

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

201 844 B

(22) Bejelentés napja: 1987.02.26.

(21) 752/87

(33) GB

(32) 1986.02.27.

(31) 8604851

(51) Int Cl⁵

G 01 N 33/577

G 01 N 33/74

(41) (42) Közzététel napja: 1987.09.28.

(45) Megadás meghírdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.12.28. SZKV/1990.09.

(72) Feltalálók:

Corti Angelo, Bergamo,
Nolli Marialuisa,
Cassani Giovanni, Pávia,
Parenti Francesco, Lainate/Milánó (IT)

(73) Szabadalmas:

Gruppo Lepetit S.p.A., Milánó (IT)

(54) IMMUNADSZORPCIÓS-AMIDOLITIKUS MÓDSZER A HUMÁN VIZELETPLAZMINOGÉN AKTIVÁTOR PREKURZOR (pro-uPA) ÉS A HUMÁN VIZELET-PLAZMINOGÉN AKTIVÁTOR (u-PA) MEGHATÁROZÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás vizelet-plazminogén aktivátor zimogén (pro-uPA), vizelet-plazminogén aktivátor (u-PA), valamint ezek keverékének szelektív meghatározására.

Az eljárás során a vizsgálandó oldatot egy analitikai segédanyaggal hozzák érintkezésbe, melynek felülete monoklonális antitesttel van bevonva, ez-

után a kezelt segédanyagokhoz egy enzimatis aktivátor pufferes oldatát adják, majd a kapott oldat koncentrációját ismert amidolitikus módszerrel meghatározzák.

Az eljárás egyik jellegzetessége az, hogy lehetővé teszi a pro-uPa meghatározást enzimatisusan aktív származéka, az u-Pa jelenlétében is.

A leírás terjedelme: 12 oldal, ábra nélkül

HU 201 844 B

A találmány tárgya a vizelet-plazminogén aktivátor zimogénnek (pro-uPA = urinary plasminogen activator precursor), (általánosan használt elnevezéssel urokináz) biológiai folyadékokból, valamint bármilyen, ezeket tartalmazó oldatokból külön-külön vagy együttesen történő szelektív meghatározására vonatkozó új eljárás.

Az eljárás egyik jellegzetessége valójában abban áll, hogy még enzimatikusan aktív származéka, az u-PA jelenlétében is lehetővé teszi a pro-uPA meghatározását.

A találmány szerinti új eljárás pontos, megbízható, gyors és könnyen kivitelezhető. A vizsgálaton belüli és a vizsgálatok közötti pontosság a jelenleg analitikai célokra elfogadott értéktartományba esik.

A találmány szerinti eljárásnak megfelelően az u-PA és/vagy a pro-uPA-n és az u-PA-n lévő szokásos epitóp felé irányul. A mintákat az enzimatisz aktivitás szempontjából az enzimatikusan inaktív zimogén aktiválásával, illetve anélkül vizsgáljuk.

E meghatározás pontossága annak a ténynek is tulajdonítható, hogy a mintából könnyen eltávolíthatók a szennyeződések és az interferáló anyagok a vizsgált anyag(ok) immunabszorpciója után.

