



F1000093518C



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(C) (11) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

93518

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 25.04.95

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

A 61K 38/48

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 893519

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 21.07.89

(24) Alkupäivä - Löpdag 21.07.89

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 29.01.90

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 13.01.95

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

28.07.88 AT 1919/88 P

(73) Haltija - Innehavare

1. **IMMUNO** Aktiengesellschaft, Industriestrasse 67, 1221 Wien, Österreich, (AT)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Linnau, Yendra, Lavendelweg 24, 1224 Wien, Österreich, (AT)

2. Hetzl, Ernst, Bergheidengasse 8/1/9, 1130 Wien, Österreich, (AT)

(74) Asiamies - Ombud: Seppo Laine Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä Lys-plasminogeenin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av Lys-plasminogen

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Haemostasis, vol. 18, suppl. 1, p. 157-163 (1988), Schoppmann, A., Linnau, Y.,
Hetzel, E., Philapitsch, A., Dorner, F., "Production and Quality of Lys-plasminogen
steam treated", Chemical Abstracts vol. 106 (1987) nro 117156d,
Chemical Abstracts vol. 105 (1986) nro 22249b

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää sellaisen Lys-plasminogeenin valmistamiseksi, jonka spesifinen aktiivisuus on vähintään 17,5 kaseinolytyttistä yksikköä/mg proteiinia ja vähintään 50 µmol/g proteiini-typpeä ja jonka elektroforeettinen aktiivisuus on vähintään 90 %, jonka menetelmän mukaan plasminogeeni adsorboidaan plasmasta, plasminogeenipitoisesta fraktios-ta tai kudosviljelystä puhdistusta varten immobilisoituun lysiniin, eluoidaan ja otetaan talteen eluaatista proteiini-saostusaineella, näin puhdistetun plasminogeenin liuos asetetaan plasmiiini-aktiivisuuteen, joka on kromogeenisen substraatin H-D-valyyli-L-leusyyli-L-lysiini-p-nitroanilidi-dihydrokloridin suhteen 0,005 - 0,2 µmol/ml min., etenkin 0,01 - 0,1 µmol/ml min, pidetään +1° - +20°C:ssa, etenkin +4° - +12°C:ssa 6 - 60 tunnin ajan, etenkin 15 - 50 tunnin ajan plasminogeenin konvertoimiseksi entsymaattis-proteolyyttisesti Lys-plasminogeeniksi, minkä jälkeen entsyymin vaikutus katkaistaan ja Lys-plasminogeeni eristetään.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av Lys-plasminogen med en specifik aktivitet av åtminstone 17,5 kaseinolytiska enheter/mg protein och med åtminstone 50 $\mu\text{mol/g}$ protein-kväve ävensom med en elektroforetisk renhet av åtminstone 90 %, enligt vilket förfarande plasminogen adsorberas för rening från plasma, en plasminogenhaltig fraktion eller en vävnadskultur på immobiliserat lysin, den elueras och utvinnes från eluatens med ett proteinutfällningsmedel, en lösning av den så renade plasminogen inställes på en plasminaktivitet, som i förhållande till det kromogena substratet H-D-valyl-L-leucyl-L-lysin-p-nitroanilid-dihydroklorid ligger inom området av 0,005 - 0,2 $\mu\text{mol/ml min}$, i synnerhet mellan 0,01 och 0,1 $\mu\text{mol/ml}$, lösningen hålles vid en temperatur av $+1^{\circ}$ - $+20^{\circ}\text{C}$, i synnerhet $+4^{\circ}$ - $+12^{\circ}\text{C}$ under en tid av 6 - 60 timmar, i synnerhet 15 - 50 timmar för att uppnå en enzymatisk-proteolytisk omvandling av plasminogen till Lys-plasminogen, varefter enzymverkan avbrytes och Lys-plasminogen isoleras.

Menetelmä Lys-plasminogeenin valmistamiseksi

Keksinnön kohteena on menetelmä Lys-plasminogeenin valmistamiseksi, jonka spesifinen aktiivisuus on vähintään 17,5 kaseinolyyttistä yksikköä/mg proteiinia ja vähintään 50 $\mu\text{mol/g}$ proteiini-typpeä ja jonka elektroforeettinen puhtaus on vähintään 90 %, jolloin plasminogeeni adsorboidaan plas-masta, plasminogeenipitoisesta fraktiosta tai kudosviljelys-tä puhdistusta varten immobilisoidussa lyysiinissä, eluoidaan ja otetaan talteen eluaatista proteiinisaostusaineella.

Lys-plasminogeeni on kirjallisuudessa käytetty yhteisnimitys luontaisen plasminogeenin (= Glu-plasminogeenin) proteolyyttisesti muunnetuille muodoille, jotka saadaan tästä lohkaishemalla polypeptidi NH_2 -päätteestä. Lys-plasminogeenin nykyisin tunnettujen lajien N-terminaaliseksi aminohapoksi on osoitettu tähän mennessä lyysiini, metioniini ja valiini. Glu-plasminogeenin molekyyllipainoksi esitetään kirjallisuudessa 90.000 - 94.000 ja Lys-plasminogeenin molekyyllipainoksi n. 80.000.

Fibrinolyyttisen tapahtuman suhteen Lys-plasminogeeni eroaa Glu-plasminogeenista ennen kaikkea kahdessa kohdassa: Lys-plasminogeenillä on korkeampi sitoutumisaffiniteetti trombin fibriniverkon suhteen ja se voidaan aktivoida monta kertaa nopeammin plasmiiniksi (esim. urokinaasilla). Molemmat ominaisuudet parantavat fibrinolyysin tehokkuutta ja ovat syynä siihen, että Lys-plasminogeeniä käytetään mieluummin tromboositerapiassa.

