faixa 7), em plasma durante 0 h (faixa 8) e 6 h  
35 (faixa 9) e em urina concentrada (faixa 10).

12. APR. 1970

1 A Fig. 7 é um zimograma de DFP e HSA com tra-  
tamento de cloramina T (que não afecta a formação do comple-  
xo) e BSA com tratamento de DTT (que restaura a sua capacida-  
de para formar complexos com pro-UK), com pro-UK em amorteced-  
5 dor (faixa 1), pro-UK+HSA (faixa 2), pro-UK+HSA tratada com  
amortecedor (faixa 3), pro-UK + HSA tratada com DFP (faixa 4)  
pro-UK+HSA tratada com amortecedor (faixa 5), pro-UK+HSA tra-  
tada com cloramina T (faixa 6), pro-UK em amortecedor mostran-  
do a presença de um dímero (faixa 7), pro-UK+BSA mostrando  
10 sómente o mesmo dímero de pro-UK (faixa 8) e pro-UK+BSA trata-  
da com DTT (para restaurar a forma tiol) mostrando a virtual  
eliminação do dímero e a presença do complexo pro-UK:BSA(fai-  
xa 9).

15 As Fig. 8A e 8B são zimogramas que mostram o  
efeito da PDI no curso do tempo de obtenção do complexo: só-  
mente com pro-UK em amortecedor (faixa 1) com pro-UK recombi-  
nante ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ) incubada com mercaptalbumina ( $40 \text{ mg/ml}$ ) du-  
rante tempos de incubação de 0 min. (faixa 2), 15 min. (faixa  
20 3), 30 min. (faixa 4), 1 h (faixa 5), 2 h (faixa 6), e 4 h  
(faixa 7) na Fig. 8A, e as mesmas misturas, respectivamente,  
incubadas em presença da PDI ( $920 \mu\text{g/ml}$ ) na Fig. 8B.

A Fig. 9 é um zimograma que mostra o efeito  
25 da PDI na resposta em dose de complexo: sómente com pro-UK em  
amortecedor (faixa 1), e com pro-UK ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) incubada com  
mercaptalbumina ( $40 \text{ mg/ml}$ ) durante 6 h com concentrações de  
PDI em  $\mu\text{g/ml}$  de 0 (faixa 2), 23 (faixa 3), 230 (faixa 4),  
460 (faixa 5), 690 (faixa 6) e 920 (faixa 7).

30 A Fig. 10 é um zimograma do complexo de pro-  
-UK formado com rec-HSA de E. coli.

A Fig. 11 é um zimograma de amostras prepara-  
35 das em SDS a  $37^\circ\text{C}$  de pro-UK ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ) incubadas ( $37^\circ\text{C}$ ) em

12. ABR. 1990

1 em amortecedor durante 0 h (faixa 1) e 6 h (faixa 2); e em  
plasma durante 0 h (faixa 3), 1 h (faixa 4), 4 h (faixa 5) e  
6 h (faixa 6); e em plasma esgotado de plasminogénio conten-  
do aprotinina (20 KIU/ml) durante 0 h (faixa 7), 1 h (faixa  
5 8), 4 h (faixa 9) e 6 h (faixa 10).

A Fig. 12 são zimogramas das seguintes amos-  
tras: pro-UK (0,5  $\mu$ g/ml) incubada (37°C) em amortecedor (fai-  
xa 1), e com CBS-HSA (40 mg/ml) (faixa 2), incubada em plas-  
ma desprovido de HSA (faixa 3), incubada em plasma desprovi-  
do de HSA suplementado com HSA (faixa 4), plasma antes pré-  
-incubado com pro-UK (faixa 5) e depois da passagem por uma  
coluna Sephanose UK-Ab (não mostradas 4 fracções, faixas 6-  
-9).

15

A Fig. 13 é um zimograma (10% SDS-PAGE) das  
seguintes diferentes formas de UK (0,5  $\mu$ g/ml) pré-incubada  
(6 h) com mercaptalbumina (40 mg/ml); HMW-UK em amortecedor  
(faixa 1), HMW-UK+HSA (faixa 2), LMW-UK em amortecedor (fai-  
xa 3), LMW-UK+HSA (faixa 4), rec.-pro-UK+HSA (faixa 5), mutan-  
20 te de substituição da pro-UK em amortecedor (faixa 6), mutan-  
te de substituição da pro-UK+HSA (faixa 7).

A Fig. 14 são manchas de imunidade acidentais  
(Western immunoblots) usando UK:Ab, pro-UK (0,3  $\mu$ g/ml) incu-  
bada (37°C) 7 h em amortecedor (faixa 1), pro-UK incubada  
com BSA não tratada (40 g/ml) (faixa 2), pro-UK incubada  
com CBS-HSA (faixa 3), sómente CBS-HSA (faixa 4) e misturas  
que são as mesmas das faixas 1 a 4, respectivamente, proces-  
sadas sob condições redutoras (faixas 5-8).

30

A Fig. 15 é um zimograma de pro-UK incubada  
em amortecedor (faixa 1), com 0,5 min de glutathiona oxidada  
(GSSG) (faixa 2), com 5 mM de GSSG (faixa 3), e incubada em  
35 plasma (faixa 4), com 0,5 mM GSSG (faixa 5), e com 5 mM GSSG

12 ABR 1990

1 (faixa 6).

5 A Fig. 16 é um zimograma de pro-UK incubada em amortecedor (faixa 1) com  $10^{-3}M$  (2),  $3 \times 10^{-3}M$  (3),  $6 \times 10^{-3}M$  (4),  $10^{-2}M$  de DTNB (5), e incubada em plasma (6) com  $10^{-3}M$  (7),  $3 \times 10^{-3}M$  (8),  $6 \times 10^{-3}M$  (9), e  $10^{-3}M$  de DTNB (10).

10 A Fig. 17 são zimogramas mostrando o efeito da concentração do pH e da HSA na formação do complexo. Com somente pro-UK em amortecedor (faixa 1), com pro-UK ( $5 \mu g/ml$ ) incubada ( $37^{\circ}C$ ) durante 24 h com mercaptalbumina ( $40 mg/ml$ ) sob pH 6 (faixa 2), sob pH 7,0 (faixa 3), sob pH 7,4 (faixa 4), sob pH 8,0 (faixa 5), sob pH 8,5 (faixa 6), e com indicadores de MW como standard (faixa 7), e com pro-UK ( $5 \mu g/ml$ ),  
15 incubada ( $37^{\circ}C$ ) durante 24 h com HSA de concentração  $80 mg/ml$  (faixa 8),  $20 mg/ml$  (faixa 9) e  $10 mg/ml$  (faixa 10). Faixas 8-10 incubadas sob pH 8,0.

20 A Fig. 18 são zimogramas da actividade da UK associada com CBS-HSA, com CBS-HSA de plasma pré-incubada (20 h) com pro-UK ( $0,5 \mu g/ml$ ) (faixa 1), com CBS-HSA de plasma enriquecida (mas não pré-incubada) com pro-UK ( $5 \mu g/ml$ ) (faixa 2), e com complexo de UK imunoprecipitado de CBS-HSA isolado do plasma fresco (faixa 3).

25 A Fig. 19A é um gráfico de dois conjuntos de dados. O número fracionário das fracções obtidas pela filtração gel do plasma numa coluna calibrada G-75 é marcado no eixo dos X para ambos os conjuntos de dados, e a absorção a  
30  $280 nm$  é marcada no eixo dos Y com círculos brancos enquanto que a área de diisolução em  $nm^2$  obtida nos testes em placa de fibrina é marcada no eixo dos Y com círculos pretos.

35 A Fig. 19B é um zimograma de imunoprecipitados de UK obtidos do conjunto das fracções identificadas como



12. APR. 1996

1 A, B, C e D na Fig. 11A.

### Caracterização

5 O complexo pro-UK: albumina da invenção exibe as seguintes características: 1) é mais estável em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 37°C do que a 100°C; 2) é instável sob condições redutoras; 3) a formação do complexo é favorecida quando a HSA é primeiro tratado com ditioneitol (DTT) em ordem a restaurar a forma tiol; 4) A formação do complexo  
10 é catalizada por proteína dissulfureto-isomerase (PDI), e 5) a formação do complexo é inibida por DTNB e glutathione oxidada. Estas características indicam uma ligação dissulfurada entre um resíduo livre de cisteína na albumina e um resíduo de cistina na pro-UK. Com base em experiências nas quais não  
15 se verificou a formação do complexo quer com o mutante de substituição da pro-UK resultante da perda dos radicais 11-135 quer com LMW-UK, crê-se que a cistina da pro-UK responsável pela ligação dissulfurada do complexo está na cadeia A, sendo muito provavelmente uma do par de cistinas do grupo NH<sub>2</sub>-  
20 -terminal da extremidade da pro-UK.

Quando a HSA purificada é armazenada por longos períodos, a sua capacidade para formar complexos com pro-UK é eventualmente perdida devido à oxidação da cisteína livre, o que impossibilita a permuta dissulfurada. Contudo a  
25 sua capacidade para formar complexos com pro-UK pode ser restaurada por meio de tratamento com DTT. Este último tratamento é processado sob pH ácido de maneira a deixar intactas as ligações estruturais dissulfuradas na HSA.

30

### Metodologias

#### Sumário da metodologia

São descritos a seguir em detalhe dois métodos para produzir a composição trombolítica da invenção. Em  
35 cada um dos métodos, a pro-UK e a albumina são primeiro puri-

12 APR 1990

1 ficadas individualmente e em seguida combinadas por meio de uma ligação dissulfurada (ver Fig. 1A e 1B).

5 No primeiro método, a albumina é tratada com DTT sob pH 6,0 para restaurar a forma tiol de acordo com o método tornado conhecido em Peters, T. Advances In Protein Chemistry (Progressos na química das Proteínas), 37: 161-245 (1985). O DTT é em seguida removido por meio de diálise antes da união do pro-UK e da albumina na presença de PDI.

10

No segundo método, pro-UK e mercaptalbumina purificadas são combinadas durante a incubação sob pH 8,0 (37°C).