A plazminogén aktivátorok (PA) szerin-proteázok, melyek a plazminogént plazminná alakítják. A plazmin a fibrinre — a véralvadék fő alkotórészére — erősen specifikus proteáz. A plazminogén aktivátoroknak legalább két, immunológailag különböző típusát izolálták malignus sejtvonalak tenyésztéséből: a szöveti plazminogén aktivátorral (TPA = tissue plasminogen activator) rokon (1. Rijken D. C., Wijngaard G., Zaal-de Jong M., Welbergen J., /1979/, *Biochem. Biophys. Acta* 380, 140), illetve a vizelet aktivátorral (u-PA, más néven urokináz) rokon típus (Williams J. R. B. /1951/, *Br. J. Exp. Pathol.* 32, 530). Az u-PA típust eredetileg kettős fehérjeláncként állították elő tisztított formában a vizeletből, újabban a — pro-uPA-nak nevezett — proenzim formájában izolálták, például humán epidermoid karcinoma sejtek HEp3 vonalából (Wun T. D., Ossowsky L., Reich E. /1982/, *J. Biol. Chem.* 257, 7262), humán glioblastoma sejtekből (Nielsen L. S. et al. /1982/, *Biochem.* 21, 641), vizeletből (Husai S. C. et al. /1983/, *Arch. Biochem. Biophys.* 220, 31), valamint a TCL-598-as humán vese állandó sejtvonalából (Kohno T. et al. /1984/, *Biotechnol.* 2, 628). Egy, az u-PA-val immunológailag rokon proenzimet az A431-es humán epidermoid karcinoma sejtvonal felülszójából is azonosítottak.

Ez a pro-uPA zimogén egyetlen 50–54000-es molekulatömegű fehérjeláncból áll, amidolitikus aktivitása nincs vagy alacsony, fibrin-affinitása magas, diizopropil-fluoro-foszfát kezelésére és plazma inhibitorokkal történő inaktiválásra rezisztens (1. Gurewicz V. et al. /1984/, *J. Clin. Invest.* 73, 1731), és plazminnal végzett kezeléssel kettős láncú aktív enzimmé (u-PA) alakítható.

A humán u-PA molekulát két, biológailag aktív formában izolálták: egy nagy molekulatömegű forma (MS körülbelül 54000) és egy kis molekulatömegű forma (MS körülbelül 330). A kis molekulatömegű forma (LMW = low molecular weight) a

nagy molekulatömegű (HMW = high molecular weight) keletkezik, enzimatisz hasítással.

A nagy molekulatömegű forma egy 30000-es nehéz láncból (B-lánc) és egy 20000-es könnyű láncból (A-lánc) áll, melyek diszulfid-kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A kis molekulatömegű forma az aktív helyet hordozó egész B-láncot tartalmazza, továbbá egy, a diszulfid-kötéssel kapcsolódó A-láncból származó kis, fehérjebontás szempontjából ellenálló fragmensből áll (MS = 2,427). Az A-lánc proteolízissel két fragmensre bontható, egy 18000-es molekulatömegűre és a fenti, 2,427-es fragmensre. A kis molekulatömegű u-PA keverés aktív a nagy molekulatömegű u-PA-nál, az oldadék lizisének meggyorsítása tekintetében, in vivo (M. Samama et al., *Thromb. Haemostas.* 40, 578–580 /1979/, G. Murano et al., *Blood*, 55, 430–436 /1980/). A humán u-PA-t jelenleg főként normál és tumoros vese-sejtkultúrákból nyerik, hagyományos tisztítási eljárások segítségével. A humán u-PA zimogén hasonló fiziológiai szerepet játszhat u-PA-vá történő aktiválódását követően. A fent megadott számok Dalton-ban értendők.

Újabb közlés szerint humán u-PA-t állítottak elő, DNS-technológia segítségével (92182. sz. európai közrebocsátási irat).

Az u-PA fibrinolitikus aktivitását fibrin-lemezes módszerrel (Plough J. et al. /1957/, *Biochem. Biophys. Acta* 24, 278), az amidolitikus aktivitást acetil-lizil-metil-észteren (ALME) pedig a Sherry és munkatársai által leírt módszer módosításával határozzuk meg (Sherry et al. /1964/, *J. Lab. Clin. Med.* 64, 145). Más esetben az u-PA fibrinolitikus aktivitása a piro-glutamil-glicil-arginil-p-nitroanilid (S2444) szintetikus szubsztát segítségével állapítható meg.

