

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95 205


REQUERENTE: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com
sede em D-3550 Marburg, Alemanha Ocidental

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DO
ACTIVADOR DE PLASMINOGÉNIO 2 (PAI-2)"

INVENTORES: Dr. Klaus Peter Radtke , Prof. Dr. Norbert
Heimburger e Karlheinz Wenz

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

República Federal da Alemanha, em 06 de Setembro de 1989,
sob o N.º. P 39 29 504.4.

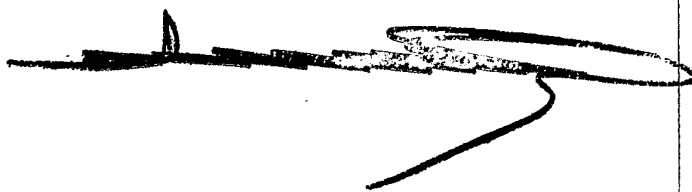


Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGES-
ELLSCHAFT, alemã, industrial e
comercial, com sede em D-3550 Mar-
burg, Alemanha Ocidental, (invento-
res: Dr. Klaus Peter Radtke, resi-
dente nos Estados Unidos da América
e Prof. Dr. Norbert Heimburger
e Karlheinz Wenz, residentes na
República Federal Alemã) para "PRO-
CESSO PARA A PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR
DO ACTIVADOR DE PLASMINOGÊNIO 2
(PAI-2)"

D E S C R I Ç Ã O

A presente invenção refere-se a um processo para a purificação do inibidor do activador de plasminogénio 2 (PAI-2), por meio do qual se precipitam as impurezas com uma base acridina ou quinolina.

Os activadores de plasminogénio (PA) são proteases de serina, que activam o sistema fibrinolítico. Transformam o pro-enzima inactivo plasminogénio no enzima activo plasmina, que degrada a fibrina e o fibrinogénio. No organismo existem dois PA, o activador de tecidos (tissue plasminogen activator, t-PA) e o PA idêntico à uroquinase (u-PA), produzido pelas células dos rins e ainda por outras células normais ou malignas. O t-PA tem um significado especial na prevenção de trombozes. O u-PA inibe a formação de aglomerados de fibrina nas vias urinárias, mas contribui também para a cicatrização de feridas e foi encontrado em formação neoplásicas.



A concentração e a actividade dos PA são reguladas através da sua síntese e também por meio de inibidores. São conhecidos dois inibidores específicos de PA (Pai) que não inibem a plasmina ou outras proteases. Um deles é produzido pelas células endotélicas (PAI-2) e o outro pela placenta (PAI-2), também designado por "minactivina".


Partindo de um extracto de placenta pode, de acordo com o estado da técnica, por meio de um fraccionamento com sulfato de amónio, adsorção de impurezas em CM-Sephadex 50, filtração de gel e cromatografia em hidroxilapatite, conseguir-se um enriquecimento de 120 vezes em PAI-2. Obtêm-se assim duas formas de PAI-2 com pesos moleculares de 70 e 43 KDa. Utilizou-se também para a purificação cromatografia de afinidade imunológica bem como uma combinação de cromatografia de afinidade imunológica e cromatografia FPLC. Uma combinação de 8 passos processuais, constituída por uma precipitação com sais neutros, cromatografias em ^(R)Sepharose CM e DEAE e hidroxilapatite, bem como por uma electroforese preparativa, conduziu, partindo de placenta, a um PAI-2 puro com um peso molecular de 47 KDa. Era também conhecido que os passos de purificação cromatográfica eram favorecidos pela adição de agentes redutores do tipo do ditiotreitol.

O objectivo da invenção é o de descobrir um processo mais fácil, aplicável à escala industrial, para a obtenção de PAI-2.

Descobriu-se surpreendentemente que se podem precipitar impurezas a partir de uma solução de PAI-2, com lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina, enquanto que o próprio PAI-2 se mantém dissolvido na camada sobrenadante.

Revelou-se vantajosa uma pré-incubação com ditiotreitol (DTT).

O objectivo da invenção é um processo para a purificação de inibidor do activador de plasminogénio 2 (PAI-2), caracterizado por se pré-incubar uma solução contendo PAI-2 com um agente de cisão de pontes di-sulfureto, de



preferência ditionitretol (DTT) e se adicionar a quantidade suficiente de uma base acridina ou quinolina adequada, solúvel em água, de preferência lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina, de modo a que o precipitado formado contenha pouco PAI-2, se separar este precipitado e se isolar o PAI-2 a partir da camada sobrenadante e, conforme o caso, se continuar a purificação de acordo com processos conhecidos.