15

### Materiais e métodos

#### Purificação da Pro-UK

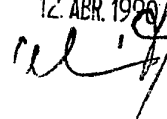
20 No primeiro método a seguir descrito, a pro-UK, purificada a partir do meio de cultura de uma linhagem de células de rim humano, foi obtida por Collaborative Research Inc. (Bedford, MA). Para evitar traços de contaminantes de UK, a pro-UK foi incubada com 20 µM de dansil-Glu-Gly-Arg clorometil acetona (GGack) durante 30 min. a 37°C em 0,1M HEPES, 0,2 mg/ml BSA, 0,001% Tween, pH 7,4, como previamente descrito em Pannell e outros, Blood, 69: 22-26 (1987). No segundo método também descrito a seguir, preparação de pro-UK foram passadas através de uma coluna Sephadex G-75 (1x45 cm), equilibrada e eluted com 10mM de acetato de sódio, 0,1 NaCl, e 0,001% Tween, pH 0,8, em ordem a remover os dímeros da pro-UK. A pro-UK foi em seguida tratada como acima descrito para evitar traços de contaminantes de UK.

30

#### Purificação da Albumina

35 A purificação de albumina do soro humano de plasma de banco foi levada a cabo em conformidade com procedimentos conhecidos. Uma coluna de Cibaeron Blue-Sepharose

12. ABR. 1990



1 (CBS) foi equilibrada com 0,63% de citrato trisódico e 0,9%  
de NaCl, e 10 ml de plasma de banco foi aplicada à coluna.  
Quando a absorvência a 280nm era menor do que 0,02, a HSA foi  
5 eluída com 0,2M de tiocianato de sódio, dialisada contra á-  
gua destilada, e secada por congelamento.

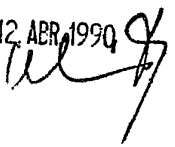
#### Preparação de plasma sem plasmenogénio

Plasma livre de plasmenogénio foi preparado  
por separação em fornada (de uma só vez), a qual foi levada  
10 a cabo excitando 1 ml de Lys-agarose previamente equilibrada  
em 0,005 M HEPES e 0,15 M NaCl (pH 7,4) com 5 ml de plasma  
durante 2 h a 49°C. Depois da centrifugação, a parte sobrena-  
dante foi recolhida e analisada do seu conteúdo de plasmeno-  
génio usando uma técnica standard de dissolução do coágulo.

15

#### Zimografia e Método das manchas (Blotting)

A electroforese de gel de dodecil sulfato-  
-poliacrilamida de sódio (SDS PAGE) foi executada da forma  
descrita por Laemmli usando um gel de poliacrilamida a 7,5%.  
20 As amostras foram preparadas sem redução e aquecidas a 37°C  
durante 37 min. numa amostra de amortecedor (0,06 M tris-HCl,  
pH 6,8, 2% SDS) antes da electroforese excepto quando especi-  
ficado outra coisa. A zimografia foi levada a cabo lavando  
os gels com 2,5% de Triton X 100 e subsequentemente cobrindo  
25 os gels em placas de agar fibrina plasmenogénio como descri-  
to por Wun e outros. Método das manchas ocidental (Western  
Blotting) foi levado a cabo baseado em procedimentos descri-  
tos por Towbin e Pluskal e outros, com algumas modificações  
standard. O gel de poliacrilamida e quatro papéis de filtro  
30 foram equilibrados em amortecedor de mancha (39 mM de glici-  
na, 48 mM de tris, 20% de metanol, 0,0375% de SDS). A membra-  
na de difluoreto de polivinilideno (PVDF) foi pré-molhada em  
metanol durante alguns segundos e em seguida equilibrada em  
água destilada durante 10 minutos. A assemblagem das manchas  
35 foi preparada segundo uma configuração de sandwich e a trans-

12. ABR 1990  


1 ferência electroforética levada a cabo com o aparelho de man-  
cha semi-seca LKB Multipore durante 1 h usando uma densidade  
de corrente de  $0,8 \text{ mA/cm}^2$ . Depois da transferência, a membra-  
na de PVDF foi lavada em primeiro lugar durante 10 min. com  
5 TTBS (100mM de tris, 0,15 M NaCl, 0,1% de Tween-80, pH 7,5)  
e em seguida durante 1 h com TTBS com 3% de BSA.

Na obtenção de dados usando o primeiro méto-  
do das manchas de imunidade foi executado depois duma incu-  
10 bação principal com anticorpos de coelho anti-UK ( $10 \mu\text{g/ml}$ )  
ou com Ab monoclonal junto a HSA (diluição de 1:500) em TTBS  
0,25% BSA (37°C), e uma incubação secundária, com uma dilui-  
ção a 1:1000 em TTBS 0,25% BSA de fosfatase alcalina IgG con-  
jugada (Sigma) de cabra anti-coelho ou coelho anti-rato du-  
15 rante 1 h (37°C). Na obtenção de dados usando o segundo méto-  
do, foi empregada uma solução de  $13 \mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ (UK) em TTBS  
(com 0,25% de BSA) na incubação principal (2 h a 37°C) e fos-  
fatase alcalina conjugada diluída a 1:500 em TTBS 0,25% BSA  
na incubação secundária (2 h a 37°C).

20 A reacção de cor empregou uma solução de sal  
5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato-toluidínico (0,15 mg/ml) e  
cloreto p-nitro azul tetrazólio (0,3 mg/ml) em amortecedor  
de carbonato (0,1 M de carbonato de sódio, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH  
25 9,8). A membrana de PVDF foi lavada entre cada incubação  
três vezes durante 10 minutos com TTBS. Uma subsequente lava-  
gem de 15 min. em amortecedor de carbonato foi levada a cabo  
antes da reacção de cor.

### 30 Testes de Enzima

A actividade amidolítica de pro-UK/UK foi me-  
dida usando métodos standard com substrato de Kabi S2444 a  
37°C. O reagente amortecedor foi 0,1M tris-HCl, 0,1 M NaCl,  
0,1 mg/ml BSA,  $100 \mu\text{g/ml}$  aprotinina, pH 8,8; e o substrato  
35 foi 0,75 mM. A reacção foi parada com salina/5% ácido acéti-

12. APR. 1990  


1 co (1:1) e a absorvência lida a 405 nm. A actividade do acti-  
vador plasmenogénio foi medida ou com as placas standard de  
agar fibrina ou com Glu-plasmenogénio e substrato Kabi S2251.

5 Formação e purificação do  
complexo pro-UK:Albumina

Método 1

A forma tiol da HSA ou BSA foi regenerada pa-  
ra se aproximar do teórico 1 SH por molécula (mercaptalbumi-  
10 na) por meio de tratamento com 10 mM de ditionitroto (DTT)  
sob pH 6,0 (50 mM de MES, 0,15 M de NaCl) de acordo com o mé-  
todo descrito por Peters, T. Adv. Prot. Chem., 37:161-245  
(1985). As ligações estruturais dissulfuradas são preserva-  
das sob pH 5-7. O DTT foi eliminado por meio de diálise. O  
15 complexo pro-UK:albumina foi preparado por incubação de pro-  
-UK (5 µg/ml) na presença de PDI (920 µg/ml) ou com BSA a  
37°C durante pelo menos 4 h em 0,1 M de amortecedor HEPES  
(pH 8,0). Subsequentemente, 200 µl da mistura foi aplicada a  
uma coluna Sephadex G-75 (1x45 cm), equilibrada e eluted com  
20 0,1 M HEPES, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,001% Tween 80, 20 KIU/ml  
aprotinina. Fracções de 0,5 ml foram colhidas e analisadas  
no seu conteúdo de proteína (absorvência a 280) e actividade  
fibrinolítica. O complexo, sob condições não redutoras, mi-  
gra para um peso molecular aparente de ~ 100 kDa, comparado  
25 com indicadores standard. Contudo, sob as condições usuais,  
o complexo migra para trás dos dímeros da pro-UK. O verdadei-  
ro peso molecular do complexo pro-UK: HSA crê-se que seja ~  
120 kDa. Foram reunidas três fracções correspondendo a ~ 120  
kDa.

30

Deve notar-se que poderia ter sido utilizada  
na fase de incubação PDI imobilizada em vez de PDI em solu-  
ção.

35 Método 2

17. APR 1990

O complexo pro-UK:HSA foi preparado incubando 5  $\mu$ g/ml de pro-UK com 40 mg/ml de HSA a 37°C durante 4 h em amortecedor 0,1 M HEPES (pH 7,4) e aplicando em seguida 200  $\mu$ l da mistura a uma coluna Sephadex G-75 equilibrada e eluída com 0,1 M HEPES, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,01% Tween 80, 20 KIU/ml aprotinina. Foram colhidas fracções de 0,5 ml e analisadas no seu conteúdo de proteína (testes de proteína standard) e actividade fibrinolítica (placas de fibrina) como é mostrado na Fig. 2. (Foram juntas as fracções 30-31-32).

O complexo pro-UK: HSA foi reconhecido por meio dum anticorpo de UK policlonal insolubilizado, como mostrado pelo experimento ilustrado na Fig. 3. Quando o complexo pro-UK:HSA purificado foi incubado durante 1 h a 37°C com um anticorpo anti-HSA, a banda de dissolução de 120 kDa vista na zimografia foi substituída por uma banda de mais alto peso molecular, que se pensa representar o complexo com os anticorpos de HSA a ele ligados (Fig. 4). De maneira semelhante o complexo purificado ligado a uma coluna  $\alpha$  (HSA)-Sephareose. Estas verificações corroboram a composição do complexo.

Condições preferidas para a formação do complexo pro-UK:albumina

A capacidade para a HSA ou BSA formar um complexo com pro-UK decresce quando a HSA ou BSA ficam armazenadas durante longos períodos de tempo, devido à oxidação da cisteína livre. Testes de HSA comercial, que não era fresca, por meio da titulação, com 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoato) (DTNB), da cisteína livre disponível (sob condições naturais) revelaram 1 cisteína livre por cerca de 10 moléculas de HSA comercial. Em contraste, HSA purificada de fresco como descrito acima no método 2, continha 1 cisteína livre por cerca de 2 moléculas de HSA. Portanto é recomendado o tratamento da HSA ou BSA com DTT (pH 6,0) antes da incubação para a for-

12 ABR. 1990  
*al*

1 mação do complexo.

Um pH de cerca de 8,0 é preferido para a formação do complexo, como é mostrado na Fig. 5. A formação do complexo pro-UK:HSA verificou-se com pH 7,5 (faixa 3), mas não com pH 5 (faixa 2) ou pH p (faixa 4). A adição de  $\text{Ca}^{++}$  (5 mM) (Fig. 5, faixa 7) ou de  $\text{Zn}^{++}$  (50 M) (faixa 6) e de  $\text{Ca}^{++} + \text{Zn}^{++}$  (faixa 8) não teve efeito, mas  $\text{Cu}^{++}$  (5-10 M) inibiu a formação do complexo.