0,1 ml mintát, 0,1 ml sertés-plazmint (Sigma, 25 µg/ml) és 0,8 ml 1% bovin szérum albumint (BSA) tartalmazó 0,1 M pH = 8,8-as Tris-HCl puffert 1 órán át 20 °C-on inkubáltunk. A mintákat amidolitikus aktivitás szempontjából különböző időpontokban vizsgáltuk. A plazmin reakciót 10 µl pufferben oldott 100 µg aprotinin (Richter) hozzáadásával állítottuk le.

A szakemberek számára nyilvánvaló, hogy mind a pro-uPA hatékonyságának megítélése, mind pedig a kezelt betegek plazma-szintjeinek rutinszerű ellenőrzése szempontjából szükség van egy pontos, megbízható, gyors és könnyen kivitelezhető módszerre. Ezt a célt szolgálja a találmány szerinti eljárás. E módszer alkalmas továbbá az u-PA és/vagy a pro-uPA analízisére komplex közegben is, amilyen például a sejt- vagy mikroorganizmus tenyésztésére alkalmas táptalaj.

A találmány egy másik lehetséges alkalmazási területe biológiai nedvekben vagy bármilyen vizes közegben a nagy molekulatömegű u-PA — például kis molekulatömegű u-PA-vá vagy annak bármilyen más lebomlási termékévé történő átalakítása következtében való — eltűnésének vizsgálata monoklonális vagy poliklonális antitest készítmény alkalmazásával, mely képes a nagy molekulatömegű u-PA felismerésre — a kis molekulatömegű u-PA-éra azonban nem — mint például az alábbiakban részletesebben ismertetendő 5B4-es monoklonális an-

títest.

A „biológiai folyadék” kifejezést a találmány alkalmazása során olyan értelemben használjuk, amely felöleli az emberi biológiai nedveket, azaz a plazmát, a vizeletet, az exszudátumokat stb. éppúgy, mint a sejtek és mikroorganizmusok tenyésztésére alkalmas táptalajokat. Ez utóbbiak között különösen jellegzetesek az u-PA és/vagy a pro-uPA előállítására képes és rekombináns DNS-sel rendelkező mikroorganizmusok tenyésztésére alkalmas táptalajok, továbbá az u-PA és/vagy a pro-uPA termelő sejtek tenyésztésére való táptalajok, mint például az emberi epidermoid karcinoma sejtek vagy a normál és tumoros humán vese-sejtek. Az is tekintetbe kell vennünk, hogy minden, amint a „biológiai folyadékban” végzett meghatározásról elmondtunk, érthető és alkalmas a vizsgált anyag bármilyen más oldatban történő kimutatására is. Az egyszerűség kedvéért a vizsgált anyag bármilyen oldatát, illetve a találmány szerinti eljárás során alkalmazható bármilyen biológiai folyadékot a továbbiakban „vizsgált oldatnak” fogunk nevezni. A „vizsgált anyag”(ok) kifejezéssel az u-PA-t (humán vizelet plazminogén aktivátor) és/vagy a pro-uPA-t (annak enzimatikusan inaktív prekursorát) jelöltük a leírásban és a szabadalmi igénypontokban.

Részletesebben, a találmány szerinti eljárás a következő lépésekből áll:

(i) a vizsgálandó oldatot egy analitikai segédanyaggal hozzuk érintkezésbe, amelynek felülete a következő tulajdonságokkal jellemezhető monoklonális antitesttel van bevonva:

- az IgG1 osztályba tartozik,
- az antigénhez 10^{-6} – 10^{-11} affinitású,
- specifikusan kötődik a nagymolekulatömegű (54000 D) u-PA-hoz, illetve annak prekursorához (azaz a pro-uPA-hoz) anélkül, hogy megkötné a kismolekulatömegű (33000 D) formát),
- anélkül, hogy kötődne a szérumban vagy a vizeletben lévő endopeptidázokhoz,
- anélkül, hogy gátolná az u-PA enzimikus aktiválását, illetve a pro-uPA enzimikus aktiválását,
- izoelektromos pontja 5,5 és 6 között van,

