

MEMÓRIA DESCRIPTIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 93.757 G

NOME: VASCULAR LABORATORY, INC.

EPIGRAFE: MÉTODO PARA PRODUZIR UM COMPLEXO ACTIVADOR PLASMINOGÉNEO 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

ALG

1 - R E S U M O -

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

10 5
15 Descreve-se um método para produzir um comple-
xo de pro-uroquinase consistindo em pro-uroquinase ligada co-
valentemente, 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, *WJ*

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 (jimogénio), 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 seu derivado activo, de grande peso molecular, a UK de dupla cadeia.

20

25

30

35

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 biológicamente activo ou fragmento de pro-UK que contenha um resíduo de cis-

12. ABR. 1990, 9
[Signature]

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
5 HSA efectiva ou de recombinação. No sentido aqui usado, "pu-
ro" significa que o complexo antes de ser usado é substancialmente (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 ainda, o complexo da invenção pode ser usado na prevenção da trombose assim como na prevenção de longa duração das doenças cardiovasculares, tais como a arteriosclerose, que, como é bem conhecido, está associada a uma actividade fibrinoliticamente 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 injecção 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 administrada por contínua infusão intravenosa, o que complica 25 grandemente a terapia, especialmente fora dum hospital.

30 Outras características e vantagens da invenção tornar-se-ão patentes a partir da descrição que se segue das suas realizações preferidas e a partir das reivindicações.

São descritos primeiramente os desenhos
Desenhos

35 A Fig. 1 (a) é um diagrama esquemático da totalidade 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 covalente mente ligada a albumina.

5 A Fig. 2 mostra a cromatografia de filtragem da mistura de incubação pro-UK/HSA (4 h a 37°C). Fracções de 0,5 ml foram colhidas e analisadas para avaliação do conteúdo 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 (faixa 5), e um plasma (faixa 6). As faixas 7 a 10 são de pro-UK incubada com HSA depois de ter passado através de uma coluna α (UK)-Sephadex.

15 A Fig. 4 é um zimograma do complexo purificado (faixas 2,3), do complexo purificado incubado com α (HSA) durante 1 hora (faixa 4), e do complexo purificado passado 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 standard envolvendo a incubação em amortecedor SDS a 37°C durante 30 minutos.

20 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^{++} (6), CA^{++} (7), Zn^{++} , CA^{++} (8) e com uma razão pro-UK/HSA dez vezes mais alta (9).

25 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 amortecedor (faixa 7), em plasma durante 0 h (faixa 8) e 6 h (faixa 9) e em urina concentrada (faixa 10).

12. ABR 1990

1 A Fig. 7 é um zimograma de DFP e HSA com tra-
tamento de clorammina 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 amortece-
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 clorammina T (faixa 6), pro-UK em amortecedor mostran-
10 do a presença de um dímero (faixa 7), pro-UK+BSA mostrando
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 ($0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) incubada com mercaptalbumina ($40 \text{ mg}/\text{ml}$) 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 ($920 \mu\text{g}/\text{ml}$) na Fig. 8B.

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

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

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

12 ABR. 1990
Al

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
8), 4 h (faixa 9) e 6 h (faixa 10).

10 A Fig. 12 são zimogramas das seguintes amos-
tras: pro-UK ($0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) incubada (37°C) em amortecedor (faixa 1), e com CBS-HSA ($40 \text{ mg}/\text{ml}$) (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 Sephadex 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 ($0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) pré-incubada
(6 h) com mercaptalbumina ($40 \text{ mg}/\text{ml}$); HMW-UK em amortecedor
(faixa 1), HMW-UK+HSA (faixa 2), LMW-UK em amortecedor (faixa 3), LMW-UK+HSA (faixa 4), rec.-pro-UK+HSA (faixa 5), mutan-
de de substituição da pro-UK em amortecedor (faixa 6), mutan-
te de substituição da pro-UK+HSA (faixa 7).

20 A Fig. 14 são manchas de imunidade acidentais
(Western immunoblots) usando UK:Ab, pro-UK ($0,3 \mu\text{g}/\text{ml}$) incu-
bada (37°C) 7 h em amortecedor (faixa 1), pro-UK incubada
com BSA não tratada ($40 \text{ g}/\text{ml}$) (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).

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

12 APR 1990

1 (faixa 6).

5 A Fig. 16 é um zimograma de pro-UK incubada em amortecedor (faixa 1) com 10^{-3} M (2), 3×10^{-3} M (3), 6×10^{-3} M (4), 10^{-2} M de DTNB (5), e incubada em plasma (6) com 10^{-3} M (7), 3×10^{-3} M (8), 6×10^{-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 só-
15 mente pro-UK em amortecedor (faixa 1), com pro-UK ($5 \mu\text{g/ml}$) incubada (37°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),
20 sob pH 8,0 (faixa 5), sob pH 8,5 (faixa 6), e com indicado-
res de MW como standard (faixa 7), com pro-UK ($5 \mu\text{g/ml}$),
25 incubada (37°C) durante 24 h com HSA de concentração 80 mg/
ml (faixa 8), 20 mg/ml (faixa 9) e 10 mg/ml (faixa 10). Fai-
xas 8-10 incubadas sob pH 8,0.

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

30 A Fig. 19A é um gráfico de dois conjuntos de dados. O número fracionário das fracções obtidas pela filtra-
ção gel do plasma numa coluna calibrada G-75 é marcado no eixo dos X para ambos os conjuntos de dados, e a absorção a
280 nm é marcada no eixo dos Y com círculos brancos enquanto que a área de dissolução 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 imunoprecipita-
dos de UK obtidos do conjunto das fracções identificadas como

12 APR 1990

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 ditiotreitol (DTT) em ordem a restaurar a forma tiol; 4) A formação do complexo é catalizada por proteína dissulfureto-isomerase (PDI), e 5) a formação do complexo é inibida por DTNB e glutationa 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 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 NH₂-terminal da extremidade da pro-UK.

25 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 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 30 ligações estruturais dissulfuradas na HSA.

Metodologias

Sumário da metodologia

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

12 APR. 1990
Alvarenga

1 ficadas individualmente e em seguida combinadas por meio dum
5 a ligação dissulfurada (ver Fig. 1A e 1B).