10

#### Dados Experimentais

##### Formação espontânea no plasma, do complexo pro-UK:Albumina

Foi verificado que o complexo pro-UK:HSA se forma espontaneamente no plasma normal e mostrado que o HSA do plasma normal purificado está associado com a pro-UK. Portanto é de crer que o complexo pro-UK:HSA exista na natureza. Nestas experiências, a pro-UK foi incubada com plasma livre de plasmenogénio, e o peso molecular da actividade do activador plasmenogénio determinada por zimografia.

20

Pro-UK foi pintada a plasma (500 ng/ml) e incubada a 37°C durante uma a seis horas. Em dada altura uma parte da actividade enzimática migrou para um peso molecular aparente de cerca de 100 kDa (peso molecular verdadeiro de cerca de 120 kDa), como é mostrado no zimograma da Fig. 6. Este zimograma mostra pro-UK (faixas 2-6) e UK (8-9) em amor-tecedor e incubadas em plasma durante 0 (faixas 3,8), 1(4), 2(5), ou 6 horas (6,9), A geração no plasma desta nova banda de alto peso molecular (HMW) foi um fenómeno lento e dependente do tempo. Cerca de 10% da actividade enzimática foi encontrada a ~ 120 kDa (tomado como verdadeiro) depois de 6 horas de incubação no plasma, embora a quantificação por meio de zimografia seja no melhor dos casos uma estimativa grosseira. A formação de dímeros de pro-UK não se verificou como

35

12. ABR. 1990

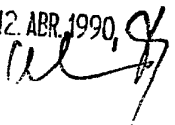


1 é demonstrado pela ausência duma banda de dissolução de HMW  
quando a pro-UK foi incubada em amortecedor. Além disso,  
quando se formaram dímeros de pro-UK, eles migraram para o  
cimo do complexo (ver Figs. 7, 8B, 9, 10). As descobertas  
5 indicam que a pro-UK se liga a uma proteína do plasma de ~  
65k dalton para formar um composto de ~ 120 k dalton.

Um complexo de MW similar feito de UK de  
duas cadeias e dum inibidor de UK, PAI-3 tinha sido anterior-  
10 mente observado na urina e no plasma. Contudo, este complexo  
pode ser excluído como explicação para as descobertas acima,  
pelas seguintes razões: (1) a pro-UK não forma um complexo  
com PAI-3, e (2) no plasma a pro-UK é estável e não é acti-  
vada para a formação de UK de duas cadeias nas concentrações  
15 usadas nas experiências. Finalmente, a formação do complexo  
não foi impedida pela adição de um inibidor à UK (GluGlyArg  
clorometil cetona), um inibidor ao plasmenogénio (aprotini-  
na 20 KIU/ml) ou tornando o plasma livre de plasmenogénio.  
Além disso, a activação da pro-UK durante a incubação e for-  
20 mação dum complexo UK:PAI 1 (activador plasmenogénio inibido  
-1) não condiz com as descobertas visto que o último migra  
para ~ 95kD e simultâneamente é acompanhado por outros com-  
plexos inibidores para ~ 125 kD e ~ 155 kD (Kruithof, E.K.O.  
e outros; Blood, 64 : 907-913 (1984)), assim como por um  
25 quarto complexo para o cimo do gel o qual reage com  $\alpha_2$ -macro-  
globulina-Ab. Além do mais, para reduzir a possibilidade de  
activação da pro-UK durante a incubação, foram executadas ex-  
periências adicionais nas quais aprotinina (20 KIU/ml) foi  
juntada ao plasma desprovido de plasmenogénio. Estes proce-  
30 dimentos não inibiram a formação do complexo de ~ 120 kD  
(Fig. 11, faixas 7-10).

Contudo não foi gerado nenhum complexo acti-  
vador de alto peso molecular quando a pro-UK foi incubada  
35 com plasma desprovido de HSA (plasma CBS), como é mostrado



12. ABR. 1990  


1 na Fig. 3. Estas verificações demonstram que o complexo observado no plasma é composto por pro-UK unida em complexo com HSA.

5 Formação dum complexo de pro-UK com CBS-HSA

Quando pro-UK ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) foi incubada ( $37^\circ\text{C}$ ) durante pelo menos 4 h com CBS-HSA purificada de fresco ( $40 \text{ mg/ml}$  em  $0,1 \text{ M HEPES}$ ,  $\text{pH } 7,4$ ), e a mistura examinada por meio de SDS-PAGE e de zimografia, formou-se com consistência  
10 uma banda de  $\sim 120 \text{ kD}$  (Fig. 12, faixa 2). Em contraste, quando a pro-UK foi incubada em plasma desprovido de CBS, não se formou nenhum complexo (Fig. 12, faixa 3). O reenchimento do plasma desprovido de CBS com CBS-HSA restaura a formação do complexo (Fig. 2, faixa 4). A passagem do plasma contendo o  
15 complexo (Fig. 2, faixa 4) sobre uma coluna Sepharose UK-Ab removeu o complexo (Fig. 2, faixas 6-9).

A formação do complexo foi também observada quando a pro-UK foi incubada com preparações comerciais de  
20 HSA e BSA, desde que elas tenham sido pré-tratadas com DTT em ordem a restaurar a forma tiol.

Sensibilidade do complexo à dissolução em SDS

25 O complexo que se formou depois de incubação da pro-UK com CBS-HSA foi isolado por filtração gel numa Sephadex G-75 e em seguida analisadas por meio de SDS-PAGE. Quando a amostra foi fervida, ocorreu a completa dissolução do complexo, enquanto que a  $37^\circ\text{C}$  foi vista sómente uma dissociação parcial ( $< 50\%$ ) nos zimogramas do gel (não são mostrados os dados).  
30

35 Formação do complexo por diferentes formas de UK com HSA e os efeitos da DFP e da clo-ramina T na formação do complexo

12 ABR 1990

1 A possibilidade do complexo ter sido de facto composto por UK e um inibidor purificado juntamente com HSA na coluna CBS, foi investigada, visto ter-se verificado que a HMW-UK também formava um complexo quando incubada com HSA (Fig. 13, faixa 2) o que não se viu quando a HMW-UK foi incubada em amortecedor (faixa 1). O complexo migrou até ~ 120 kD correspondendo ao complexo formado quando a pro-UK foi incubada em plasma (Fig. 13, faixa 5). Contudo, a incubação de LMW-UK (Aboquinase) com HSA falhou na indução de um complexo (Fig. 13, faixas 3 e 4). Além disso, não se formou nenhum complexo quando um mutante de substituição da pro-UK (sem os resíduos 11-135) foi incubado com HSA (Fig. 13, faixa 7). Estas observações levaram à conclusão de que o complexo não estava com um inibidor da UK e que a formação do complexo implicava a cadeia A da UK e não a metade protease da cadeia B.

20 Para além disso excluir um complexo AK:inibidor, a CBS-HSA foi previamente tratada com DFP em ordem a evitar quaisquer contaminantes de urina protease. Este tratamento falhou na inibição da formação do complexo com pro-UK (Fig. 7, faixa 4, comparada com as faixas 2 e 3). Segundo, para excluir um contaminante de serpina, a preparação de HSA foi tratada com cloramina T, que está provado inactivar as serpinas (Stief e outros, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 369 :1337-1348 (1988)). Este tratamento também falhou na inibição da formação do complexo, levando à conclusão de que o complexo observado pro-UK ou HMW UK não era formado com um inibidor (Fig. 7, faixa 6 comparada com o controle de HSA não tratada, faixa 5).

Evidência de que o complexo é de ligação dissulfurada

35 O método das manchas de imunidade ocidental (Western immunoblotting) usando uma UK-Ab policlonal mostrou

12. ABR. 1990

*al. 8*

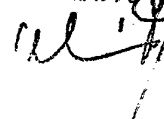
1 uma banda de  $\sim 120$  kD quando a pro-UK foi incubada com CBS-  
-HSA (Fig. 14, faixa 3), mas não quando a pro-UK foi incuba-  
da em amortecedor (Fig. 14, faixa 1) ou com BSA não prévia-  
mente tratada com DTT (Fig. 5, faixa 2). O controle de CBS-  
5 -HSA não deu uma reacção visível com o anticorpo (Fig. 14,  
faixas 4 e 5). O complexo de  $\sim 120$  kD dissociou-se sob con-  
dições redutoras, sugerindo que era de ligação dissulfurada  
(Fig. 14, faixa 7).

10 Evidência adicional indica que o complexo  
pro-UK:albumina é de ligação dissulfurada. Primeiro, a forma-  
ção do complexo foi inibida quando um reagente sulfidrilo co-  
mo glutatona oxidada ou DTNB foi adicionado à mistura rea-  
gente do método 2, como segue. Glutatona oxidada foi adicio-  
15 nada ao plasma e permitida a reacção durante 2 h a 37°C. Os  
resultados são mostrados no zimograma da Fig. 15. As faixas  
1-3 do zimograma mostram a pro-UK incubada em amortecedor.  
Um decrescimento na formação do complexo pro-UK:HSA ocorreu  
com a glutatona, o qual era dependente da sua concentração.  
20 As faixas 2 e 5 são com 0,5 mM de glutatona adicionada e as  
faixas 3 e 6 com 5,0 mM de glutatona adicionada.

A glutatona não inibiu a actividade fibri-  
nolítica da pro-UK, como é mostrado nas três primeiras fai-  
25 xas. Esta resposta à glutatona indica que a cisteína livre  
da albumina está envolvida no complexo, e que portanto a pro-  
-UK e a HSA estão ligadas por uma ponte dissulfurada. De modo  
semelhante, experiências com DTNB, que reage com a cisteína  
livre, mostraram que o DTNB inibiu a formação do complexo. A  
30 Fig. 16 é um zimograma de pro-UK incubada em amortecedor(fai-  
xas 1-5) e com HSA (faixas 6-10) com 0,0 M (faixas 1,6), 1mM  
(faixas 2,7), 3 mM (faixas 3,8), 6mM (faixas 4,9), e 10 mM de  
DTNB (faixas 5,10).