(ii) pufferes öblítést követően a kezelt analitikai segédanyagok egyik sorozatához valamilyen enzimikus aktivátor pufferes oldatát adjuk, ugyanakkor ezzel párhuzamosan a kezelt analitikai segédanyagok egy másik sorozatához csak a pufferoldatot adjuk;

(iii) az így kapott oldatok koncentrációját az önmagában ismert amidolitikus módszer szerint határozzuk meg szintetikus szín-előhívó szubsztráton, standard görbéhez viszonyítva; az u-PA koncentrációját közvetlenül azon mintákból határozzuk meg, amelyeket az (ii) lépésben nem kezeltünk az enzimikus aktivátorral, míg a pro-uPA koncentrációját az enzimikus aktivátorral kezelt, illetve csak a pufferrel kezelt mintákban mért vizsgált anyag koncentrációjának különbsége alapján határozzuk meg.

A találmány szerinti eljárás céljának megfelelően az „analitikai segédanyag” kifejezés vonatkozhat bármilyen analitikai eszközre, mely folyékony reagenseket képes tartalmazni, vagy legalábbis azok hatásának kitéhető lehet. Előnyös példák erre az

üveg vagy műanyag mikrotiteres lemezek vagy kémcsövek, a műanyag lemezek, a nitrocellulóz és a nylon membránok. A legelőnyösebb „analitikai segédanyagok” a polietilén, a polisztirol vagy a polivinil-klorid mikrotiteres lemezek vájaitai képviselik.

Azóta, hogy megjelent C. Milstein és G. Köhler [Nature, 256, 495–497 (1975)] áttörő jelentőségű munkája a monoklonális antitesteket termelő sejt-hidridekről, az u-PA-val szembeni monoklonális antitesteket is leírták. A következő irodalmi közlemények számoltak be például urokinázzal (u-PA) szembeni antitestekről:

- 896.253. számú belga szabadalmi leírás,
- Bioscience Reports 3, 373–379 (1983),
- Thromb. Haemostas. (Stuttgart) 49, 24–27 (1983),
- 0084344. számú európai közrebocsátási irat,
- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 110–114 (1984),
- Biochemistry, 21, 6410–6415 (1982),
- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3720–3723 (1982).

A találmány szerinti eljárás során történő felhasználása esetén a monoklonális antitest antigén iránti affinitásának 10^{-6} -nál nagyobbak kell lennie, előnyösen a Tsapis és munkatársai által leírt módszerrel [Eur. J. Biochem. 64, 369 (1976)] mérve, a fenti körülmények között az affinitás 10^{-7} és 10^{-10} közé esik.

Különösen előnyös, a találmány szerinti eljárás során alkalmazható monoklonális antitest az 5B4-nek nevezett monoklonális antitest, mely a következő tulajdonságokkal jellemezhető:

- a) az IgG1 osztályba tartozik;
- b) affinitási állandója $1,42 \times 10^7$ l/mól, előnyösen a Tsapis és munkatársai által leírt módszerrel [Eur. J. Biochem. 64, 369 (1976)] mérve;
- c) specifikusan köti az u-PA nagy molekulatömegű (54000 D) formáját, illetve annak prekursorát (azaz a pro-uPA-t) anélkül, hogy megkötné a kis molekulatömegű (33000 D) formát, illetve az u-PA — szérumban vagy vizeletben lévő — tromboplasztin szennyeződését;
- d) megköti az A-lánc 18000 D-os amino-terminals fragmentjét;
- e) nem csökkenti az u-PA enzimikus aktivitását;
- f) nem gátolja a pro-uPA enzimikus aktiválását;
- g) izoelektromos pontja 5,75.

Laemmli U. K. és munkatársai [Nature 227, 680, (1970)] u-PA és pro-uPA SDS-poliakrilamid-gél-elektroforézis (SDS-PAGE-t) végeztek redukáló és nem redukáló feltételek között. Salerno G. és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 110 (1984)] immunblot vizsgálatokat végeztek, lényegében a fent leírtak szerint. Az immunreakciók során tiszta 5B4 típusú monoklonális antitestet, anti-uPA-t és szövet-ellenes PA antiszérumot alkalmaztak.