10 No primeiro método, a albumina é tratada com
5 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 dialise an-
tes da união do pro-UK e da albumina na presença de PDI.

15 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 dumha 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 μ M 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 se-
25 gundo método também descrito a seguir, preparação de pro-UK
foram passadas através dumha 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 pa-
ra evitar traços de contaminantes de UK.

Purificação da Albumina

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

12 ABR. 1990

W.G

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 absorbância 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

10 Plasma livre de plasmenogénio foi preparado
por separação em fornada (de uma só vez), a qual foi levada
a cabo excitando 1 ml de Lys-agarose préviamente equilibrada
em 0,005 M HEPES e 0,15 M NaCl (pH 7,4) com 5 ml de plasma
durante 2 h a 4°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)

20 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%.

25 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
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-
5 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.

10 Na obtenção de dados usando o primeiro méto-
do das manchas de imunidade foi executado depois duma incu-
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-
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 α (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 ($0,15 \text{ mg/ml}$) e
cloreto p-nitro azul tetrazólio ($0,3 \text{ mg/ml}$) em amortecedor
de carbonato (0,1 M de carbonato de sódio, 1 mM de 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-
na) por meio de tratamento com 10 mM de ditiotreitol (DTT)
10 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 μ g/ml) na presença de PDI (920 μ g/ml) ou com BSA a
37°C durante pelo menos 4 h em 0,1 M de amortecedor HEPES
(pH 8,0). Subsequentemente, 200 μ l 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 \sim 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 \sim
120 kDa. Foram reunidas três fracções correspondendo a \sim 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 ABR 1990

1 O complexo pro-UK:HSA foi preparado incubando 5 μ 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 μ l da mistura a uma coluna Sephadex G-75 equilibrada e
5 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).

10 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 15 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 (HSA)-Sephadose. Estas verificações corroboram a composição do complexo.

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

30 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
W.H

1 mação do complexo.

5 Um pH de cerca de 8,0 é preferido para a formaçāo do complexo, como é mostrado na Fig. 5. A formaçāo 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 Ca^{++} (5 mM) (Fig. 5, faixa 7) ou de Zn^{++} (50 M) (faixa 6) e de $\text{Ca}^{++} + \text{Zn}^{++}$ (faixa 8) não teve efeito, mas Cu^{++} (5-10 M) inibiu a formaçāo do complexo.

10 Dados Experimentais

Formação expontânea no plasma, do complexo pro-UK:Albumina

15 Foi verificado que o complexo pro-UK:HSA se forma expontâneamente 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 existe 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 amortecedor e incubadas em plasma durante 0 (faixas 3,8), 1(4), 2(5), ou 6 horas (6,9). A geraçāo 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 \sim 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 formaçāo de dímeros de pro-UK não se verificou como

Al'g

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 \sim 65k dalton para formar um composto de \sim 120 k dalton.

10 Um complexo de MW similar feito de UK de
 duas cadeias e dum inibidor de UK, PAI-3 tinha sido anterior-
 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
 15 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
 usadas nas experiências. Finalmente, a formação do complexo
 não foi impedida pela adição de um inibidor à UK (GluGlyArg
 20 clorometil cetona), um inibidor ao plasmenogénio (aprotinina
 25 20 KIU/ml) ou tornando o plasma livre de plasmenogénio.
 Além disso, a activação da pro-UK durante a incubação e for-
 mação dum complexo UK:PAI 1 (activador plasmenogénio inibido
 -1) não condiz com as descobertas visto que o último migra
 30 para \sim 95kD e simultaneamente é acompanhado por outros com-
 plexos inibidores para \sim 125 kD e \sim 155 kD (Kruithof, E.K.O.
 e outros; Blood, 64 : 907-913 (1984)), assim como por um
 quarto complexo para o cimo do gel o qual reage como α_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
 35 juntada ao plasma desprovido de plasmenogénio. Estes proce-
 dimentos não inibiram a formação do complexo de \sim 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, *W.G.*

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 μ g/ml) foi incubada (37°C) durante pelo menos 4 h com CBS-HSA purificada de fresco (40 mg/ml em 0,1 M HEPES, pH 7,4), e a mistura examinada por meio de SDS-PAGE e de zimografia, formou-se com consistência uma banda de \sim 120 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 complexo (Fig. 2, faixa 4) sobre uma coluna Sepharose UK-Ab removeu o complexo (Fig. 2, faixas 6-9).

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

25 Sensibilidade do complexo à dissolução em SDS

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°C foi vista sómente uma dissolução parcial (< 50%) nos zimogramas do gel (não são mostrados os dados).

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

12 ABR 1990
W.S.

1 A possibilidade do complexo ter sido de fa-
cto composto por UK e um inibidor purificado juntamente com
5 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 ~
10 120 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 com-
plexo (Fig. 13, faixas 3 e 4). Além disso, não se formou ne-
nhum complexo quando um mutante de substituição da pro-UK
15 (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:ini-
bid, a CBS-HSA foi préviamente tratada com DFP em ordem a
evitar quaisquer contaminantes de urina protease. Este trata-
mento falhou na inibição da formação do complexo com pro-UK
(Fig. 7, faixa 4, comparada com as faixas 2 e 3). Segundo,
25 para excluir um contaminante de serpina, a preparação de HSA
foi tratada com clorammina 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
30 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. S

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 incubada em amortecedor (Fig. 14, faixa 1) ou com BSA não prévia-
5 mente tratada com DTT (Fig. 5, faixa 2). O controle de CBS-
-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 glutationa oxidada ou DTNB foi adicionado à mistura rea-
gente do método 2, como segue. Glutationa 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 eucubada em amortecedor. Um decrescimento na formação do complexo pro-UK:HSA ocorreu com a glutationa, o qual era dependente da sua concentração.
20 As faixas 2 e 5 são com 0,5 mM de glutationa adicionada e as faixas 3 e 6 com 5,0 mM de glutationa adicionada.

25 A glutationa não inibiu a actividade fibrinolítica da pro-UK, como é mostrado nas três primeiras fai-
xas. Esta resposta à glutationa 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 Fig. 16 é um zimograma de pro-UK incubada em amortecedor (faixas 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

W.H.