35 Segundo, preparações comerciais de HSA ou

12. ABR. 1990

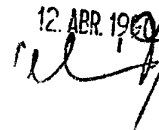


1 de BSA formam poucos ou nenhuns complexos com pro-UK. Isto é  
ilustrado na (Figura 7, faixa 8) que mostra sómente um dímero  
de pro-UK, e na (Figura 14, faixa 2). Além disso, a formação  
de complexo com CBS-HSA preparadas de fresco, decresce com o  
5 tempo de armazenamento. Contudo, a capacidade para formar com-  
plexos com pro-UK por todas estas preparações pode ser res-  
taurada quando elas foram tratadas com DTT. Este efeito numa  
preparação comercial de BSA está ilustrado na (Figura 7, fai-  
xa 9). O efeito do tratamento com DTT sob pH 5-7 é de restau-  
10 rar a forma tiol sem dissociar as ligações estruturais dissul-  
furadas, como descrito por Peters T. Adv. Prot. Chem. 37 : 161-  
-245(1985)). Para isso, as descobertas indicam que uma tiol  
cisteína disponível na HSA ou na BSA é necessária para a for-  
mação do complexo com a pro-UK.

15  
Terceiro, a titulação com DTNB revelou que  
antes do tratamento com DTT, a HSA comercial tinha 0,1 cis-  
teínas disponíveis comparado com 0,6 depois do tratamento. Um  
número comparável foi obtido com CBS-HSA preparadas de fres-  
co. Verificou-se, portanto, uma correlação positiva entre os  
20 cisteínas disponíveis no preparado de HSA e a formação do  
complexo com pro-UK.

Quarto, quando PDI, que cataliza a permuta  
25 dissulfurada no tiol (Freedman, R.B., Cell, 57 : 1069-1072  
(1989); Gilbert, H.F., Biochem., 28 : 7298-7305 (1989) foi  
incluída na mistura de incubação a formação do complexo foi  
acelerada. Sem PDI, 4 h de incubação eram requeridos antes  
que os complexos fossem observados (Fig. 8A), mas na presença  
30 de PDI (920 µg/ml) a formação de complexo ocorria após 1 h  
de incubação (Fig. 8B). O efeito PDI era dependente da sua  
concentração como ilustrado na Fig. 9 na qual pro-UK (10 µg/  
ml) foi incubada durante 6 h com uma preparação de mercaptal-  
bumina (40 mg/ml) com 0, 23, 230, 460, 680 ou 920 g/ml de  
35 PDI. Na presença de PDI, a formação de dímeros de pro-UK era

12. APR. 1960



1 também muito aumentada (Figs. 8A, 8B e 9) sugerindo que estes dímeros são de ligação dissulfurada. A grande quantidade de PDI requerido é consistente com a baixa eficiência desta enzima.

5

A formação de complexo foi inibida quando a amostra foi fervida durante 2 min. em SDS (Fig. 14, faixa 3). Esta constatação é também consistente com um complexo de ligação dissulfurada o qual pode ser desestabilizado pela fervura. Além disso, na presença de  $\text{CuCl}_2$  (1 mM), que inibe a permuta dissulfurada, o complexo resistiu à fervura. A dissociação térmica das ligações dissulfuradas já tinha sido anteriormente referida por Volkin e Klibanov para certos conjugados de ligação dissulfurada (Volkin e outros, J.Biol.Chem. 262 : 2945-2950 (1987)).

15

Uma ligação dissulfurada entre uma cistina da pro-UK e uma cisteína singular de albumina criará uma cisteína livre na ligação pro-UK-albumina. Esta cisteína livre poderá reagir com uma cistina de outra molécula de pro-UK, ou com uma cisteína numa outra molécula de albumina. Sob certas circunstâncias, em vez de um complexo formado por uma molécula de pro-UK e uma molécula de albumina, poder-se-há formar um complexo de duas moléculas de pro-UK ligadas a uma molécula de albumina, ou de duas moléculas de albumina ligados a uma molécula de pro-UK. Estes complexos de três partes foram identificados e estão dentro do âmbito da presente invenção.

20

25

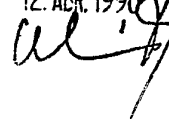
#### Efeito do pH e da concentração da HSA

30

Quando a incubação foi processada sob um pH entre 6 e 8,5, verificou-se que o pH ótimo para a formação do complexo era à volta de 8-8,5 (Fig. 17, faixas 1-6). A maior parte das experiências foram, portanto, levadas a cabo sob pH 8,0. Experiências dentro duma larga gama de razões entre as preparações de HSA e a pro-UK, revelaram que o factor

35

12. ABR. 1990



1 limitativo predominante da formação do complexo era a concen-  
tração de HSA. Isto é ilustrado na Fig. 17 (faixas 8-10) na  
qual 80, 20 e 10 mg/ml de HSA comercial tratada com DTT foram  
incubadas com pro-UK (5 µg/ml). A elevação da concentração da  
5 pro-UK não aumentou a formação do complexo. Além disso, a for-  
mação de complexo mesmo com este excesso de HSA tendeu para  
um patamar ao fim de cerca de 24 h.

#### O efeito de ulterior purificação da HSA

10 As descobertas anteriores sugeriram a possi-  
bilidade de que o complexo de pro-UK estivesse com um conta-  
minante menor, presente na preparação da HSA assim como na da  
BSA. Tentativas para remover um tal contaminante por meio da  
cromatografia das preparações da HSA com celulose DEAE ou pe-  
15 la passagem sobre Sepharose concanavalina-A não alteraram a  
reactividade das preparações com a pro-UK. Portanto, se o con-  
taminante responsável foi uma proteína menor, é pouco prová-  
vel que tenha sido uma não-glicoproteína. Com poucas exce-  
pções (HSA, transtiretina, proteína de ligação retinol), as  
20 proteínas do plasma são todas glicoproteínas (Peters, T., Adv.,  
Prot. Chem., 37 : 161-245 (1985)).

#### Reconhecimento do complexo por anticorpos

25 O complexo de pro-UK que foi formado com HSA  
tratada com DTT altamente purificado de acordo com o método 1  
foi electro-eluído de secções de gel depois da SDS-PAGE, e em  
seguida outra vez submetido à SDS-PAGE. Manchas de imunidade  
com UK-Ab revelaram o complexo em ~ 120kD. Contudo, embora se  
tenha verificado que o complexo foi reconhecido pela HSA-Ab  
30 policlonal em numerosas experiências, ele não foi reconhecido  
pela HSA-Ab monoclonal nesta experiência (dados não mostrados).  
A explicação para esta discrepância pode estar relacionada  
com o sítio essencial da HSA, reconhecido pelo anticorpo mo-  
clonal, sendo mascarado pelo complexo. Apesar de tudo, esta  
35 constatação negativa deixou aberta a possibilidade do comple-

17 ABR 1990  
*[Handwritten signature]*

1 xo de pro-UK ter um contaminante menor de proteína de plasma  
da HSA ou BSA. Portanto, foram conduzidos estudos com rec-HSA  
de E.Coli, livre de todos os contaminantes de proteína do  
plasma.

5

Formação do complexo de pro-UK com rec-HSA

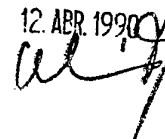
Rec-HSA e HSA natural (40 mg/ml), antes (-)  
e depois (+) de tratamento com DTT, foi cada uma incubada  
(6 h) com pro-UK (5 µg/ml). A análise zimográfica das mistu-  
10 ras da incubação mostrou um complexo de ~ 120 kD(C), tanto  
com a rec-HSA como com a HSA natural, cuja formação foi si-  
gnificativamente aumentada com o tratamento prévio com DTT(+)  
das preparações de HSA. O tratamento com DTT também promoveu  
a formação de complexos de mais alto peso molecular (C') pos-  
15 sivelmente envolvendo a cisteína singular da pro-UK unida em  
complexo com a HSA. Foram observados dímeros (d) da pro-UK  
migrando para cima do complexo de ~ 120 kD (Fig. 10).

Separação do complexo de pro-UK do plasma por meio de cromatografia de afinidade CBS

20

Foi determinado que a pro-UK não ligada em  
complexo não podia ser purificada juntamente com HSA por meio  
de cromatografia de afinidade CBS depois de extensivo lava-  
gem com 0,5 M de NaCl. Isto foi demonstrado por experiências  
25 nas quais pro-UK (5 µg/ml) foi adicionada ao plasma imediata-  
mente antes da cromatografia de afinidade CBS. Sob estas con-  
dições, a eluição HSA não teve actividade fibrinolítica de-  
tectável num zimograma (Fig. 18, faixa 2). A pro-UK livre é  
gradualmente lavada com 0,5 M NaCl, Por contraste, quan-  
30 do o plasma foi pré-incubado (37°C) com pro-UK (5 µg/ml) du-  
rante 20 h, em ordem a permitir a formação do complexo, um  
zimograma da HSA purificada com CBS teve actividade fibrino-  
lítica associada com ele. Isto foi mostrado por zimografia  
da HSA que mostrou bandas migrando para ~ 120 kD e para ~ 55  
35 kD (Fig. 18, faixa 1). Visto ter sido mostrado a pro-UK livre

12. APR. 1990



1 não poder ser co-purificada, a banda de  $\sim 55$  kD presumivelmente representou alguma pro-UK que se dissociou do complexo com HSA durante as preparações da amostra em SDS.

5 Estudos da pro-UK intrínseca ao plasma

Para determinar se a pro-UK intrínseca ao plasma poderia estar num complexo com HSA, aproximadamente 600 mg de HSA foi purificada de plasma fresco por cromatografia CBS com extensiva lavagem da coluna com 0,5 M NaCl. Esta  
10 preparação foi tratada com o anticorpo absorvente anti-UK Staphylococcal proteína A anteriormente mostrado (Fig. 12, faixas 6-9) reconhecer a pro-UK no complexo. O imunoprecipitado foi fervido em amortecedor de amostra SDS em ordem a dissociar o complexo anticorpo antigene. Estas condições também a  
15 causam a dissociação do complexo pro-UK:HSA. Subsequente zimografia revelou uma banda de dissolução de  $\sim 55$  kD indicando a presença de pro-UK no preparado de HSA (Fig. 18, faixa 3). Visto ter sido mostrado que a pro-UK livre não pode ser co-purificada por meio da cromatografia de afinidade CBS, as  
20 descobertas sugerem que a pro-UK isolada do plasma na coluna CBS esteve num complexo com HSA. Portanto, as descobertas no plasma normal condizem com aquelas observadas quando plasma enriquecido com pro-UK foi incubado durante  $\sim 6$  h. A possibilidade de que a UK isolada por cromatografia de afinidade  
25 CBS era um complexo UK: inibidor, em vez de um complexo pro-UK: HSA, foi considerada improvável visto que a UK forma conjugados inibidores que são estáveis em SDS a 100°C (Kruihof, Blood, 64 : 907-913 (1984); Cieplak e outros, Thrombos Haemostas., 53 : 36-44 (1985); Stump e outros, J.Biol.Chem., 261: 12834-12841 (1986), e que por conseguinte migram em SDS-PAGE para  $\sim 95$  kD.  
30

Em ordem a investigar a proporção de pro-UK intrínseca ao plasma que está presente como complexo, 20 ml  
35 de plasma fresco (contendo 20 KIU/ml de aprotinina) foram su-



12. APR. 1990

1 bmetidos a cromatografia numa coluna Sephadex G-75. Isto se-  
parou as proteínas do plasma em dois picos principais (Fig.  
19A). As posições da pro-UK livre e do complexo de pro-UK:  
HSA foram determinadas calibrando a coluna com amostras de  
5 plasma enriquecidas com pro-UK imediatamente antes da filtra-  
ção gel e com amostras de plasma pré-incubadas (37°C durante  
20 h) com pro-UK (5 µg/ml) de maneira a formar o complexo. A  
actividade fibrinolítica nas fracções recolhidas foi testada  
em placas de fibrina. A pro-UK livre foi encontrada nas frac-  
10 ções 112-119 correspondentes ao conjunto D, e o complexo pro-  
-UK:HSA foi encontrado nas fracções 95-100 correspondentes  
ao conjunto B (Fig. 19A).