Por adição de menores quantidades de base acridina ou quinolina, em relação à quantidade de proteínas dissolvidas, precipita-se também o PAI-2. É conveniente uma concentração de um sal da base, solúvel em água, de preferência lactato de 2-etoxi-6,9-diamino-acridina, de 200 mg a 2g/g de proteína na solução (o Pai-2 continua dissolvido). Trabalha-se a um PH de 5,5-8,5.

A solução contendo o PAI-2 pode pasteurizar-se previamente, conforme o caso, por adição do estabilizadores, de preferência glicina e/ou sacarose.

De preferência, a solução contendo PAI-2 é um extracto de placenta ou uma solução contendo PAI-2 preparado por engenharia genética.

O agente de cisão de di-sulfureto emprega-se numa concentração de 10 mmol/l a 250 mmol/l, de preferência 100 mmol/l. Efectua-se a pré-incubação durante 15 minutos a 3 horas, de preferência 1 hora, a 10 a 40°C, de preferência a cerca de 37°C.

Quando se proceda da forma acabada de descrever, na camada sobrenadante encontram-se 85-90% da actividade inicial do PAI-2, mas apenas 5-8% da quantidade inicial de proteína.

A partir da camada sobrenadante, após a precipitação, pode dessalinizar-se a base acridina, de preferência com NaCl a 5%, e concentrar-se o PAI-2 por meio de uma precipitação com sulfato de amônio, por exemplo por saturação da solução a 80% com sulfato de amônio, o que, em conjunto com uma pré-precipitação com uma saturação a 30%

~~CONFIDENTIAL~~

da solução com sulfato de amônio, conduz a uma purificação adicional. Uma vez que, por precipitação com rivanol e sulfato de amônio, se separam cerca de 90% da proteína utilizada, pode submeter-se a pequena quantidade restante a processo de purificação que estejam limitados a pequenos volumes: por exemplo, uma cromatografia em DEae - ^RAffigel-Blue, um gel para cromatografia com afinidade bifuncional, constituído por grupos dietilaminoetil e corante ^RCibacron Blue F3GA, ligados covalentemente a agarose e a hidroxilapatite. Um material com este grau de pureza pode já ser adequado para utilização com fins terapêuticos. A última purificação pode efectuar-se por cromatografia hidrofóbica numa coluna de fenilalanina, havendo contudo que contar com perdas elevadas.

O PAI-2 obtido pode, conforme o caso, ser ainda pasteurizado, caso não o tenha sido previamente.

Descreve-se em seguida o processo de acordo com a invenção:

Para seguir a obtenção de PAI-2 utilizou-se um método amidolítico em conjugação com o substrato cromogénico S-2444 da firma Kabi (Glu-Glu-Arg-pNa).

Para a determinação incubaram-se 50 µl de uroquinase (u-PA) (1000E/ml) com 100 µl da amostra contendo PAI-2, durante 4 minutos à temperatura ambiente e colocam-se 80 µl desta mistura numa célula de plástico pré-aquecida a 37°C. Em seguida adicionaram-se-lhe 50 µl de tampão A e 20 µl de S-2444 (6 mM). Determinou-se o aumento da absorção a 280 nm num analisador de centrifugação Cobas Bio. Compararam-se os valores medidos com os de uma curva de diluição obtida a partir de uma série de diluição de um padrão de PAI-2.

Materiais utilizados para o isolamento de PAI-2:

- Lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina (lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina): Sigma Chemie GmbH, D-6100 Darmstadt; para a precipitação fraccionada utilizou-se uma solução a 2,5% (p/v) em Tris 12,5 mM; pH 6,8.

- Ditiotreitól (DTT): Serva Feinbio-

chemiKa GmbH & Co., D-6900 Heidelberg

- Hidroxilapatite: ^RBioRad, Richmond
CA, USA

- Fenilalamina - ^RSepharose e ^RSe-
pharose 4B activada com CNBr: Deutsche Pharmacia GmbH, D-6900
Freiburg

- S-2444: Kabi Vitrum, S-11287
Stockholm, Suécia

- Tris(hidroximetil)aminometano
(Tris): E. Merck, D-6100 Darmstadt

- Uroquinase (^RActosolo): Behring-
werke AG, D-3550 Marburg

- Tampão A.: 50mM Tris; pH 8,4: 1%
de poligelinq; 100 mM NaCl; 0,01% de ^RTriton X 100 e 0,01%
de NaN₃