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
5 de complexo com CBS-HSA preparadas de fresco, decresce com o
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
10 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-
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 cisteína
20 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
cisteína disponíveis no preparado de HSA e a formação do
complexo com pro-UK.

25 Quarto, quando PDI, que cataliza a permuta
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
30 acelerada. Sem PDI, 4 h de incubação eram requeridos antes
que os complexos fossem observados (Fig. 8A), mas na presença
de PDI (920 μ g/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 μ g/
ml) foi incubada durante 6 h com uma preparação de mercaptal-
35 bumina (40 mg/ml) com 0, 23, 230, 460, 680 ou 920 g/ml de
PDI. Na presença de PDI, a formação de dímeros de pro-UK era

12 ABR 1987
WJ

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
10
15 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 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)).

20
25
30 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 outro 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.

Efeito do pH e da concentração da HSA

35 Quando a incubação foi processada sob um pH entre 6 e 8,5, verificou-se que o pH óptimo 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

12. ABR. 1990
Alf

1 limitativo predominante da formação do complexo era a concentração 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 μ g/ml). A elevação da concentração da pro-UK não aumentou a formação do complexo. Além disso, a formação de complexo mesmo com este excesso de HSA tendia para um patamar ao fim de cerca de 24 h.

O efeito de ulterior purificação da HSA

10 As descobertas anteriores sugeriram a possibilidade de que o complexo de pro-UK estivesse com um contaminante 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 pela passagem sobre Sepharose concanavalina-A não alteraram a reactividade das preparações com a pro-UK. Portanto, se o contaminante responsável foi uma proteína menor, é pouco provável que tenha sido uma não-glicoproteína. Com poucas exceções (HSA, transtiretina, proteína de ligação retinol), as proteínas do plasma são todos 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 purificada 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 \sim 120kD. Contudo, embora se tenha verificado que o complexo foi reconhecido pela HSA-Ab 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 monoclonal, sendo mascarado pelo complexo. Apesar de tudo, esta constatação negativa deixou aberta a possibilidade do comple-

17 ABR 1990

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

10 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 μ g/ml). A análise zimográfica das misturas da incubação mostrou um complexo de \sim 120 kD(C), tanto com a rec-HSA como com a HSA natural, cuja formação foi significativamente 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') possivelmente 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 \sim 120 kD (Fig. 10).

15 20 Separação do complexo de pro-UK do plasma por meio de cromatografia de afinidade CBS

25 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 lavagem com 0,5 M de NaCl. Isto foi demonstrado por experiências nas quais pro-UK (5 μ g/ml) foi adicionada ao plasma imediatamente antes da cromatografia de afinidade CBS. Sob estas condições, a eluição HSA não teve actividade fibrinolítica detectável num zimograma (Fig. 18, faixa 2). A pro-UK livre é gradualmente lavada com 0,5 M NaCl, Por contraste, quando o plasma foi pré-incubado (37°C) com pro-UK (5 μ g/ml) durante 20 h, em ordem a permitir a formação do complexo, um zimograma da HSA purificada com CBS teve actividade fibrinolítica associada com ele. Isto foi mostrado por zimografia da HSA que mostrou bandas migrando para \sim 120 kD e para \sim 55 kD (Fig. 18, faixa 1). Visto ter sido mostrado a pro-UK livre

12. ABR. 1990

Alf

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 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 imunoprecipitada foi fervido em amortecedor de amostra SDS em ordem a dissociar o complexo anticorpo antigene. Estas condições também a 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 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 \geq 6 h. A possibilidade de que a UK isolada por cromatografia de afinidade 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 (Kruijthof, 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 \geq 95 kD.

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

12 ABR 1990, *WJ*

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:
5 HSA foram determinadas calibrando a coluna com amostras de
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 μ g/ml) de maneira a formar o complexo. A
actividade fibrinolítica nas fracções recolhidas foi testada
10 em placas de fibrina. A pro-UK livre foi encontrada nas frac-
ções 112-119 correspondentes ao conjunto D, e o complexo pro-
-UK:HSA foi encontrado nas fracções 95-100 correspondentes
15 ao conjunto B (Fig. 19A).

Depois disto, o plasma normal foi analisado
15 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
30 ao MW da pro-UK livre. Portanto, toda a detectável activida-
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 ~
35 55 kD no zimograma (Fig. 19B), o complexo observado é incon-
sistente com um complexo UK:inibidor. As descobertas por con-
seguinte sugerem que a maior parte da pro-UK intrínseca ao

12 ABR. 1990

WJ

1 plasma normal está num complexo correspondente ao que se for-
ma com HSA.

5 A Longa semi-vida do complexo
na circulação

10 Postula-se que o sítio da molécula de pro-
-UK que é identificado pelo receptor de UK no fígado é mas-
carado no complexo da invenção, tendo como resultado que a
15 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
20 da pro-UK livre. Visto que as propriedades fibrinolíticas
da pro-UK não são comprometidos, espera-se que o complexo
25 pro-UK:albumina fique bem colocado na terapêutica trombolíti-
ca. A invenção poderá reduzir substancialmente a dosagem de
30 pro-UK requerida, e facilitar a sua administração pela eli-
minação da necessidade da sua constante infusão.

35 Utilização

20 O complexo pro-UK:albumina da invenção pode
ser usado terapêuticamente para as mesmas indicações que ou-
25 tros activadores plasmenogénios por exemplo, t-PA, UK, e
pro-UK. O propósito é dissolver coágulos de sangue intravas-
30 culares (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 substân-
cia transportadora biológicamente adequada, por exemplo, sa-
lina e administrado intravenosamente por injeção de dose u-
nitária. O complexo também pode ser vantajosamente misturado
35 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 completa-
rá o processo de dissolução.

12 ABR 1990
WJ

1 Adicionalmente, o complexo da invenção pode
5 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
sabido estar associada a uma actividade fibrinolética di-
minuída. Visto que há muito tempo se acredita ser a trombose
10 parte da patogénese da arteriosclerose, injecções regulares
do complexo da invenção a intervalos semanais ou mensais po-
dem ser administradas para também prevenir a arteriosclero-
se.