Lähtöaine Lys-plasminogeenin talteenottamiseksi on plasman Cohn-III-fraktio tai itse plasma. Kirjallisuudessa esitetyt menetelmät koostuvat useista menetelmävaiheista, jotka käsittävät mm. uuttamisia, adsorptioita ja saostuksia. N-terminaalisen polypeptidiketjun lohkaus ja muunto Lys-plasminogeeniksi suoritetaan joko suunnatusti eristetyssä Glu-plasminogeenissä tai se tapahtuu eristys- ja puhdistusvaiheiden kuluessa läsnäolevan proteolyyttisen aktiivisuuden johdosta.

P. Wallen ja B. Wiman [Biochem. Biophys. Acta 221, 20 - 30 (1970)] eristävät plasminogeenin siten, että pesty Cohn III-sakka uutetaan ja uute saostetaan metanolilla ja ammoniumsulfaatilla pH-arvossa 4,8. Tämä tuote sisältää 0,5 - 1,9 % spontaania proteolyyttistä aktiivisuutta, mikä johtuu plasmiinin aiheuttamasta epäpuhtaudesta. Aprotiniinin lisäyksen jälkeen lisäpuhdistus tuottaa geelisuodatuksella ja adsorptiolla/eluoinnilla anioninvaihtimessa plasminogeenin, joka sisältää pääasiassa glutamiinia N-terminaalisisena aminohappona ja jonka spontaani proteolyyttinen aktiivisuus on 0,1 - 0,3 %. Viimeistely lisäämällä aprotiniinia tuottaa tuotteen, jonka spontaani proteolyyttinen aktiivisuus on 4 % ja joka sisältää lyysiiniä, valiinia, mutta myös metioniiniä ja glutamiinia N-terminaalisisena aminohappona.

E. E. Rickli ja P. A. Cuendet [Biochem. Biophys. Acta 250, 447 - 451 (1971)] immobilisoivat lyysiinin polyakryyliamidi-geelissä ja käyttävät tätä geeliä plasminogeenin eristämiseksi plasmasta. Fosfaattipuskurilla suoritettun pesun jälkeen eluoidaan puskurilla, joka sisältää 0,5 mol/l 6-aminokapronihappoa. Lisäämällä ammoniumsulfaattia saostetaan plasminogeeni eluaatista ja liuotettu sakka dialysoidaan NaCl-Tris-lyysiiniä tai fosfaatti-NaCl-puskuria vastaan. N-terminaalisisena aminohappona voidaan osoittaa ainoastaan glutamiini.

D. Collen ja avustajat [Thromb. Res. 7, 515 - 529 (1975)] esittävät samoin menetelmän plasminogeenin valmistamiseksi affiniteettikromatografian avulla lyysiini-agarosilla plasmasta tai vast. Cohn III-sakasta lisäämällä aprotiniinia tai ilman tätä lisäystä. Plasmasta otetaan siten talteen aprotiniinilla puhdas Glu-plasminogeeni, ilman aprotiniinia tuote sisältää pieniä määriä proteiineja, joissa on Lys ja Val N-terminaalisisena aminohappona. Cohn III-sakasta eristettiin ilman aprotiniinilisäystä valmiste, jonka spontaani proteolyyttinen aktiivisuus (lähelläolevan plasman aiheuttama) oli 0,1 - 1 %. Lisättäessä 25.000 - 50.000 KIU aprotiniinia/kg Cohn III-sakkaa ja 5 KIU/ml pesu- ja eluointiliuok-

siin spontaani proteolyttinen aktiivisuus oli alle 0,1 %, Glu- ja Lys-plasminogeenin erotus tapahtui ioninvaihtokromatografialla DEAE-Sephadex A-50:ssä.

H. Claves ja avustajat [Thromb. Res. 3, 515 - 523 (1973) ja Biochim. Biophys. Acta, 342, 351 (1974)] uuttavat plasminogeenin Cohn III-sakasta fosfaattipuskurilla (0,1 mol/l, pH 7,4), joka sisältää 10 KIE aprotiniinia/ml. Adsorboidaan lyysiini-agarosissa ja pestään fosfaattipuskurilla, minkä jälkeen eluoidaan puskurilla, joka sisältää 6-aminokapronihappoa (0,2 mol/l) ja aprotiniinia (20 KIU/ml). Näin eristetyn plasminogeenin spotaani proteolyttinen aktiivisuus on n. 0,4 % ja N-terminaalisen aminohappona on Glu:n lisäksi myös Lys ja pieni määrä Val:ia ja Met:iä. Viimeisteltäessä plasma saman menetelmän mukaisesti N-terminaaliseksi aminohapoksi todetaan ainoastaan Glu, spontaani proteolyttinen aktiivisuus on alle 0,1 %. Edelleenpuhdistus tapahtuu geelisuodattamalla (Sephadex G-150) ja ioninvaihtokromatografialla (DEAE-Sephadex A-50). Lisättäessä aprotiniinia (400 KIU/ml) ennen edelleenpuhdistusta eristetään käyttämällä lähtöaineenä myös Cohn III-sakkaa lopputuote, jonka spontaani proteolyttinen aktiivisuus on alle 0,1 % ja jossa on Glu N-terminaalisen aminohappona. Glu-plasminogeenin muunto Lys-plasminogeeniksi onnistuu tekijöille inkuboimalla plasmiinin kanssa (plasminogeeni/plasmiini 200:1 - 20:3) 37°C:ssa ja se pysäytetään lisäämällä trikloorietikkahappoa tai aprotiniinia.