- Tampão B: 20 mM Tris; pH 7,5;
20 mM DTT

- Tampão C: 20 mM Na₂HPO₄; pH 6,8;
20 mM DTT


- Tampão D: 20 mM Tris; pH 7,5;
20 mM DTT; 30% de sulfato de amônio saturado

- Tampão E: 20 mM Tris; pH 7,5;
100 mM NaCl

- Tampão F: 20 mM Tris; pH 6,8

Exemplo

Como matéria prima para a preparação de PAI-2 utilizou-se placenta humana isenta de sangue, lavada e congelada, que se pulverizou num "cutter" e se extraiu em seguida com NaCl a 0,5% e EDTA 3mM. Os resíduos celulares removeram-se por centrifugação e precipitou-se a camada sobrenadante com Rivanol a 8%, dissolveu-se o precipitado e submeteu-se a uma precipitação fracionada com sulfato de amônio. O precipitado, que continha o PAI-2, dissolveu-se em tampão F e dializou-se neste. O extracto de placenta concentrado continha 4615 U de PAI-2/ml com uma actividade específica


de 120 U/mg. Utilizou-se este material para posterior alta purificação.

- Precipitação com Rivanol e sulfato de amônio

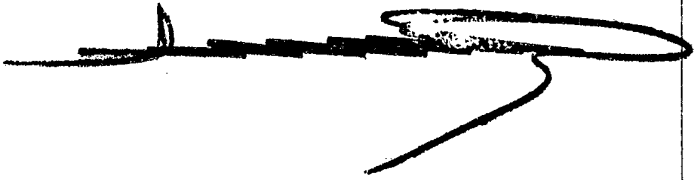
Incubaram-se 500 ml do material de partida acima descrito (Tab. 1) com 7,7g de DTT (concentração final 100 mM) a 37°C durante 1 hora. A esta solução adicionaram-se gota a gota e sob cuidadosa agitação contínua 1 520 ml de uma solução de rivanol a 2,5%, atingindo-se assim uma concentração final de 200%. O precipitado obtido removeu-se por filtração e separou-se o rivanol em excesso, a partir da camada sobrenadante, por adição de 100g de NaCl sólido, até uma concentração final de 5%. Adicionou-se então à camada sobrenadante 343g de sulfato de amônio sólido, até se atingir uma concentração final correspondente a uma saturação de 30%. Separou-se o precipitado por centrifugação (20 minutos, 3000 u/min.) e adicionou-se em seguida 694g de sulfato de amônio sólido até uma concentração final de uma saturação de 80%. O precipitado assim obtido dissolveu-se em tampão B concentrado e dializou-se. Obteve-se assim 80 ml de resíduo de sulfato de amônio dissolvido e dializado.

- Cromatografia em DEAE - ^RAffigel-Blue

Colocaram-se 80 ml do precipitado com sulfato de amônio numa coluna DEAE-Affigel-Blue (17,5 X 4,4 cm; 260 ml de camada de gel), equilibrada com tampão B. Eluiu-se a coluna com um gradiente de NaCl em tampão B (2 x 1000 ml), estendendo-se numa gama de 0 a 200 mM NaCl, a uma velocidade de fluxo de 90 ml/hora. No decurso da eluição mediu-se a concentração de albumina pela densidade optica (OD) a 280 nm e determinou-se a actividade de PAI-2 como descrito.

- Cromatografia em hidroxilapatite

Recolheram-se 472 ml das fracções contendo PAI-2, do passo anterior, dialisaram-se contra tampão C e aplicaram-se a uma coluna de hidroxipatite (15 x 3,2 cm;



56 ml de camada de gel) (Tab. 1), equilibrada com o mesmo tampão. Eluiu-se a coluna com uma velocidade de fluxo de 50 ml/hora e com um gradiente de sal de fosfato de sódio (0,02 a 0,3M; 2 x 250 ml) em tampão C. Determinaram-se continuamente a concentração de albumina e a actividade de PAI-2 no eluído.

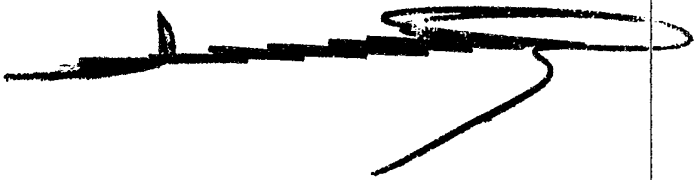
- Fenilalanina - ^RSepharose

Recolheram-se as fracções contendo PAI-2, obtidas após cromatografia em hidroxilapatite e, a 120 ml deste material adicionou-se 13,2 g de sulfato de amónio sólido, de modo a atingir uma saturação de 30%. Aplicou-se esta solução a uma coluna do fenilalamina-^RSepharose, equilibrada com o tampão D. Eluiu-se a resina com uma velocidade de fluxo de 20 ml/hora, com um gradiente constituído pelos tampões D e B(2 x 100 ml). recolheram-se as fracções contendo o PAI-2 e caracterizaram-se. O material purificado ao mais alto grau apresentava uma actividade específica de 60 000 U(unidades)/mg e caracterizava-se na electroforese de gel em SDS-poliacrilamida por uma banda com um peso molecular de 43 KDa, que se pôde identificar num ensaio imunológico com um anti corpo monoclonal específico.