15 Depois disto, o plasma normal foi analisado  
nesta coluna por filtração gel. A actividade fibrinolítica  
intrínseca ao plasma foi testado por imunoprecipitação e zi-  
mografia. As fracções foram reunidas em 4 lotes como mostra-  
do na Fig. 19A. Como mostrado na Fig. 19B, a actividade fi-  
brinolítica foi detectável predominantemente no conjunto B  
20 que corresponde às fracções de alto peso molecular nas quais  
se verificou o complexo de pro-UK ter sido eluído (Fig. 19A).  
Uma pequena actividade de UK foi encontrada a um ainda mais  
alto MW (conjunto A) (Fig. 19B). Complexos pro-UK:HSA de  
mais alto peso molecular formaram-se também em algumas das  
25 experiências nas quais a pro-UK foi incubada com HSA purifi-  
cada (ver Fig. 10), presumivelmente representando complexos  
com mais de uma molécula de HSA ou pro-UK. Não foi encontra-  
da actividade de UK no conjunto de fracções D correspondendo  
ao MW da pro-UK livre. Portanto, toda a detectável activida-  
30 de da UK no plasma foi verificado estar presente na forma de  
um complexo. Visto que o complexo se dissociou em SDS duran-  
te a preparação da amostra como é mostrado pela banda de ~  
55 kD no zimograma (Fig. 19B), o complexo observado é incon-  
sistente com um complexo UK:inibidor. As descobertas por con-  
35 sequinte sugerem que a maior parte da pro-UK intrínseca ao

12. ABR. 1990



1 plasma normal está num complexo correspondente ao que se forma com HSA.

5 A Longa semi-vida do complexo  
na circulação

Postula-se que o sítio da molécula de pro-UK que é identificado pelo receptor de UK no fígado é mascarado no complexo da invenção, tendo como resultado que a pro-UK ligada é provida com uma longa (várias horas a vários dias) semi-vida, em contraste com os 5-8 minutos de semi-vida da pro-UK livre. Visto que as propriedades fibrinolíticas da pro-UK não são comprometidos, espera-se que o complexo pro-UK:albumina fique bem colocado na terapêutica trombolítica. A invenção poderá reduzir substancialmente a dosagem de pro-UK requerida, e facilitar a sua administração pela eliminação da necessidade da sua constante infusão.

Utilização

O complexo pro-UK:albumina da invenção pode ser usado terapêuticamente para as mesmas indicações que outros activadores plasmenogénios por exemplo, t-PA, UK, e pro-UK. O propósito é dissolver coágulos de sangue intravasculares (trombos). Indicações clínicas correntes incluem o enfarte do miocárdio, a trombose venosa profunda, e a embolia pulmonar. O complexo da invenção é misturado com uma substância transportadora biologicamente adequada, por exemplo, salina e administrado intravenosamente por injeção de dose unitária. O complexo também pode ser vantajosamente misturado com t-PA, com o qual a pro-UK é sinérgica. Esta mistura pode também ser dada como uma simples injeção de dose unitária o que simplifica o tratamento e permite que o mesmo seja feito no domicílio. O t-PA iniciará a dissolução e será rapidamente eliminado enquanto que a pro-UK da acção prolongada completará o processo de dissolução.

Mod. 71-10000 ex. - 89/07

12. ABR 1990

1                   Adicionalmente, o complexo da invenção pode  
ser administrado com o propósito de elevar a actividade fi-  
brinolítica intrínseca do sangue e desta maneira ser usado  
na prevenção de longa duração de doença cardiovascular que é  
5 sabido estar associada a uma actividade fibrinolética dimi-  
nuída. Visto que há muito tempo se acredita ser a trombose  
parte da patogénese da arteriosclerose, injeções regulares  
do complexo da invenção a intervalos semanais ou mensais po-  
dem ser administradas para também prevenir a arteriosclero-  
10 se.

Finalmente, a forma enzimaticamente activa  
do complexo, entre a HMW-UK e a albumina, pode ter também  
certas aplicações clínicas. Visto que a HMW-UK é a forma en-  
15 zimática da pro-UK, ela reage com vários inibidores do plas-  
ma. Como resultado, este complexo não terá uma longa semi-  
-vida até estes inibidores terem sido consumidos. Depois dis-  
so, o complexo terá a vantagem sobre a HMW ou LMW-UK duma  
semi-vida mais longa o que reduzirá o custo e facilita a ad-  
20 ministração.

#### Exemplos de regimes terapêuticos

##### Exemplo 1

25                   Para um tratamento de emergência de trombos  
por injeção de dose unitária, cerca de 5-20 mg de complexo  
liofilizado de pro-UK: albumina é misturado com salina e co-  
locado na câmara de uma seringa, a qual é usada para injectar  
o bolus no paciente intravenosamente.

##### Exemplo 2

30                   Para a dissolução rápida dos trombos das  
coronárias, cerca de 5-20 mg do complexo liofilizado pro-UK:  
albumina dissolvido em salina é administrado por via intrave-  
nosa juntamente com 2 mg de UK. A última serve para acelerar  
35 o início da dissolução. A longa semi-vida do complexo servirá

12 ABR 1994

1 para prevenir a repetição da trombose assim como para comple-  
tar a dissolução dos trombos existentes.

### Exemplo 3

5 Para o tratamento de trombos em veias pro-  
fundas e êmbolos nos pulmões, cerca de 5-20 mg de complexo  
liofilizado de pro-UK:albumina dissolvido em salina é admi-  
nistrado por via intravenosa. Se necessário as injeções po-  
dem ser repetidas. A estas doses nenhuma activação plasmeno-  
10 génia não específica deverá ocorrer.

### Exemplo 4

15 Para o tratamento de trombos por injeção  
bolus das combinações sinérgicas de t-PA e complexo liofiliz-  
ado pro-UK:albumina, cerca de 5-20 mg de t-PA é misturado  
com 5-20 mg de complexo pro-UK:albumina, e administrado como  
uma simples injeção bolus. O t-PA será eliminado rápidamen-  
te mas o complexo permanecerá na circulação para completar a  
dissolução dos trombos e evitar a repetição da trombose sem  
20 comprometer a especificidade.

### Exemplo 5

25 Alternativamente, para a rápida dissolução  
dos trombos das coronárias, cerca de 5-20 mg do complexo lio-  
filizado pro-UK:albumina é injectado juntamente com uma in-  
fusão de 30 mg/hr de t-PA liofilizado dissolvido em salina.

### Exemplo 6

30 A excepcionalmente longa semi-vida do com-  
plexo pro-UK;albumina pode torná-lo útil para a prevenção de  
trombose. Esta aplicação utilizará pequenas doses, isto é,  
cerca de 1-5 mg por semana

### Exemplo 7

35 O activo complexo HMW-UK:albumina pode ser

12 ABR. 1990

1 usado como uma substituição mais económica para a HMW ou LMW-UK.

Exemplo 8

5 Para o tratamento de trombos em veias profundas, cerca de 5-20 mg do complexo liofilizado pro-UK:HSA é dissolvido em salina e administrado sózinho ou em combinação com t-PA.

10 Exemplo 9

Para o tratamento de angina instável ou ameaça de enfarte do miocárdio, uma dose do complexo pro-UK:HSA (5-10mg) é injectado por via intravenosa. Para esta indicação, um activador plasmenogénio é particularmente útil visto esta condição clínica tender a prolongar-se por vários dias.

Exemplo 10

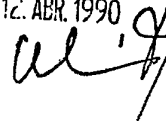
20 Para a prevenção de repetição de trombose, no seguimento de angioplastia transluminal percutânea ou no seguimento de terapia trombolítica aguda com outro activador plasmenogénio, uma relativamente pequena dose do complexo pro-UK:HSA da invenção será suficiente, isto é, menos do que 10 mg.

25 Exemplo 11

Para a prevenção de doença cardiovascular a qual está muitas vezes associada com uma actividade fibrinolítica diminuída, podem ser dadas injeções periódicas do complexo para aumentar a actividade fibrinolítica. Por exemplo, podem ser dadas injeções mensais de cerca de 1-5 mg de pro-UK em complexo com HSA.

35

12. ABR. 1990



- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1ª.- Método para produzir um complexo activador plasminogénico purificado, caracterizado por o referido complexo compreender pro-uroquinase pura, covalentemente ligada a albumina do soro humano por meio de uma ligação de dissulfureto entre um átomo de enxofre num radical aminoácido da dita pro-uroquinase e um átomo de enxofre num radical aminoácido da dita albumina do soro humano.

2ª.- Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por no referido complexo activador a referida ligação de dissulfureto estar entre um radical cisteína da dita albumina do soro humano e um radical cistina da dita pro-uroquinase.

3ª.- Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por no referido complexo activador o dito radical cistina da dita pro-uroquinase se encontrar na extremidade do grupo amino terminal da pro-uroquinase na cadeia A.

4ª.- Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por no referido complexo activador a formação da dita ligação de dissulfureto ter lugar na presença de uma proteína isomerase de dissulfureto.

5ª.- Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido complexo activador ter a mesma estrutura molecular que o complexo da pro-uroquinase e albumina do soro humano que existe no sangue dos seres humanos saudáveis.