Kaikissa näissä menetelmissä on haittoja, koska ne joko eivät sovellu Lys-plasminogeenin eristämiseen suuressa mittakaavassa, koska ne käsittävät menetelmävaiheita, kuten esim. geelisuodatuksen, tai koska ne on suoritettava huoneen lämpötilassa, minkä johdosta farmaseuttinen valmiste voi saastua bakteereilla. Useimmiten nämä menetelmät johtavat myös valmisteisiin, jotka sisältävät plasmiinia ja siten korkean spontaanin proteolyttisen aktiivisuuden. Juuri tämä on kuitenkin ei-toivottua terapeuttisessa käytössä, koska se vaikuttaa valmisteita käytettäessä hyytymisjärjestelmän proent-

syymeihin, hävittää ne osittain ja siten johtaa ei-toivotuihin sivureaktioihin. Tämä proteolyyttinen aktiivisuus voidaan tosin inhiboida, mutta tällöin valmistettua valmistetta saastuttavat puolestaan muodostuneet inaktiiviset kompleksit.

Keksinnön tarkoituksena on eliminoida nämä haitat ja sen tehtävänä on valmistaa Lys-plasminogeeni, jonka spesifinen aktiivisuus on vähintään 17,5 kaseinolyyttistä yksikköä/mg proteiinia ja vähintään 50 μmol plasminogeenia/g typpeä ja jonka elektroforeettinen puhtaus on vähintään 90 %, jolloin plasminogeeni adsorboidaan plasmasta, plasminogeenipitoisesta fraktiosta tai kudosisjälystä puhdistusta varten immobilisoidussa lysiinissä, eluoidaan ja otetaan talteen eluutista proteiinisaostusaineella.

Keksinnön mukainen tehtävä ratkaistaan siten, että näin puhdistetun plasminogeenin liuos säädetään plasmiiniaktiivisuuden, joka on kromogeenisen substraatin H-D-valyyli-L-leu-syyli-L-lysiini-p-nitroanilidi-dihydrokloridi suhteen 0,005 - 0,2 $\mu\text{mol/ml}$ min., etenkin 0,01 - 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ min, pidetään $+1^{\circ}$ - $+20^{\circ}\text{C}$:ssa, etenkin $+4^{\circ}$ - $+12^{\circ}\text{C}$:ssa 6 - 60 tunnin ajan, etenkin 15 - 50 tunnin ajan plasminogeenin entsyymaattis-proteolyyttisen muunnon aikaansaamiseksi Lys-plasminogeeniksi, minkä jälkeen entsyymin vaikutus katkaistaan ja eristetään Lys-plasminogeeni.

Plasmiiniaktiivisuuden säätämiseksi keksinnön mukaisesti voidaan käyttää plasmaattisia entsyymejä, jotka ovat seriiniproteaasien ryhmästä. Ne käsittävät plasmiinin ja plasmininkaltaisia entsyymejä. Plasmiiniaktiivisuus, joka on 0,01 - 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ min, vastaa plasminogeeni/plasmiini-suhdetta 30.000:1 - 3.000:1. Tästä nähdään, että Glu-plasminogeenin proteolyyttinen muunto Lys-plasminogeeniksi suoritetaan yllättävän pienillä entsyymimäärillä.

Plasmiinin vaikutus plasminogeeniin katkaistaan edullisesti lisäämällä inhibiittoreita.

Käyttämällä erittäin pieniä määriä plasmaattista entsyymiä keksinnön mukaisessa menetelmässä myös pienet inhibiittorimäärät riittävät entsyymi vaikutuksen katkaisemiseksi. Lisämällä esim. 10 - 200 KIU/ml aprotiniinia tai 0,01 - 1,0 U/ml Cl-esteraari-inhibiittoria aktiivisuutta voidaan alentaa substraatin S 2251 suhteen arvoon 0,03 $\mu\text{mol/ml}$ min tai tämän alle. Tämä arvo on riittävä tuotteen stabiiliuden takaamiseksi muiden käsittelyvaiheiden, kuten suodatuksen, jäädytyskuivatuksen ja mahdollisesti lämpökäsittelyn aikana, joka tarvitaan mahdollisesti esiintyvien bakteereiden ja virusten inaktivoimiseksi.

Plasmiinivaikutuksen rajoittamiseksi voidaan käyttää myös muita inhibiittoreita, kuten alfa₂-makroglobuliinia tai alfa₂-antiplasmiinia.

Keksinnön eräässä edullisessa suoritusmuodossa plasmiinin annetaan vaikuttaa plasminogeeniin dialyysin aikana.

Keksinnön mukaisen menetelmän eräs edullinen muunnos lämpöstabiilin Lys-plasminogeenin valmistamiseksi, jonka spesifinen aktiivisuus on vähintään 17,5 kaseinolyyttistä yksikköä/mg proteiinia ja vähintään 50 nmol plasminogeeniä/mg typpeä ja jonka elektroforeettinen puhtaus on vähintään 90 %, veriplasmasta tai veriplasmatuotteista on tunnettu toimenpiteiden yhdistelmästä, jossa

- a) Cohn III-fraktio (sakka) uutetaan fosfaattipuskurilla käyttämällä läsnä 0,1 - 100 KIU aprotiniinia/ml puskuriliuosta raakaplasminogeenifraktion valmistamiseksi,
- b) raakaplasminogeenifraktio käsitellään etanolilla ei-plasminogeeniproteiinien pääosan saostamiseksi ja poistamiseksi uutteesta,
- c) plasminogeeni eristetään etanolisesta liuoksesta adsorbimalla immobilisoidussa lyysiinissä ja eluoimalla tämän jälkeen,
- d) näin puhdistettu plasminogeeni saostetaan ammoniumsulfatilla tai polyetyleeniglykolilla (PEG) ja sentrifugoidaan,

- e) sakka liuotetaan, liuos dialysoidaan plasmiinin läsnäollessa, jolloin liuoksen plasmiiniaktiivisuus verrattuna kromogeeniseen substraattiin S 2251 on 0,01 - 0,1 $\mu\text{mol/ml min}$, sitten
- f) katkaistaan entsyymin vaikutus 10 - 200 KIU:lla aprotiniinia ja
- g) tämän jälkeen liuos lyofilisoidaan ja lyofilisaatti mahdollisesti lämpökäsitellään.