Az 5B4-es monoklonális antitest immunblot képe interakciókra utal a nagy molekulatömegű u-PA-val és a nagy molekulatömegű u-PA A-láncából származó proteolitikus fragmenttel (18000). Ez arra mutat, hogy az epitópoknak az A-láncon kell lennie.

Az a tény, hogy interakció nem áll fenn a nagy molekulású u-PA-nak β -merkaptó-etanolal történő redukálásakor, azt jelzi, hogy a redukálószer okozta szerkezeti változások tönkreteszik az epitópot.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott 86/01411. sz. PCT. szerinti közzétételi iratban leírt monoklonális antitestet a „nem-szekretáló” típusú egér mieloma sejtek — azaz olyan mieloma sejtek, melyek nem szekretálnak immunglobulinokat — és az előzetesen u-PA-val immunizált egér lépsejtek szomatikus sejt-fúziójával nyerjük.

Röviden, Balb/c egereket immunizálunk erősen tisztított, 54000-es molekulatömegű u-PA-val, majd az eltávolított lépsejteket olyan nem-szekretáló mieloma sejtekkel egyesítjük, melyek bizonyos genetikai defektusokban szenvednek. E genetikai defektusok képtelenné teszik a sejteket arra, hogy egy bizonyos táptalajon túlélést mutassanak, ami igen hasznos a hibrid-sejtet ezt követő izolálása szempontjából. Példaként említhetjük az ilyen sejt-vonalakra az X63-Ag8653-as sejt-vonalat, amelyet Kearney és munkatársai írtak le (J. Immunol. 123, 1548–1550/1979/), és amely a szakemberek számára ismert és elérhető.

Az ilyen mieloma-sejt-vonalak általában számos tudományos intézményen keresztül beszerezhetők, például a következő helyekről: The Salk Institute, Cell Distribution Center, P.O. Box 1809, San Diego, California 92112 és Institute for Medical Research, NIGMS Cell Repository, Copewood and Davis Streets, Camden, New Jersey 08103. A sejtek egyesítését poli-etilén-glikol, előnyösen poli-etilén-glikol(PEG) 6000 jelenlétében végezzük.

Erősen tisztított 54000-es u-PA (nagy molekulatömegű u-PA) számos kereskedelmi forrásból beszerezhető. Előnyösen az erősen tisztított u-PA készítmény titere nemzetközi egységekben kifejezve (NE), valamint a fibrinolitikus/észterolitikus aktivitás aránya magas, a tromboplasztin szennyeződés pedig igen kis mennyiségű vagy gyakorlatilag hiányzik. Előnyös, erősen tisztított u-PA a PER-SOLV^R (Gruppo Lepetit S.p.A.) márkanéven forgalmazott készítmény, melynek fibrinolitikus aktivitása 100.000 NE/mg-nál magasabb, a fibrinolitikus/észterolitikus aktivitás aránya 1,4-nél nagyobb, nyulakban 20000 NE/kg-nál magasabb dózisokban is pirogénmentes és 200 NE/ml-es plazma-koncentrációnál nincs koaguláns aktivitása.

Az immunizációs sémában előnyösen kis dózisu-PA adása szerepel. Az egyik jellegzetes immunizációs séma szerint először kis dózisu, erősen tisztított 54000-es molekulatömegű u-PA (120.000 NE/mg; körülbelül 10 μ g) adunk egereknek i.p., komplett Freund-adjuvánsban, 60 nappal az egyesítés előtt, majd egy második i.p. injekció során ugyanazon mennyiséget inkomplett Freund-adjuvánsban, 30 nappal az egyesítés előtt, végül ugyanazon mennyiséget adjuk be 5 nappal az egyesítés előtt, hirtelen, lökesszerű i.v. injekció formájában.