15 Finalmente, a forma enzimáticamente 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-
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
20 semi-vida mais longa o que reduzirá o custo e facilita a ad-
ministração.

Exemplos de regimes terapêuticos

Exemplo 1

25 Para um tratamento de emergência de trombos
por injecção de dose unitária, cerca de 5-20 mg de complexo
lioofilizado 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

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
lioofilizado de pro-UK:albumina dissolvido em salina é admi-
nistrado por via intravenosa. Se necessário as injecções po-
dem ser repetidas. A estas doses nenhuma activação plasmeno-
10 géria não específica deverá ocorrer.

Exemplo 4

15 Para o tratamento de trombos por injecção
bolus das combinações sinérgicas de t-PA e complexo liofili-
zado 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 injecção bolus. O t-PA será eliminado rapidamen-
te mas o complexo permanecerá na circulação para completar a
20 dissolução dos trombos e evitar a repetição da trombose sem
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 APR. 1990

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

Exemplo 8

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

10 Exemplo 9

15 Para o tratamento de angina instável ou a-
meaça de enfarte do miocárdio, uma dose do complexo pro-UK:
HSA (5-10mg) é injectado por via intravenosa. Para esta in-
dicação, 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

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

12. ABR. 1990

ALF

1

- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

5

1a.- Método para produzir um complexo activador plasminogéneo 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.

10

15

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

20

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.

25

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.

30

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.

35

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. ABR. 1990
WJ

1 cisteina 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 fibrinolíticamente acti-
vo de pro-uroquinase tendo um resíduo cisteina 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
fibrinolíticamente 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

11, caracterizado por compreender, além disso, o prétratamento 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 adição de proteína de dissulfureto isomerase durante a referida incubação.

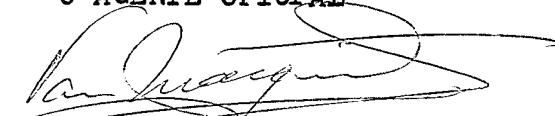
10 14a.- Método de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado por se obter uma composição terapêutica trombolética compreendendo o complexo activador obtido pelo processo da reivindicação 1, combinado com uma substância portadora farmacêuticamente aceitável, e por a referida composição sea administrada numa quantidade eficaz a um paciente humano.

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

25 Lisboa, 12 ABR. 1990

Por VASCULAR LABORATORY, INC.