Tämä suoritustapa lähtee siis Cohn III-fraktiosta (sakasta), jolloin tästä fraktiosta valmistetaan ensin uute fosfaattipuskurilla. Tämä uute sisältää suuria määriä inerttejä saattoproteiineja, kuten esim. immunoglobuliineja ja lipoproteiineja, jolloin ennen kaikkea viimeksi mainitut vaikeuttavat huonojen suodatusominaisuuksien ja epäspesifisten vuorovaikutusten johdosta affiniteettikromatografista puhdistusta immobilisoidussa lysiinissä.

Saostamalla etanolilla voidaan poistaa suuri osa näistä häiritsevistä saattoproteiineista.

Käyttämällä läsnä 0,1 - 100 KIU aprotiniinia/ml puskuriliuosta taataan plasminogeenin stabiilius affiniteettikromatografisen puhdistuksen aikana. Affiniteettikromatografian matriisina käytetään geeliä, joka sisältää lysiiniä ligandina, etenkin lysiini-polyakryyliamidigeeliä. Adsorption jälkeen loput saattoproteiinit poistetaan pesemällä - etenkin fosfaattipuskurilla - ja tämän jälkeen eluoidaan plasminogeeni. Tämä affiniteettikromatografisen puhdistus voidaan suorittaa erän suuruuden mukaan joko pylväässä tai panosmenetelmässä.

Käsittelemällä eluaatti proteiinisaostusaineella, kuten esim. ammoniumsulfaatilla tai polyetyleeniglykoli 4000:lla, saostetaan välituote, joka vastaa ominaisuuksiltaan kirjallisuudessa esitettyä Glu-plasminogeeniä ja jonka molekyypaino on SDS-PAGE:ssa 92.000.

Jo erittäin pienillä plasmiinimäärillä tämä välituote voidaan muuntaa fibrinolyttisesti proentsyymiksi, jolla on

kirjallisuudessa esitetyt Lys-plasminogeenin ominaisuudet ja jonka molekyylipaino on SDS-PAGE:ssa 84.000.

Lisäämällä valinnaisesti plasmiinia tai aprotiniinia puhdistetun plasminogeenin (= Glu-plasminogeenin) liuoksen proteolyyttistä aktiivisuutta voidaan korottaa tai alentaa, niin että yllä esitetty edullinen arvo 0,01 - 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ voidaan säätää tällä tavalla erittäin yksinkertaisesti. Entsyymin vaikutus liuoksessa katkaistaan muunnon jälkeen aprotiinillä, liuos lyofilisoidaan ja lyofilisaatti lämpökäsitellään mahdollisesti.

Keksinnön mukaisen menetelmän suorittamiseksi tarvittavia metodeja selitetään seuraavassa lähemmin.

Spontaanin proteolyttisen aktiivisuuden määrittäminen kromogeenisellä substraatilla H-D-valyyli-L-leusyyli-L-lysiini-p-nitroanilidi-dihydrokloridi (S 2251, firma Kabi)

Periaate perustuu siihen, että plasmiini ja muut proteolyttiset entsyymit lohkaistaan kromogeenisestä substraatista p-nitroaniliini, jonka vapautuminen voidaan mitata spektrofotometrisesti ekstinktion kasvuna 405 nm:ssä.

Näytteet esilaimennetaan ensin suhteessa 1:2, 1:5, 1:10 ja 1:20, jota varten käytetään vesipitoista liuotinta, jonka pH on 7,2 ja joka sisältää 10 mmol/l lysiiniä, 0,5 paino-% PEG 6000:ta ja 50 paino-% glyserolia.

Kromogeeninen substraatti liuotetaan tislattuun veteen konsentraatioon 5 mmol/l. Testipuskurina toimii vesiliuos, jonka pH on 7,2 ja joka sisältää 50 mmol/l Tris'iä ja 180 mmol/l NaCl:ä.

Määrittystä varten 0,25 ml:n näytelaimennokseen sekoitetaan 0,55 ml testipuskuria, inkuboidaan 2 minuutin ajan 37°C:ssa, lisätään 0,05 ml substraattiliuosta, minkä jälkeen seurataan ekstinktion kasvua 405 nm:ssä 37°C:ssa. Aktiivisuus laskeaan kaavan

$$\Delta E/\text{min} \cdot 0,321 \cdot \text{laimennustekijä} = \mu\text{mol/ml min}$$

mukaisesti.

Plasminogeenin spesifisen aktiivisuuden määrittäminen.

a) Kaseinolyttiset yksiköt (CU)/mg proteiinia

Tätä varten plasminogeeni aktivoidaan saattamalla reagoimaan streptokinaasin kanssa plasmiiniksi, joka lohkaisee kaseiinistä fragmentit, jotka liukenevat trikloorietikkahappoon ja jotka voidaan selvittää ekstinktion spektrofotometrisellä mittauksella supernatantissa 280 nm:ssä.

Näytteiden esilaimennus aktiivisuuteen 0,5 - 2,5 CU/ml tapahtuu vesiliuoksella, jonka pH on 9,0 ja joka sisältää 50 mmol/l Tris'iä, 20 mmol/l lyysiiniä, 0,1 mol/l NaCl:ä ja 1 mmol/l EDTA:ta.

Substraatti valmistetaan liuottamalla kaseiini Hammarstenin mukaisesti (4 %) fosfaattipuskuriin (67 mmol/l, pH 7,4).

Aktivointia varten käytetään streptokinaasin liuosta (2500 IE/ml) fosfaattipuskurissa yllä esitetyllä tavalla.