TABELA 1

Purificação do inibidor do activador de plasminogénio 2(Pai-2)

Material de partida	Volume (ml)	Concentração de proteína (mg)	Actividade de PAI-2 (E)	Actividade específica (E/mg)	Factor de Purificação	Rendimento (%)
Camada de rivanol	500	19.000	$2,20 \times 10^6$	115	1	100
Resíduo de sulfato de amónio a 30-80%	1.850	1.311	$1,80 \times 10^6$	1.373	11,9	82
DEAE-RAffi-gel-Blue	80	800	$1,15 \times 10^6$	1.460	13	52
Hidroxil-apatite	472	65	$5,90 \times 10^5$	9.143	79,5	27
Fenilalamina	120	16,3	$4,60 \times 10^5$	28.100	244	21
-R-Sepharose	210	2,3	$1,20 \times 10^4$	52.300	455	5,5



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Processo para a purificação do inibidor do activador de plasminogênio 2 (PAI-2), caracterizado por se pré-incubar uma solução contendo PAI-2 com um agente de cisão de ligações em ponte dissulfureto, e se fazer reagir com a quantidade necessária de uma base de quinolina ou de acridina adequada, solúvel em água, de preferência com lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina, de modo que o precipitado formado contenha quando muito uma pequena quantidade de PAI-2, se separar em seguida este precipitado e se isolar o PAI-2 a partir da camada sobrenadante e, conforme o caso, se continuar a purificá-lo de acordo com processos conhecidos.

- 2ª -

Processo para a purificação de PAI-2, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a solução contendo o PAI-2 ser um extracto de placenta ou uma solução de PAI-2 preparado por engenharia genética.

- 3ª -

Processo para a purificação de PAI-2, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o agente de cisão do dissulfureto ser o ditiotreitól.

- 4ª -

Processo para a purificação de PAI-2, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o agente de cisão de dissulfureto se empregar numa concentração de 10 mmol/l a 250 mmol/l, de preferência de 100 mmol/l.

- 5ª -

Processo para a purificação de PAI-2, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se

efectuar a pré-incubação durante um período de 15 minutos a 3 horas, de preferência durante uma hora.

- 6ª -

Processo para a purificação de PAI-2, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se efectuar a pré-incubação a uma temperatura de 10 a 40°C, de preferência a cerca de 37°C.

- 7ª -

Processo para a purificação de PAI-2, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se fazer reagir, a base, em solução, a um valor de pH de 5,5 a 8,5.

- 8ª -

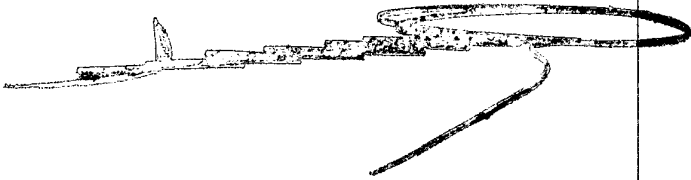
Processo para a purificação de PAI-2, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se proceder à pasteurização da solução contendo PAI-2.

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 6 de Setembro de 1989, sob o Nº. P 39 29 504.4.

Lisboa, 05 de Setembro de 1990

LABORATÓRIO NACIONAL DE PATENTES E MARCAS





R E S U M O

"PROCESSO PARA A PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DO ACTIVADOR DE PLASMINOGÊNIO 2 (PAI-2)"

A invenção refere-se a um processo para a purificação do inibidor do activador de plasminogênio 2 (PAI-2), que compreende pré-incubar-se uma solução contendo PAI-2 com um agente de cisão de ligações em ponte disulfureto, e se fazer reagir com a quantidade necessária de uma base de quinolina ou de acridina adequada, solúvel em água, de preferência com lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina, de modo que o precipitado formado contenha quando muito uma pequena quantidade de PAI-2, se separar em seguida este precipitado e se isolar o PAI-2 a partir da camada sobrenadante e, conforme o caso, se continuar a purificá-lo de acordo com processos conhecidos.