O AGENTE OFICIAL



30 VASCO MARQUES LEITE
Agente Oficial
da Propriedade Industrial
Cartório - Arco da Conceição, 3, 1.º-1100 LISBOA

24 JUL 1970
WJ

FIG. 1a

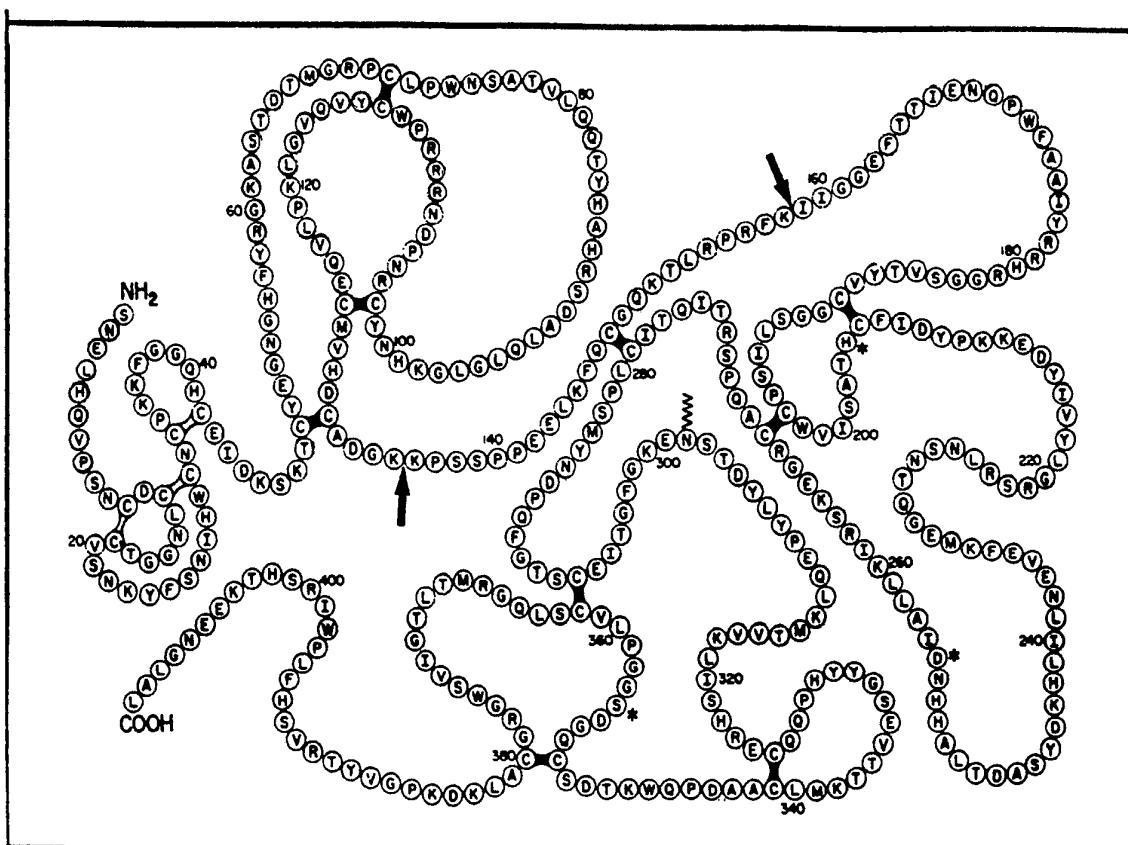
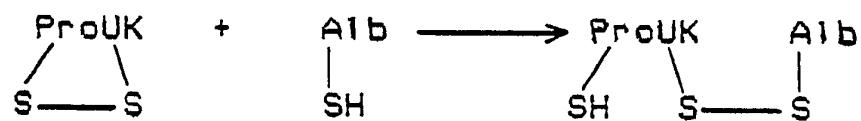
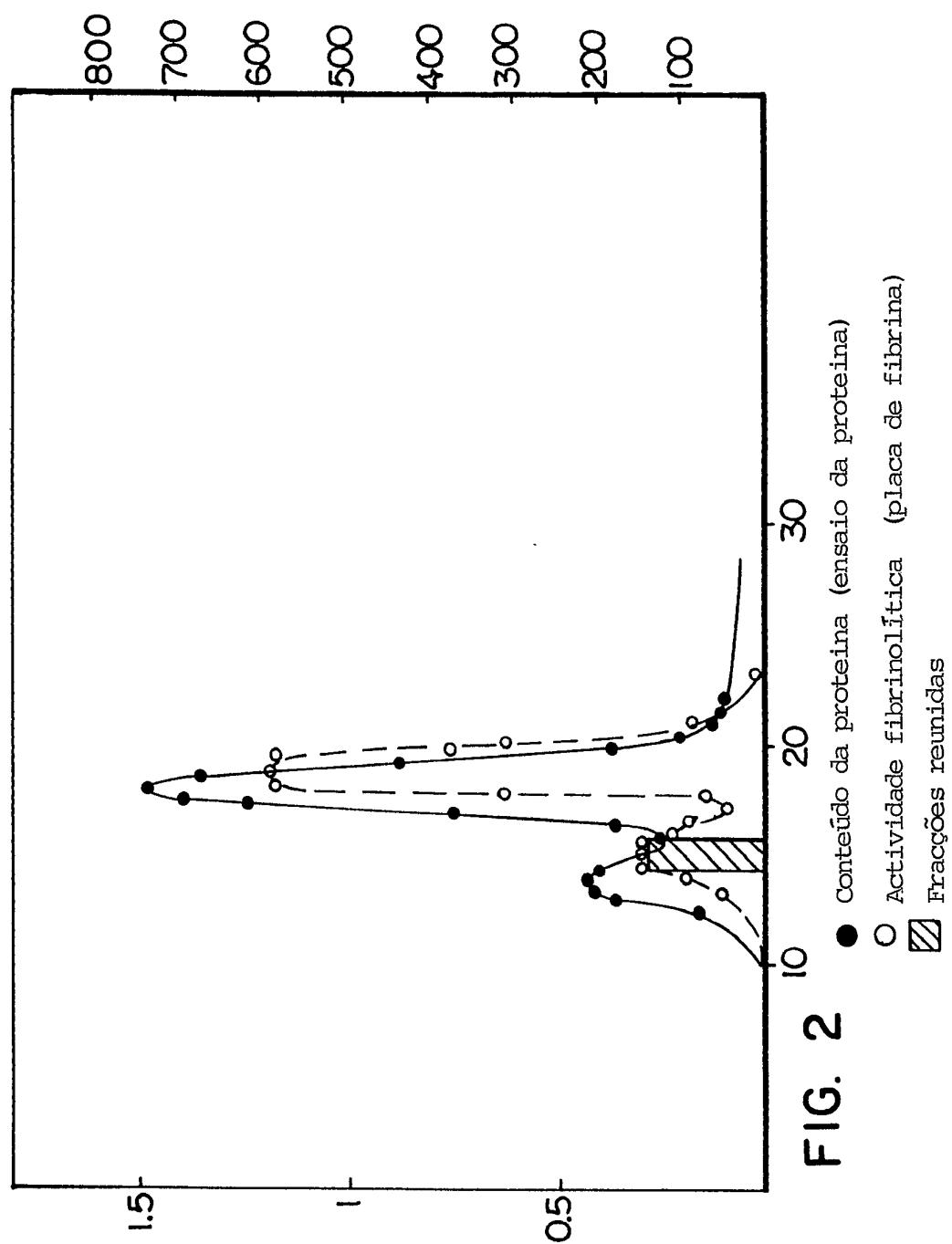


FIG. 1b



Formação do complexo Pro-UK/Albumina

24. JUL. 1990



24. JUL. 1990

FIG. 3

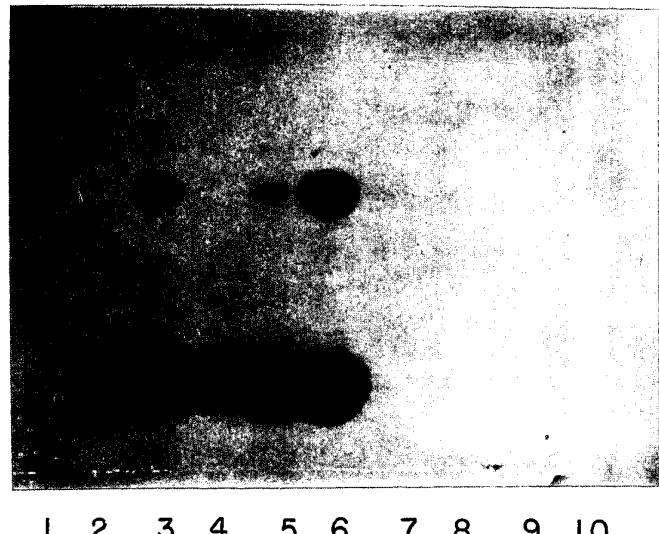
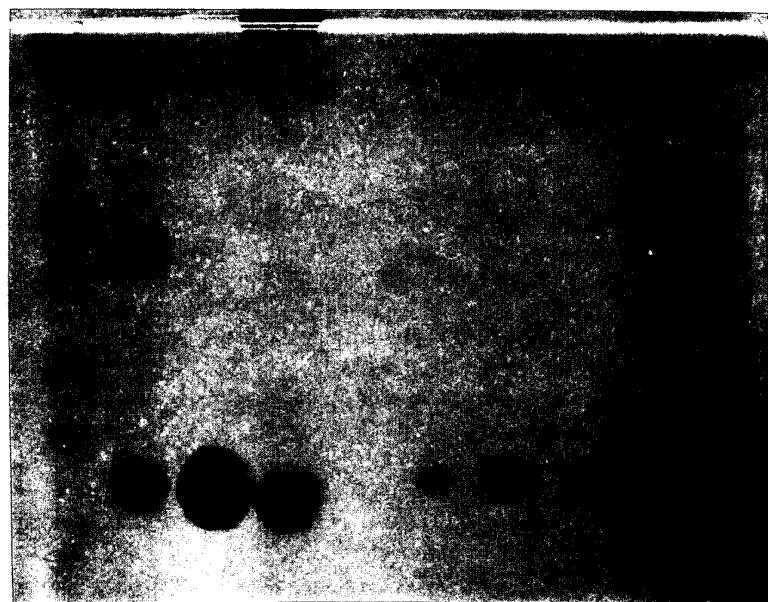