Määrittämiseksi 2,0 ml kaseiiniliuosta, 1,4 ml fosfaattipuskuria (67 mmol/l, pH 7,4), 0,4 ml näytelaimennosta ja 0,2 ml streptokinaasiliuosta sekoitetaan jäähäuteessa, jolloin sokkoarvoa varten pipetoidaan näytelaimennoksen sijasta puskuria. Kuumennetaan 30 minuutin ajan 37°C:ssa, sitten näytteet laitetaan jälleen jäähäuteeseen ja lohkaisematon kaseiini saostetaan lisäämällä 6 ml 15%:sta trikloorietikkahappoa. Annetaan seistä vähintään 30 minuutin ajan huoneen lämpötilassa, minkä jälkeen suodatetaan poimu-suodattimen läpi ja mitataan supernatantin ekstinktio sokkoarvoa vastaan 280 nm:ssä.

Kaseinolyttinen aktiivisuus lasketaan kaavan

$$E_{280} \cdot 16,3 \cdot \text{laimenn.} = \text{CU/ml}$$

mukaisesti.

Suoritetaan kaksoismäärittäksiä kulloinkin vähintään kahdesta erilaisesta mittausalueen puitteissa olevasta laimennuksesta.

Muunto spesifiseksi aktiivisuudeksi (CU/mg proteiinia) tapahtuu jakamalla kaseinolyttinen aktiivisuus proteiiniarvolla (Kjeldahl, mg/ml).

b) Mikromooli plasminogeeniä/mg proteiini-typpeä

Tämä määrittäysmenetelmä tunnetaan nimellä "Active-Site-Cross- Titration". Tätä varten plasminogeeni aktivoidaan ensin muodostamalla kompleksi streptokinaasilla. Tämä kompleksi reagoi p-nitrofenoli-p'-guanidino-bentsoaatin kanssa, jolloin vapautuu p-nitrofenolia, joka määritetään spektrofotometrisesti mittaamalla ekstinktio 400 nm:ssä.

Käytetään seuraavia reagenssejä:

Testipuskuri (pH = 7,7): 100 mmol/l Na_2HPO_4 :ä

1 mmol/l 6-aminokapronihappoa

Streptokinaasi-puskuri: 30 mmol/l Na_2HPO_4 :ä

150 mmol/l Na-glutamaattia

Titrausliuos: 2,5 mmol/l p-nitrofenyyli-p'-guanidino-bentsoaattia kuivassa DMSO:ssa (kuivattu molekyyliseulan $4 \cdot 10^{-10} \text{ m}$ läpi)

Vakioliuos: 1,0 mg p-nitrofenolia/1 ml kuivassa DMSO:ssa.

Ennen käyttöä laimennetaan 5 ml kuivalla

DMSO:lla 100 ml:aan.

Määrittäksen suorittamiseksi 1 ml testipuskuria, 50 myl streptokinaasiliuosta (n. 200 nmol/l) ja "V" myl näytettä inkuboidaan 20 - 30 minuutin ajan 25°C :ssa ja ekstinktio mitataan 400 nm:ssä 2,5 minuutin kuluessa. Lisätään 20 myl titrausliuosta, sekoitetaan ja seurataan uudelleen ekstinktiota 400 nm:ssä. Titrausliuoksen lisäyksen jälkeen mitattu ekstinktion kasvu, jonka tulee olla 0,08 - 0,12, on "At" laskennassa.

Paljas ajo: Streptokinaasin sijasta käytetään streptokinaasi-puskuria ja näytteen sijasta lisätään sama määrä puskuria, jossa on sama suolakoostumus kuin näytteessä. Muutoin toimitaan samalla tavalla kuin testiajossa. Ekstinktion kasvu on "Ab" laskennassa.

Vakio ajo: Toimitaan samoin kuin paljaassa ajossa, mutta titrausliuoksen sijasta käytetään vakioliuosta. Ekstinktion kasvu on "As" laskennassa.

Plasminogeeniaktiivisuus lasketaan kaavan:

$$\frac{(At - Ab) \cdot 20 \cdot 0,00036 \cdot 10^6}{As \cdot V} = \text{mymol/l}$$

mukaisesti.

Jakamalla tämä aktiivisuus liuoksen proteiini-typen pitoisuudella (Kjeldahl, g/l) saadaan plasminogeenin spesifinen aktiivisuus arvona mymol/g proteiini-typpeä.

Molekyyllipainon määrittäminen (SDS-polyakryyliamidi-geelielektroforeesi, SDS-PAGE)

Tässä menetelmässä lisäämällä SDS:ää varataan proteiinit yhtenäisesti ja ne vaeltavat polyakryyliamidigeelissä molekyylirikonsa mukaisesti asetettaessa sähköjännite. Vertaamalla vaellusväliä tarkistusproteiineilla tunnettuun molekyylipainoon voidaan määrittää tutkittujen näytteiden molekyylipaino.

Suoritusta varten 47,5 g akryyliamidia ja 2,5 g N,N-metyleeni-bis-akryyliamidia liuotetaan vesipitoiseen puskuriliuokseen, jonka pH on 7,1 ja joka sisältää 6 mol/l virtsa-ainetta, 0,1 mol/l Tris'iä ja 0,1 % SDS(natriumdodekyylisulfaattia).

57 ml tätä liuosta, 3 ml 0,5 % ammoniumperoksidisulfaatin vesiliuosta ja 90 myl N,N,N',N'-tetrametyyli-etyleenidiamiinia sekoitetaan nopeasti keskenään ja täytetään geelin valu-

telineeseen. Polymeroinnin jälkeen geeli laitetaan elektroforeesilaitteeseen. Näytteet laimennetaan 2,5 mg/ml:n proteiinikonsentraatioon liuoksella, joka sisältää 9 mol/l virtsa-ainetta ja 4,5 % SDS:ää. Lisälaimennuksen (1 + 1) jälkeen glyseroli-bromifenolisinellä käytetään kulloinkin 6 µl näytettä. Elektroforeesia varten käytetään puskuria, jonka pH on 7,1 ja joka sisältää 0,1 mol/l Tris'iä, 0,1 % SDS:ää ja 0,001 % natriumatsidia. Elektroforeesi suoritetaan 10 minuutin ajan 50 V:ssä ja tämän jälkeen 3 tunnin ajan 100 V:ssä. Tämän jälkeen geeli värjätään tunnin kuluessa huoneen lämpötilassa liuoksella, jossa on 2 g Coomassie-sineä 455 ml:ssa metanolia, 455 ml:ssa vettä ja 90 ml:ssa jääetikkaa. Värinpoisto tapahtuu seoksella, jossa on 2,5 l metanolia, 1,0 l jääetikkaa ja 6,5 l vettä.