6ª.- Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por no referido complexo activador a referida ligação de dissulfureto se encontrar entre o mesmo radical

12. APR. 1990

1 cisteína da albumina do soro humano e o mesmo radical cisti-  
na da pro-uroquinase, como no complexo de pro-uroquinase e  
HSA que existe no sangue dos seres humanos saudáveis.

5 7a.- Método de acordo com a reivindicação  
1 ou 6, caracterizado por no referido complexo activador a  
dita pro-uroquinase ser pro-uroquinase produzida recombinada-  
mente.

10 8a.- Método de acordo com a reivindicação  
1, caracterizado por no referido complexo activador a dita  
pro-uroquinase e a dita albumina do soro humano serem produ-  
zidas recombinadamente.

15 9a.- Método de acordo com a reivindicação  
1, caracterizado por no referido complexo activador a refe-  
rida pro-uroquinase ser um fragmento fibrinoliticamente acti-  
vo de pro-uroquinase tendo um resíduo cisteína na extremida-  
de do seu grupo amino terminal em cada uma das posições do  
20 aminoácido 11, 31, 33, 39, 51, 53 ou 63 da cadeia péptida da  
pro-uroquinase.

25 10a.- Método de acordo com a reivindicação  
1, caracterizado por no referido complexo activador a refe-  
rida pro-uroquinase ser uma forma fermentativa de uroquinase  
fibrinoliticamente activa contendo uma cadeia de aminoácido  
idêntica aos radicais de aminoácido 1 a 45 de uroquinase.

30 11a.- Método de acordo com a reivindicação  
1, caracterizado por o referido complexo activador trombolé-  
tico compreendera incubação de albumina do soro humano pura  
de de pro-uroquinase pura sob condições e por um período de  
tempo suficiente para permitir a formação do dito complexo.

35 12a.- Método de acordo com a reivindicação

1 11, caracterizado por compreender, além disso, o prétratamen-  
to da albumina do soro humano com ditiotreitol para restaurar  
a forma tiol da albumina do soro humano.

5 13a.- Método de acordo com a reivindicação  
11 ou 12, caracterizado por compreender, além disso, a adi-  
ção de proteína de dissulfureto isomerase durante a referida  
incubação.

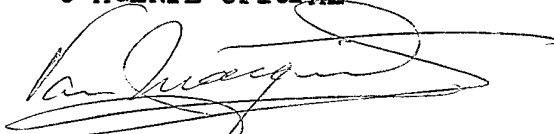
10 14a.- Método de acordo com as reivindicações  
anteriores caracterizado por se obter uma composição tera-  
pêutica trombolética compreendendo o complexo ativador obti-  
do pelo processo da reivindicação 1, combinado com uma subs-  
tância portadora farmacêuticamente aceitável, e por a referi-  
15 da composição sea administrada numa quantidade eficaz a um  
paciente humano.

20 15a.- Método de tratamento ou prevenção de  
doença cardiovascular, tal como a arteriosclerose, num pa-  
ciente humano, caracterizado por compreender a administração  
ao dito paciente de uma quantidade da dita composição tera-  
pêutica obtida de acordo com a reivindicação 14, suficiente  
para elevar o nível de actividade fibrinolítica no dito pa-  
ciente.

25 Lisboa, 12 ABR. 1990

Por VASCULAR LABORATORY, INC.

O AGENTE OFICIAL

30 

VASCO MARQUES LEITE

Agente Oficial

da Propriedade Industrial

Cartorio - Arco da Conceição, 3, 1.º-1100 LISBOA

35



24 JUL 1990

FIG. 1a

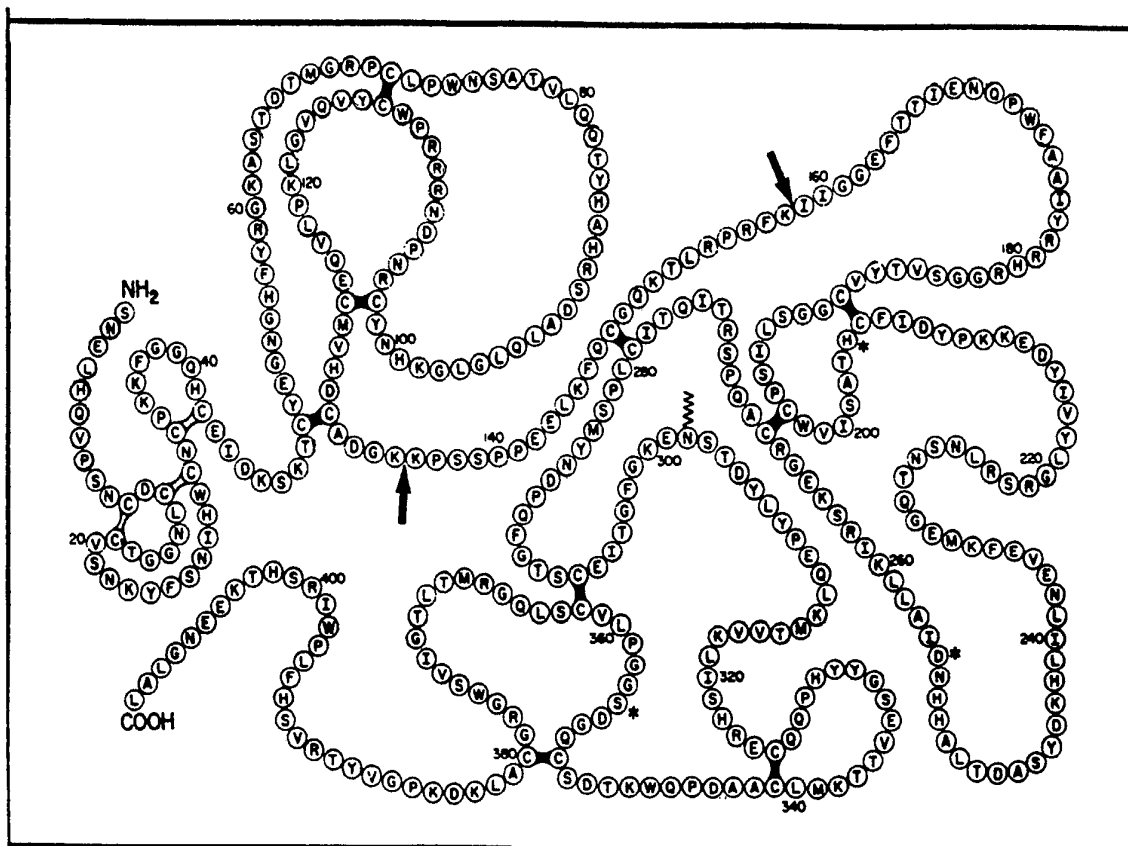
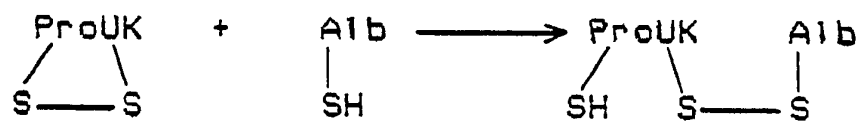


FIG. 1b



Formação do complexo Pro-UK/Albumina

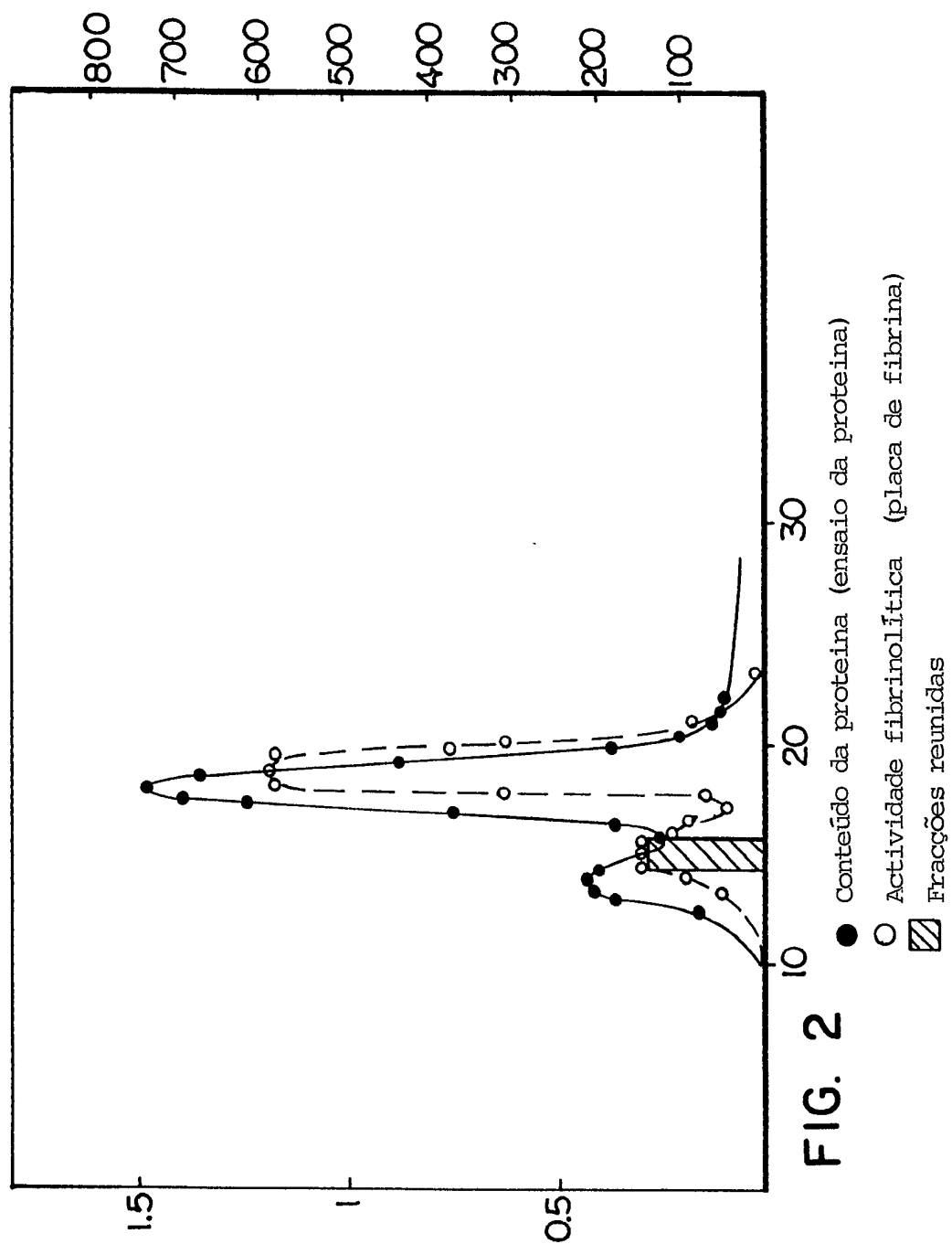


FIG. 2

- Conteúdo da proteína (ensaio da proteína)
- Actividade fibrinolítica (placa de fibrina)
- ▨ Fracções reunidas