FIG. 4



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

24 JUL. 1990

FIG. 5

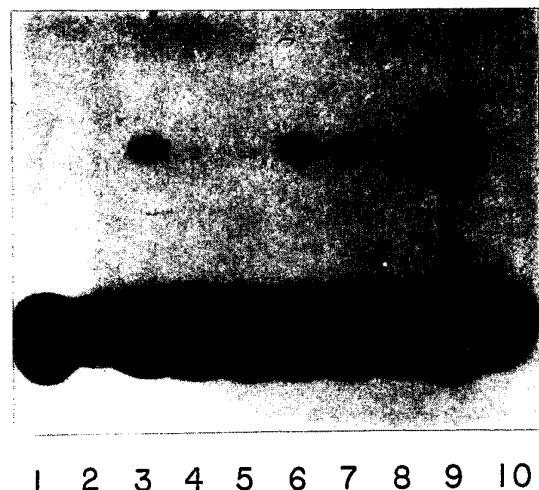


FIG. 6

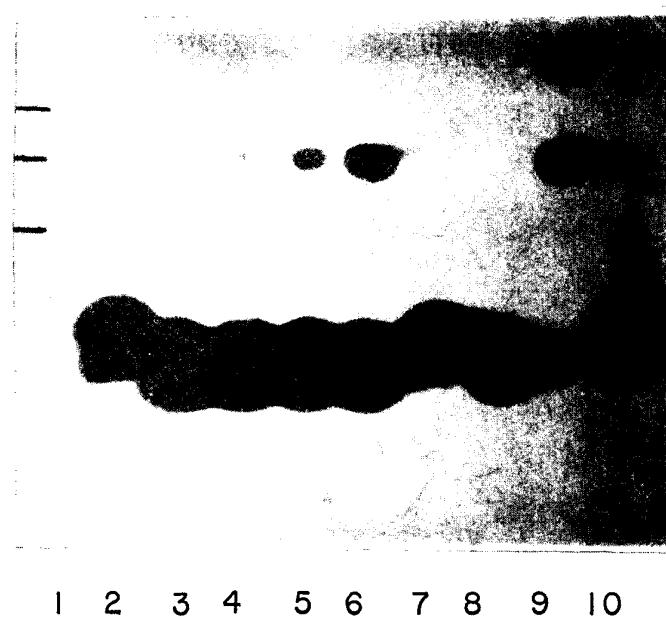
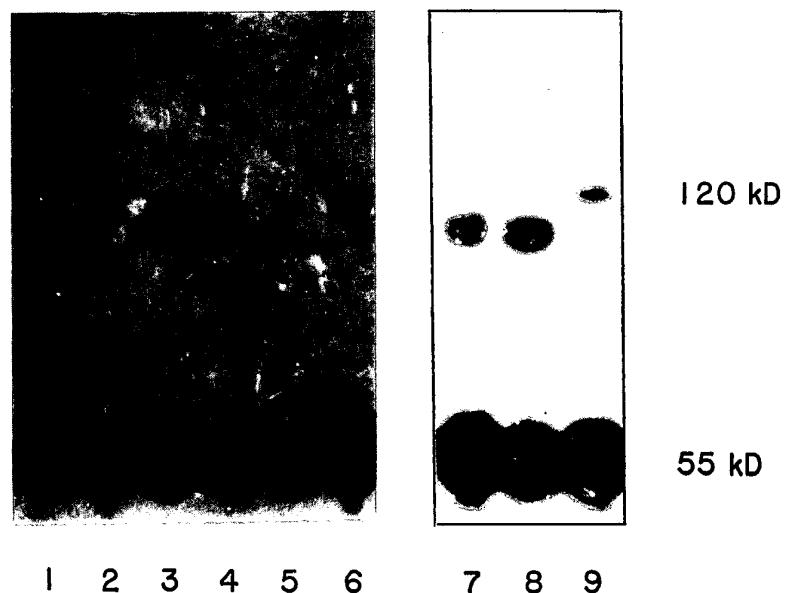
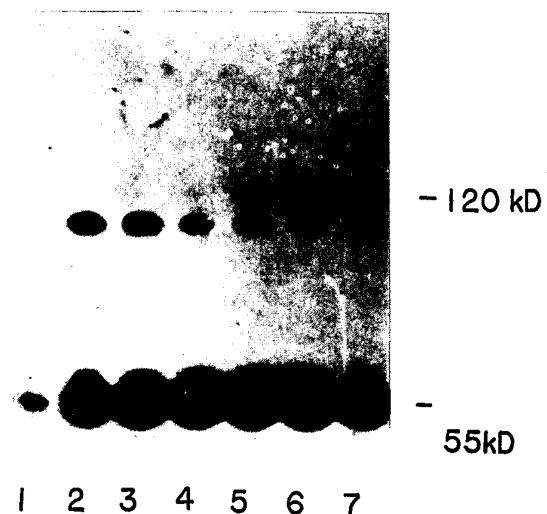