Molekyylipainon määrittämiseksi mitataan vaellusvälit, jotka ovat verrannollisia molekyylipainon logaritmin suhteen. Rinnakkain analysoidusta tarkistimesta selvitetään näin kalibrointisuora, josta voidaan lukea tutkittavan näytteen molekyylipaino.

Kun tutkittavassa näytteessä havaitaan useita proteiinikais-toja, niin niiden jakaantuminen määritetään ekstinktion densitometrisen tulkinnan avulla 601 nm:ssä.

: Lysiini-polyakryyliamidigeelin valmistus

100 g Biogel P-300:a (0,15 - 0,30 mm, firman Bio-Rad polyakryyliamidigeeli) annetaan turvota 2,6 l:ssa vettä 2 tunnin ajan 47°C:ssa ja se muunnetaan hydratsidiksi saattamalla reagoimaan hydratsiinihydraatin (1,2 l) kanssa 20 tunnin ajaksi 47°C:ssa. Pestään tislattulla vedellä, kunnes saavutetaan pH-arvo, joka on alle 8,5 (suodatus büchner-suppilon läpi). Pesty geeli suspendoidaan 6 l:aan 0,3 N HCl:ä ja pH korjataan arvoon 1,1. Jäähdytetään 0°C:seen ja sitten lisätään kylmä liuos, jossa on 56 g natriumnitriittiä 200 ml:ssa vettä, ja sekoitetaan 3 minuutin ajan. Lisätään liuos, jossa on 730 g lyysiiniä 2 l:ssa vettä, ja sitten sekoitetaan vä-

:
:

hintään 3 tunnin ajan korkeintaan $+4^{\circ}\text{C}$:ssa ja pH-arvossa 9,5. Tämän jälkeen sekoitetaan vielä 16 tunnin ajan $+4^{\circ}\text{C}$:ssa. Pestään 3 kertaa kulloinkin 20 l:lla vettä ja suodatetaan büchner-suppilon läpi ja sitten sekoitetaan liuoksen (15 l) kanssa, joka sisältää 107 g/l ammoniumkloridia (pH 8,8), 16 - 20 tunnin ajan $+4^{\circ}\text{C}$:ssa. Tämän jälkeen geeli pestään vedellä ja sitten vielä fosfaattipuskurilla.

Keksinnön mukaista menetelmää selitetään vielä lähemmin seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkki 1:

1 kg Cohn III-sakkaa suspendoitiin 0°C :ssa 10 l:aan fosfaattipuskuria, pH 7,4, johon oli lisätty edellä 10 KIU/ml apro-tiniinia. Jäähdyttäen -2°C :seen lisättiin etanolia 10 %:n loppukonsentraatioon. Sekoitettiin 15 tunnin ajan -2°C :ssa, sitten sentrifugoitiin ja emäliuos suodatettiin selluloosaan perustuvan syväsuodattimen läpi (AMF Cuno Zeta Plus 50 S). Tämän jälkeen laimennettiin 5 l:lla fosfaattipuskuria ja lisättiin 500 g lyysiini-polyakryyliamidigeeliä. Sekoitettiin tunnin ajan 0°C :ssa ja sitten plasminogeenillä kuormitettu geeli erotettiin suodattamalla büchner-suppilon läpi ja pestiin niin monta kertaa fosfaattipuskurilla, kunnes suodoksessa ei voitu havaita enää yhtään proteiinia. Sekoitettiin liuoksen kanssa, jossa oli 6-amino-kapronihappoa (0,1 mol/l) fosfaattipuskurissa, ja sitten eluoitiin plasminogeeni ja saostettiin tämän jälkeen lisäämällä 261 g ammoniumsulfaattia/kg eluaattia.

Sentrifugoimalla talteenotettu sakka liuotettiin 32 ml:aan isotonista fosfaatti/keittosuolapuskuria. Koska edelleenkestettely keksinnön mukaiseksi valmisteeksi on riippuvainen esitetyn aktiivisuuden omaavan plasmaattisen entsyymin, nimittäin plasmiinin läsnäolosta, mitataan ensin liuoksen plasmiiniaktiivisuus kromogeenisen substraatin S 2251 suhteen. Se oli $0,045 \mu\text{mol/ml}$, niin että tässä tapauksessa ei tarvita mitään korjaussäätöä. SDS-PAGEssa voitiin osoittaa

ennen tämän jälkeen tapahtuvaa dialyysiä ainoastaan yksi kaista, jonka molekyylipaino oli 92.000 (= Glu-plasminogeeni).

Dialysoitiin isotonista fosfaatti/keittosuolaliuosta vastaan 36 tunnin ajan 5,0°C:ssa ja sitten lisättiin 50 KIU/ml apro-tiniinia. Aktiivisuus substraatin S 2251 suhteen oli nyt 0,01 µmol/ml min. Kaseinolyyttisen aktiivisuuden testi antoi tulokseksi 342 CU/ml. Tämä vastaa 21,9 CU/mg:n spesifistä aktiivisuutta proteiinipitoisuuden ollessa 15,6 g/l (Kjeldahlin mukaisesti). Active-Site-Cross-Titration tuotti aktiivisuudeksi 164 µmol/l ja siten spesifiseksi aktiivisuudeksi 65,7 µmol/g proteiini-typpeä. Dialyysin aikana SDS-PAGEssa voitiin osoittaa proteiinin, jonka molekyylipaino oli 92.000 (= Glu-plasminogeeni), muunto proteiiniksi, jonka molekyylipaino oli 84.000 (= Lys-plasminogeeni). Tämän tuotteen osuus oli 98 %.