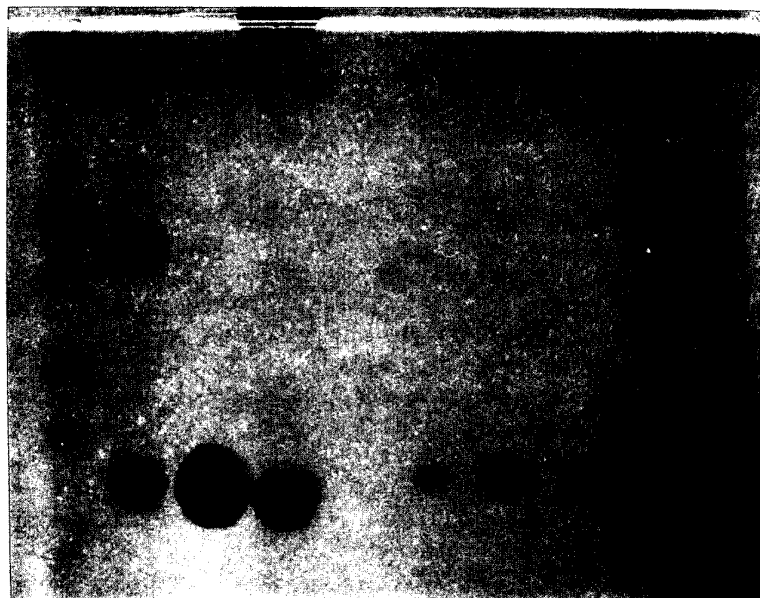
24. JUL. 1990

FIG. 3



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

FIG. 4



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

FIG. 5

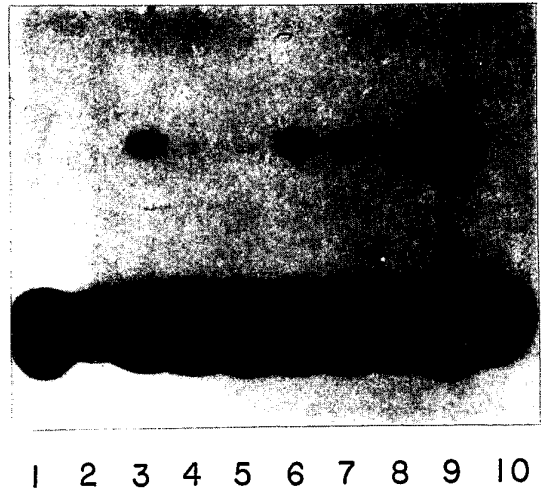


FIG. 6

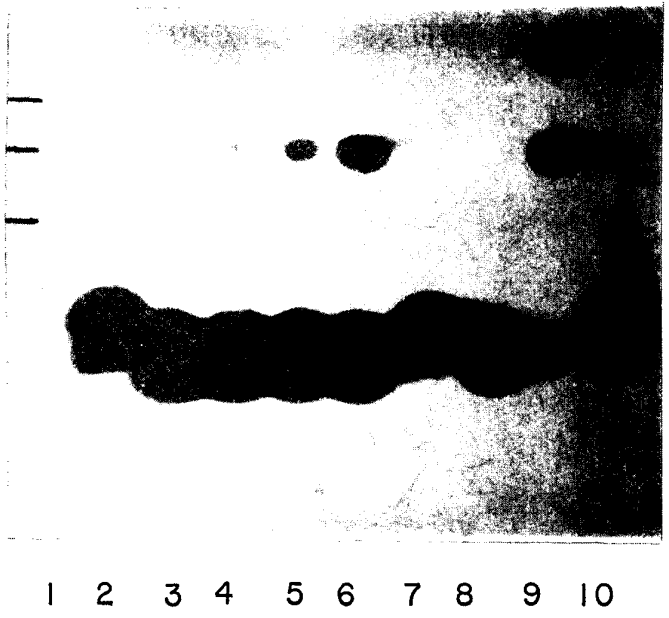


FIG. 7

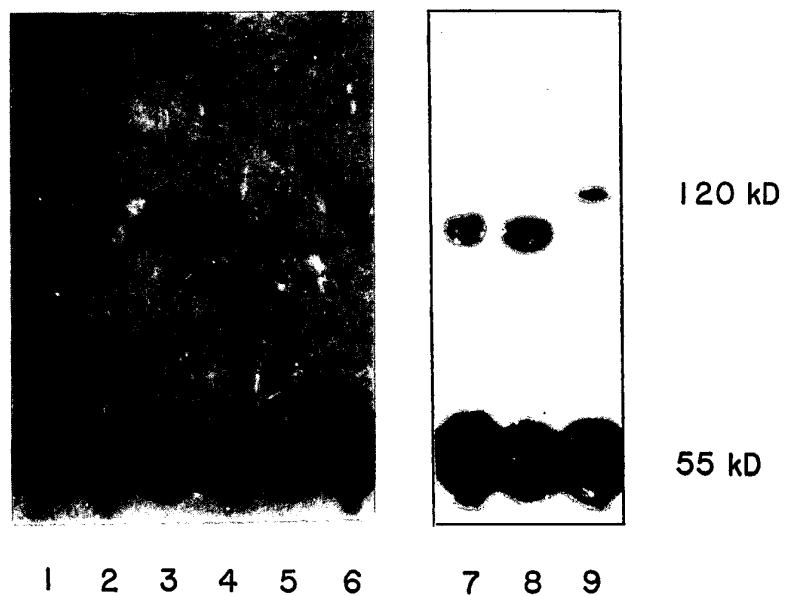
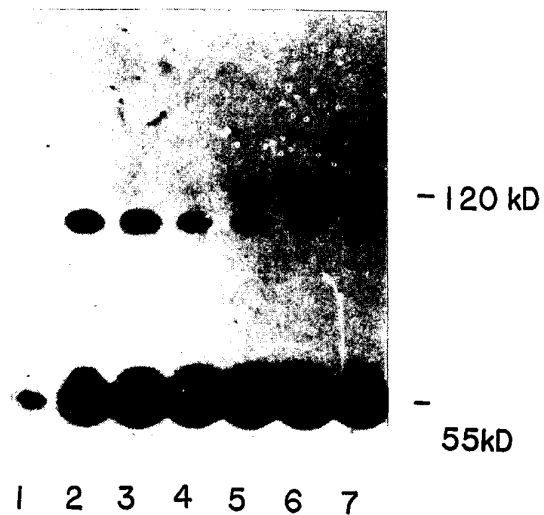


FIG. 8a



FIG. 8b



24 JUL 1990

FIG. 9

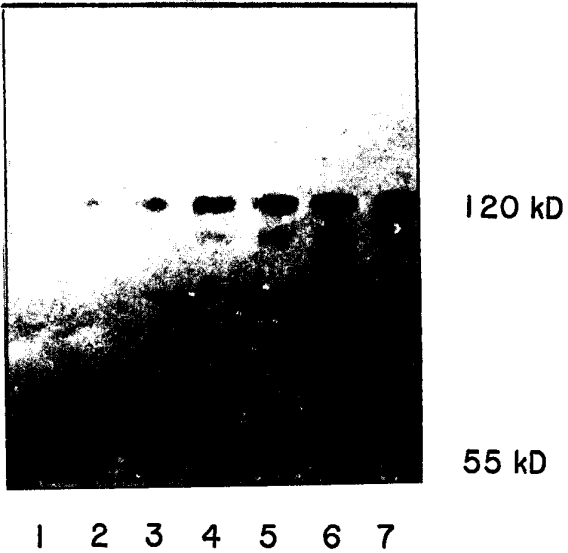
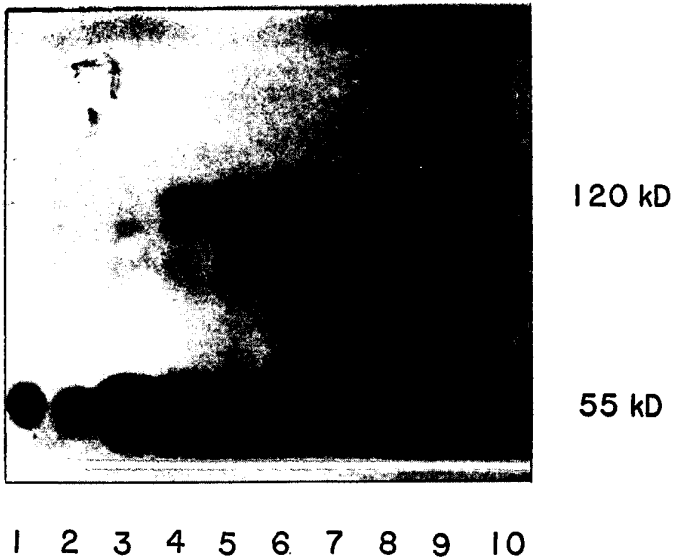
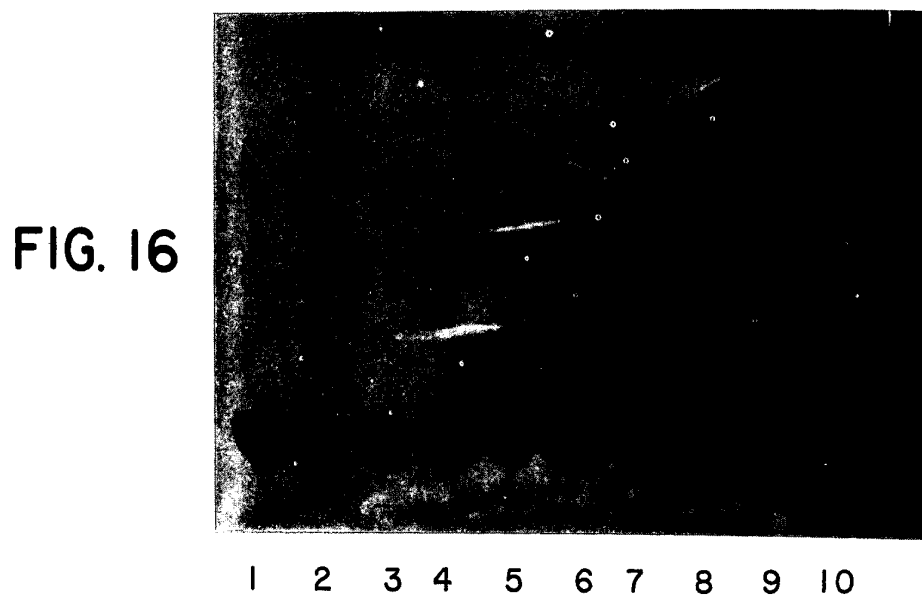
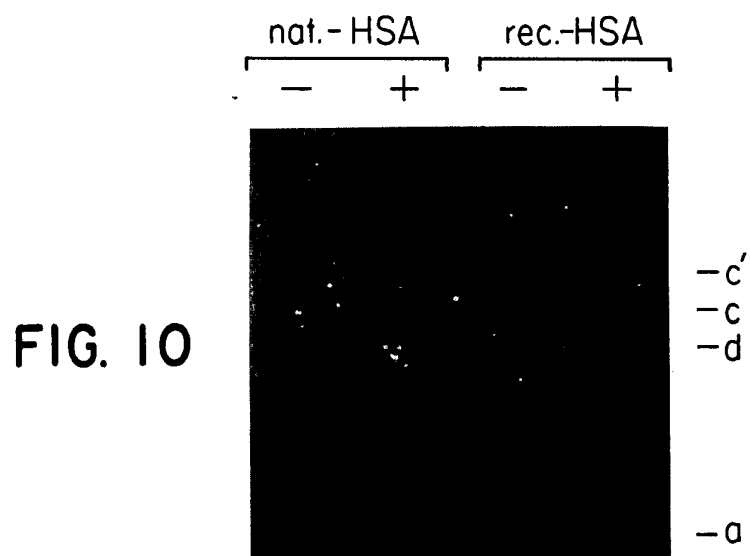