FIG. 7**FIG. 8a****FIG. 8b**

24 JUL 1990

FIG. 9

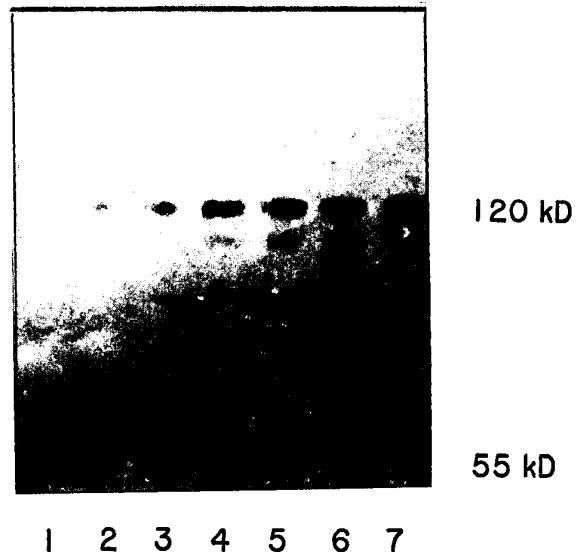
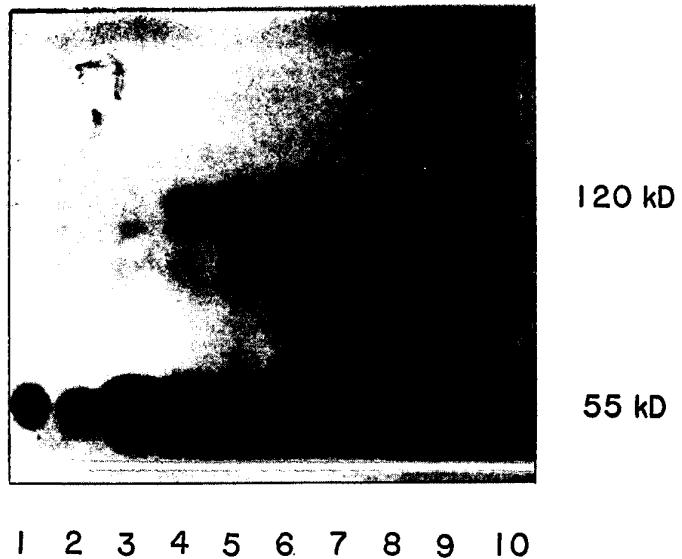


FIG. 11



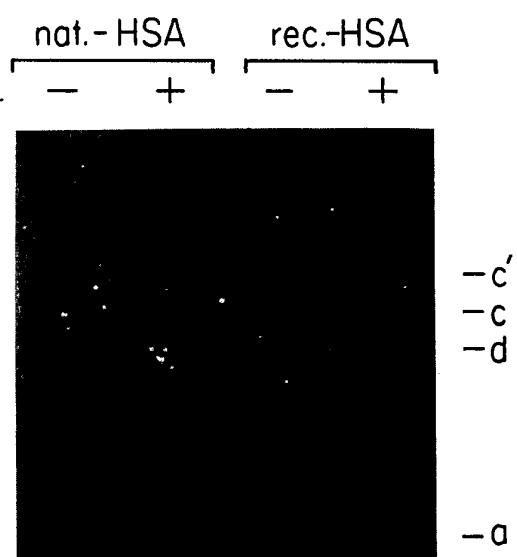


FIG. 10

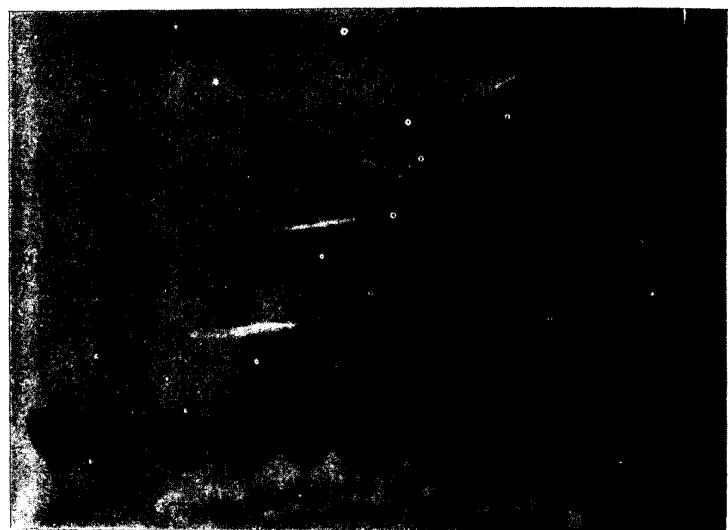


FIG. 16

24 JUL 1990

FIG. 12

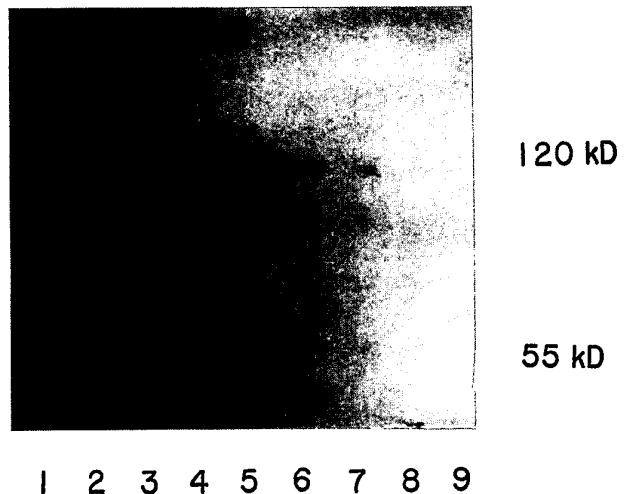
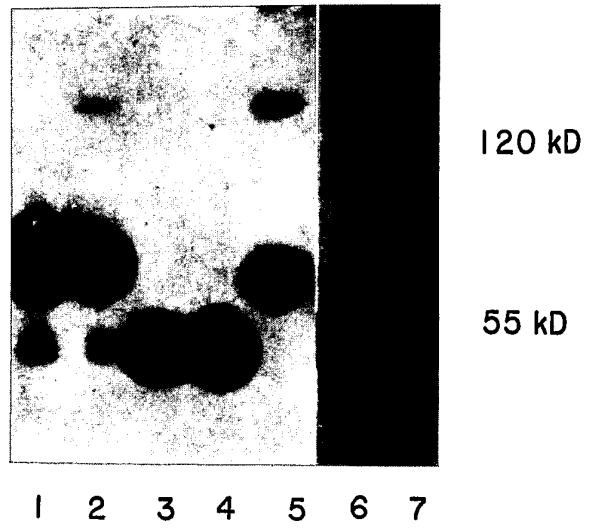
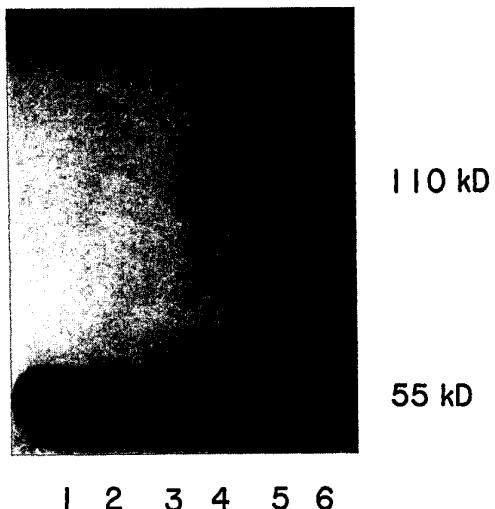