Lisättiin 20 mmol/l lyysiiniä ja sitten pH säädettiin arvoon 7,0 ja tämän jälkeen suodatettiin ja jäädytyskuivatettiin. Lyofilisaatin vesipitoisuus saatettiin 7,8 painoprosenttiin ja sitten sitä kuumennettiin 10 tunnin ajan 60°C:ssa mahdollisesti esiintyvien bakteerien tai virusten inaktivoimiseksi. Liuotettiin tislattuun veteen ja sitten steriilisodatettiin, täytettiin steriilinä ja jäädytyskuivatettiin uudelleen. Näin valmistetun lopputuotteen tulokset olivat muuttumattomia spesifisen aktiivisuuden ja elektroforeettisen puhtauden testeissä verrattuna tuotteeseen, joka saatiin välittömästi dialyysin jälkeen.

Esimerkki 2:

Cohn III-sakan uuttaminen, etanolisaostus ja suodatus suoritettiin esimerkissä 1 esitetyllä tavalla. Laimennettiin fosfaattipuskurilla, minkä jälkeen liuos pumpattiin kromatografiapylvään läpi, joka oli täytetty 100 g:lla lyysiini-polyakryyliamidigeeliä. Peseminen ja eluointi suoritettiin esimerkissä 1 esitetyillä liuoksilla, mutta kromatografiapylvääs-

sä. Saostus eluaatista ammoniumsulfaatilla ja sakan liuottaminen suoritettiin esimerkissä 1 esitetyllä tavalla. SDS-PAGEssa todettiin ainoastaan yksi kaista, jonka molekyyli-paino oli 92.000. Aktiivisuus kromogeenisen substraatin S 2251 suhteen oli 0,003 $\mu\text{mol/ml min}$. Lisäämällä plasmiinia se nostettiin arvoon 0,016 $\mu\text{mol/ml min}$. Dialysoitiin 43 tunnin ajan 7°C:ssa ja sitten lisättiin 100 KIU/ml aprotiniinia, minkä jälkeen SDS-PAGEssa havaittiin kaistan osuudeksi, jonka molekyyli-paino oli 84.000 (= Lys-plasminogeeni), yli 98 %. Spesifinen aktiivisuus oli 22,3 CU/mg proteiinia tai vastaavasti 60,5 $\mu\text{mol/g tyyppiä}$.

Esimerkki 3:

Cohn III-sakan uuttaminen fosfaattipuskurilla suoritettiin aprotiniinin (2 KIU/ml) lisäyksen jälkeen. Muu käsittely ammoniumsulfaatilla suoritettavaan saostamiseen ja sakan liuottamiseen asti tapahtui esimerkissä 2 esitetyllä tavalla.

Liuoksen aktiivisuus kromogeenisen substraatin S 2251 suhteen oli 0,014 $\mu\text{mol/ml min}$. Dialysoitiin 22 tunnin ajan 11,7°C:ssa ja sitten lisättiin 20 KIU/ml aprotiniinia, jolloin spesifinen aktiivisuus oli 20,5 CU/mg proteiinia tai vastaavasti 56,3 $\mu\text{mol/g proteiini-tyyppiä}$ ja Lys-plasminogeenin osuus SDS-PAGEssa oli 96 %.

Esimerkki 4:

Plasminogeenin eristäminen lyysiini-polyakryyliamidigeelin eluointi mukaanlukien tapahtui esimerkissä 3 esitetyllä tavalla. Plasminogeeni saostettiin lisäämällä 70 g polyetyleeniglykoli 4000:ta 350 ml:aan eluaattia. Sentrifugoimalla talteenotettu sakka liuotettiin 15 ml:aan fosfaatti/NaCl-puskuria. SDS-PAGEssa voitiin osoittaa ainoastaan "Glu-plasminogeeni", jonka molekyyli-paino oli 92.000. Plasmiinin lisäyksen jälkeen substraatilla S 2251 mitattu aktiivisuus oli 0,01 $\mu\text{mol/ml min}$; dialysoitiin 42 tunnin ajan 6,6°C:ssa ja sitten lisättiin aprotiniinia (50 KIU/ml).

Lys-plasminogeenin osuus SDS-PAGEssa oli 95 %. Spesifinen aktiivisuus oli 23,4 CU/mg proteiinia tai vastaavasti 59,0 $\mu\text{mol/g}$ proteiinityppeä.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä sellaisen Lys-plasminogeenin valmistamiseksi, jonka spesifinen aktiivisuus on vähintään 17,5 kaseinolyyttistä yksikköä/mg proteiiniä ja vähintään 50 $\mu\text{mol/g}$ proteiinityyppiä ja jonka elektroforeettinen puhtaus on vähintään 90 %, jonka menetelmän mukaan plasminogeeni adsorboidaan plasmasta, plasminogeenipitoisesta fraktiosta tai kudosisviljelystä puhdistusta varten immobilisoituun lyysiiniin, eluoidaan ja otetaan talteen eluaatista proteiinisaostusaineella, t u n n e t t u siitä, että näin puhdistetun plasminogeenin liuos saatetaan plasmiiniaktiivisuuteen, joka on kromogeenisen substraatin H-D-valyyli-L-leusyyli-L-lyysiini-p-nitroanilidi-dihydrokloridin suhteen 0,005 - 0,2 $\mu\text{mol/ml}$ min., etenkin 0,01 - 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ min, pidetään $+1^{\circ}\dots +20^{\circ}\text{C}$:ssa, etenkin $+4^{\circ}\dots +12^{\circ}\text{C}$:ssa 6...60 tunnin ajan, etenkin 15...50 tunnin ajan plasminogeenin konvertoimiseksi entsyymaattisproteolyttisesti Lys-plasminogeeniksi, minkä jälkeen entsyymin vaikutus katkaistaan ja Lys-plasminogeeni eristetään.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että plasmiinin vaikutus plasminogeeniin katkaistaan lisäämällä inhibiittoreita.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että inhibiittoreina plasmiinin vaikutuksen rajoittamiseksi käytetään aprotiniinia 10...200 KIU/ml, C1-esteraasi-inhibiittoria 0,01...1,0 U/ml, alfa₂-makroglobuliinia tai alfa₂-antiplasmiinia.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että plasmiinin annetaan vaikuttaa plasminogeeniin dialyysin aikana.