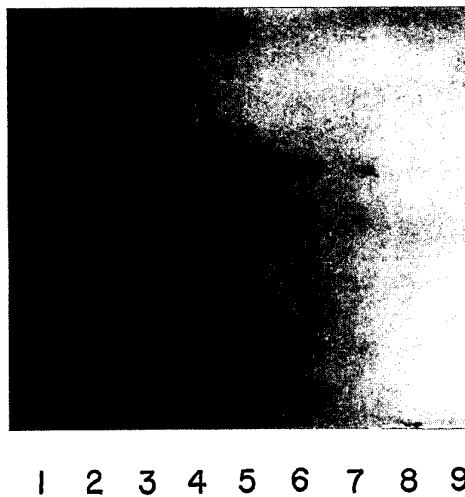
FIG. 11





24. JUL. 1990

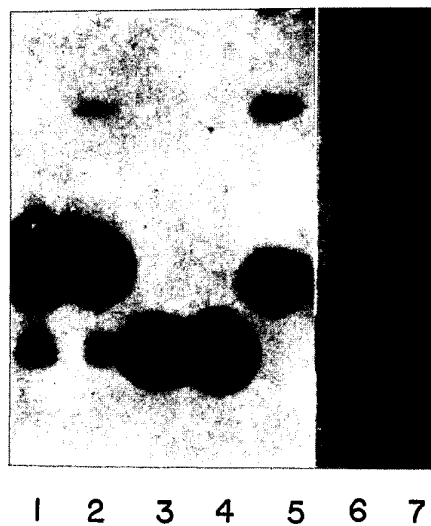
FIG. 12



120 kD

55 kD

FIG. 13



120 kD

55 kD



FIG. 15

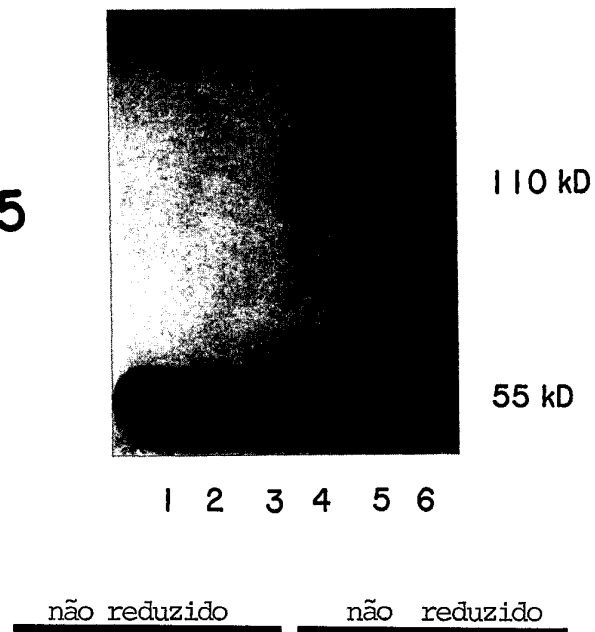


FIG. 14

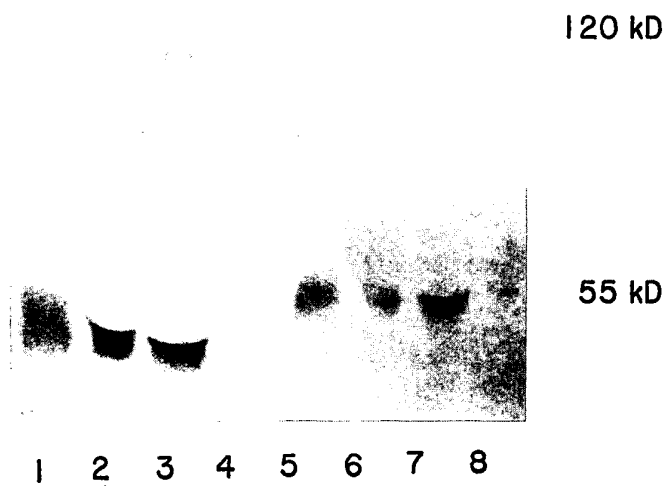


FIG. 17

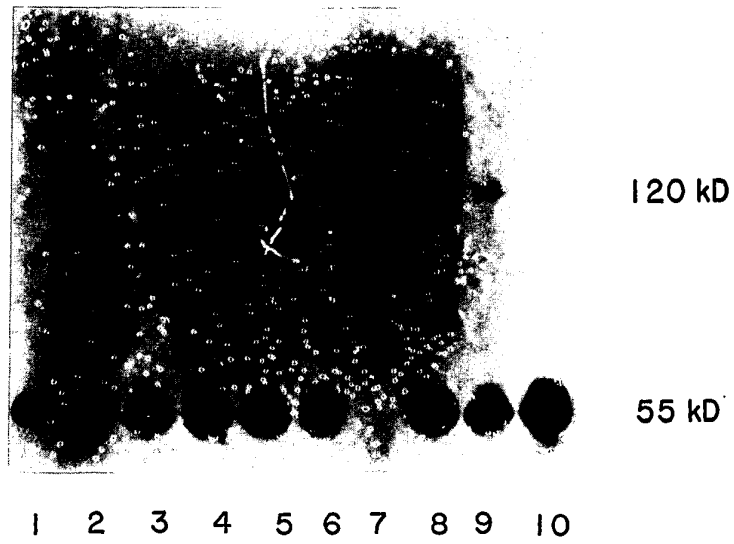


FIG. 18

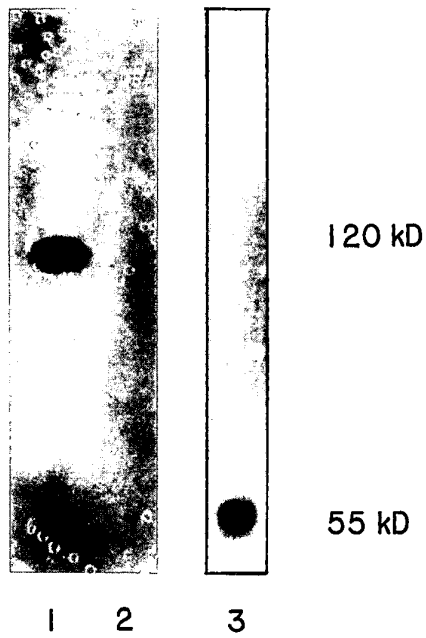


FIG. 19 a

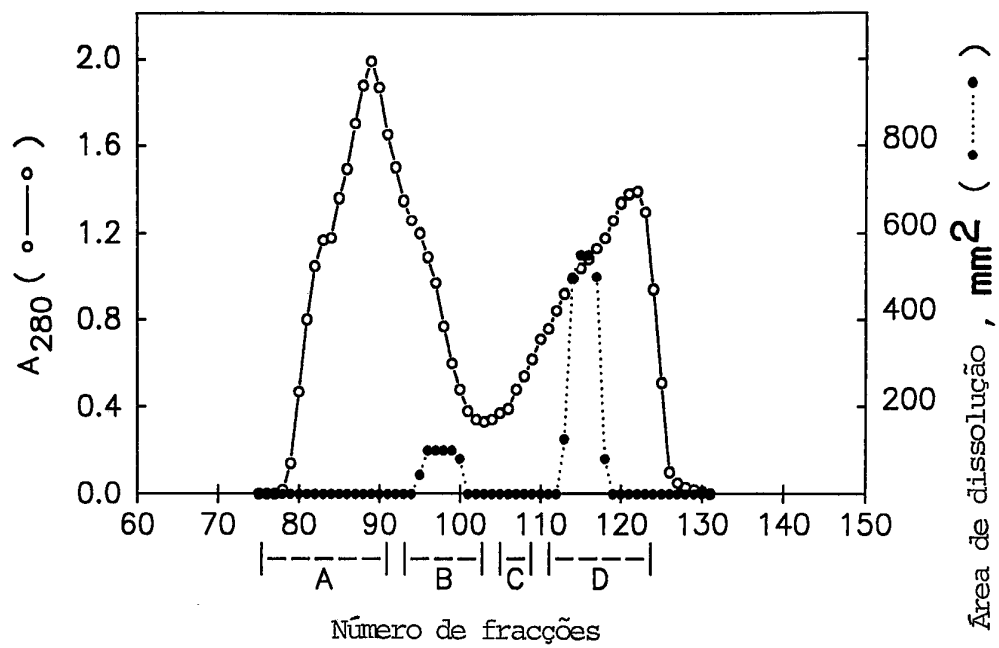


FIG. 19 b