FIG. 13



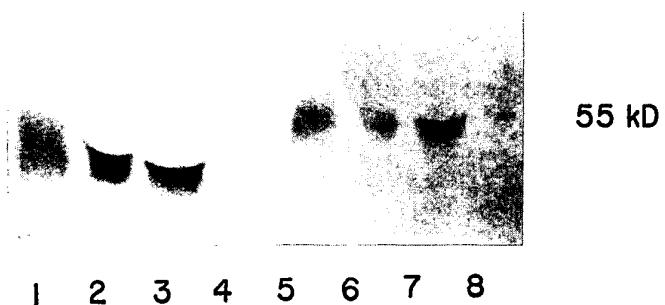
24. JUL. 1990

FIG. 15



não reduzido não reduzido

FIG. 14



24 JUL 1990
JL

FIG. 17

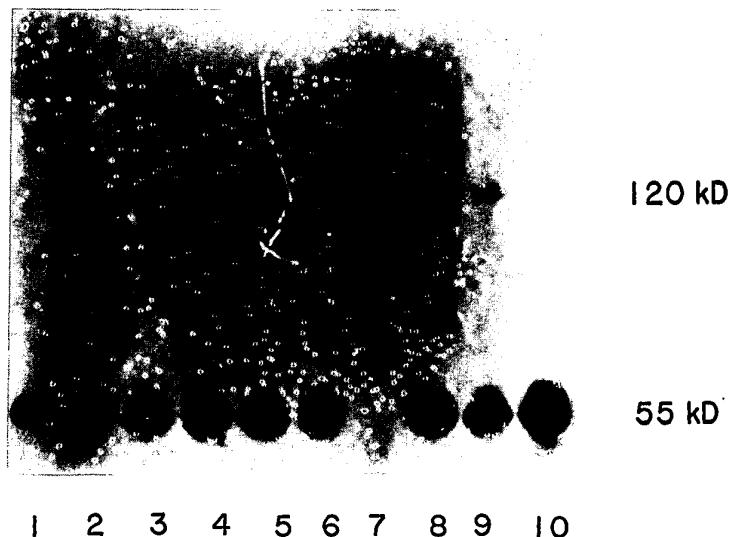


FIG. 18

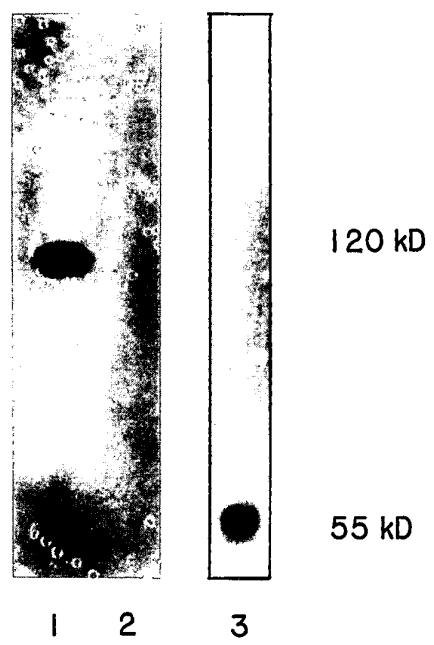


FIG. 19 a

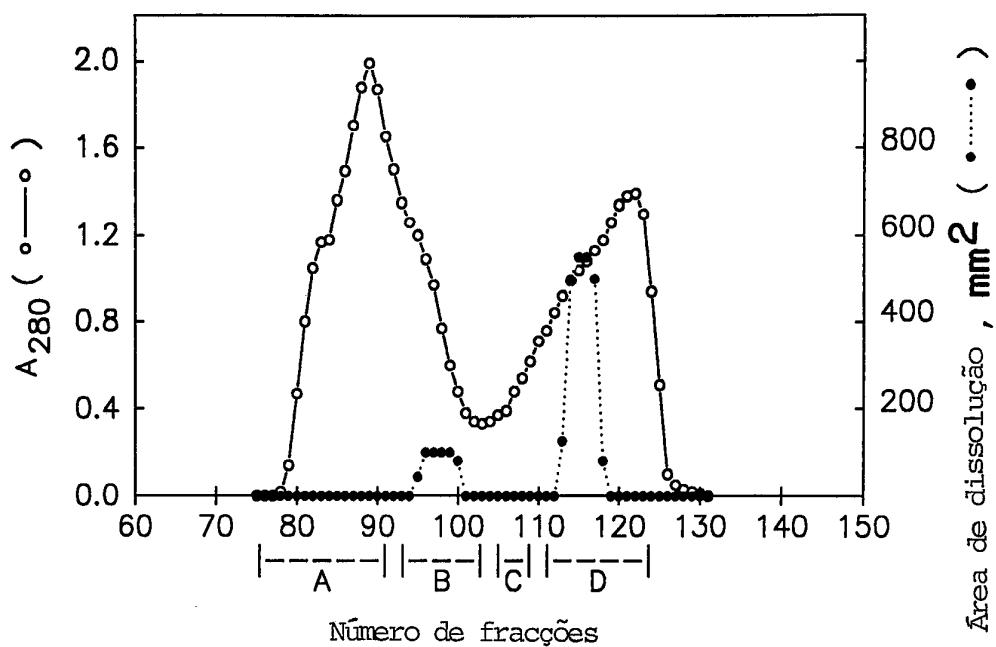


FIG. 19 b