5. Yhden tai useamman patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä lämpöstabiiilin Lys-plasminogeenin valmistamiseksi

veriplasmasta tai veriplasmatuotteista, jolloin sen spesifinen aktiivisuus on vähintään 17,5 kaseinolyyttistä yksikköä/mg proteiiniä ja vähintään 50 nmol plasminogeeniä/mg typpeä ja sen elektroforeettinen puhtaus on vähintään 90 %,

t u n n e t t u seuraavien toimenpiteiden yhdistelmästä, jossa

- a) Cohn III-fraktio (sakka) uutetaan fosfaattipuskurilla käyttämällä läsnä 0,1...100 KIU aprotiniinia/ml puskuriliuosta raakaplasminogeenifraktion valmistamiseksi,
- b) raakaplasminogeenifraktio käsitellään etanolilla ei-plasminogeeniproteiinien pääosan saostamiseksi ja poistamiseksi uutteesta,
- c) plasminogeeni eristetään etanolisesta liuoksesta adsorboimalla immobilisoituun lyysiiniin ja eluoimalla tämän jälkeen,
- d) näin puhdistettu plasminogeeni saostetaan ammoniumsulfatilla tai polyetyleeniglykolilla (PEG) ja sentrifugoidaan,
- e) sakka liuotetaan, liuos dialysoidaan plasmiinin läsnäollessa, jolloin liuoksen plasmiiniaktiivisuus verrattuna kromogeeniseen substraattiin H-D-valyyli-L-leusyyli-L-lysiini-p-nitroanilidi-dihydrokloridi on 0,01...0,1 $\mu\text{mol/ml}$ min sitten
- f) katkaistaan entsyymin vaikutus 10...200 KIU:lla aprotiniiniä ja
- g) tämän jälkeen liuos lyofilisoidaan ja lyofilisaatti mahdollisesti lämpökäsitellään.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av Lys-plasminogen med en specifik aktivitet av åtminstone 17,5 kaseinolytiska enheter/mg protein och med åtminstone 50 $\mu\text{mol/g}$ proteinkväve ävensom med en elektroforetisk renhet av åtminstone 90 %, enligt vilket förfarande plasminogen adsorberas för rening från plasma, en plasminogenhaltig fraktion eller en vävnadskultur på immobiliserat lysin, den elueras och utvinnes från eluaten med ett proteinutfällningmedel, k ä n n e t e c k n a t av att en lösning av den så renade plasminogenen inställes på en plasminaktivitet, som i förhållande till det kromogena substratet H-D-valyl-L-leucyl-L-lysin-p-nitroanilid-dihydroklorid ligger inom området av 0,005 - 0,2 $\mu\text{mol/ml min}$, i synnerhet mellan 0,01 och 0,1 $\mu\text{mol/ml min}$, lösningen hålles vid en temperatur på $+1^{\circ}\dots+20^{\circ}\text{C}$, i synnerhet $+4^{\circ}\dots+12^{\circ}\text{C}$ under en tid av 6...60 timmar, i synnerhet 15...50 timmar för att uppnå en enzymatisk-proteolytisk omvandling av plasminogen till Lys-plasminogen, varefter enzyminverkan avbrytes och Lys-plasminogen isoleras.

2. Förfarande enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a t av att inverkan av plasmin på plasminogen avbrytes genom tillsättning av inhibitorer.

3. Förfarande enligt krav 2, k ä n n e t e c k n a t av att som inhibitorer för begränsning av plasmininverkan används aprotinin i en mängd av 10...200 KIU/ml, CI-esteras-inhibitor i en mängd av 0,01...1,0 U/ml, alfa₂-makroglobulin eller alfa₂-antiplasmin.

4. Förfarande enligt krav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att plasmin får inverka på plasminogen under genomförandet av en dialys.

5. Förfarande enligt ett eller flera av kraven 1 - 4 för framställning utav blodplasma eller blodplasmaprodukt av värmestabil Lys-plasminogen med en specifik aktivitet av

åtminstone 17,5 kaseinolytiska enheter/mg protein och åtminstone 50 nmol plasminogen/mg kväve samt en elektroforetisk renhet av åtminstone 90 %, k ä n n e t e c k n a t av följande kombination av åtgärder, varvid

- a) en Cohn III -fraktion (utfällning) extraheras med en fosfatbuffert i närvaro av 0,1...100 KIU aprotinin/ml buffertlösning för framställning av en råplasminogenfraktion,
- b) råplasminogenfraktionen behandlas med etanol för utfällning av största delen av icke-plasminogenproteinerna och för avlägsning av dessa från extraktet,
- c) plasminogen separeras från den etanolhaltiga lösningen genom adsorption i immobiliserat lysin och därpåföljande eluering,
- d) den så renade plasminogenen utfälles med ammoniumsulfat eller polyetylglykol (PEG) och centrifugeras,
- e) utfällningen upplöses och lösningen dialyseras i närvaro av plasmin, varvid lösningens plasminaktivitet i jämförelse med det kromogena substratet H-D-valyl-L-leusyl-L-lysin-p-nitroanilid-dihydroklorid ligger inom området 0,01...0,1 $\mu\text{mol/ml min}$, varefter
- f) enzyminverkan avbrytes med 10...200 KIU aprotinin, och
- g) lösningen lyofiliseras och lyofilisatet eventuellt värmebehandlas.