Csak azon állatoknak adjuk be ezt a végső, lökesszerű injekciót és csak azok kerülnek további feldolgozásra, amelyeknek az egyesítés előtt 10 nappal magasabb az anti-u-PA antitest titerük

1:10.000-nél.

A lépsejteket eltávolítottuk, és a lépsejteket körülbelül 10^8 az 5×10^7 sejthez arányban egyesítjük a mieloma sejtekkel. A fúzió után a sejteket megfelelő táptalajon, például 10% főtájis borjúsérumot tartalmazó, Dulbeco-féle módosított Eagle-táptalajon tenyésztjük, és az egyesített sejteket hipoxantin, aminopterin, timidin (HAT) táptalajon szelektáljuk. A sejttenyészetek felülúsztóit ELISA módszerrel, azaz peroxidázzal jelzett, egér ellen termelt immunglobulinos „hagyományos” antisérummal vizsgáljuk, anti-u-PA antitestek szempontjából. Az így azonosított anti-u-PA monoklonális antitestek tisztítása ioncserélő kromatográfia vagy affinitásos kromatográfia segítségével végezhető, urokináz-agaróz oszlopon, míg a kapott termék homogenitásának megállapítására a gél-elektroforézis az alkalmas eszköz. Ezen anti-u-PA monoklonális antitest készítményeket ezután osztály-specifitás és az agarózon immobilizált antigénre vonatkozó affinitási állandó szempontjából értékeljük. Az osztály-specifitást az Outcherlony-féle kettős immundiffúziós technikával vizsgáljuk (Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26, 507/1949/); az affinitási állandót pedig előnyösen Tsapis és munkatársai módszere szerint végzett egyensúlyi kötési kísérletek segítségével határozzuk meg (Tsapis A., Rogard N., Alfsen A., and Nihaesco C. Eur J. Biochem. 64, 369/1976/). Ezen kísérletekben lényegében tiszta, előzetesen foszfáttal pH = 7,2-re pufferolt sóoldatban dializált monoklonális antitestek növekvő koncentrációit adtuk hozzá az urokinázt hordozó, azaz például u-PA-agaróz matrixhoz. A nem kötött antitest koncentrációját spektrofotometria segítségével határoztuk meg, a kötött antitest koncentrációt pedig az összes hozzáadott antitesttől való különbség alapján számítottuk ki. A kötési adatokat az ismert statisztikai módszerek, azaz a G.Scatchard által leírt (Ann. N. Y. Acad. 51, 660–672/1949/) eljárás szerint értékeltük.

Az analitikai segédanyagoknak a monoklonális antissal vagy a hagyományos antisérummal való bevonása úgy történik, hogy kapcsolatba hozzuk az antisérum antitest hígításának oldatával, amelyben az antitest mennyisége sokkal nagyobb a meghatározandó antigén mennyiségénél. Az esetleg be nem vont felszint oly módon telítjük, hogy nem-interferáló fehérjeoldatot — például bovin szérum albumint — adunk hozzá, feleslegben.

Bevonás után az analitikai segédanyagot rázásal szárítjuk, és körülbelül 4 °C-on tároljuk a felhasználásig.

Előnyös analitikai segédanyag a poli-vinil-klorid mikrolemez, például a Falcon Microtest III típusú rugalmas vizsgálati lemez (Bevton-Dickson, USA), amelyen minden egyes vajat 0,5 μ g/ml–50 μ g/ml 5B4-es monoklonális antitest oldattal érintkeznek.

Az „enzimatisz aktivátor” azon ismert anyagok egyike, melyek képesek a pro-uPA-nak (egyetlen lánccú, enzimatisz inaktív zimogén) u-PA-vá (kettős lánccú aktív enzim) történő átalakítására.

A pro-uPA említett enzimatisz aktivátoraira példák a tripszin-szerű endopeptidok, mint például a plazmin, a tripszin, a trombin és a kallikrein.

Ezek közül a plazmin az előnyös aktivátor, mely

szelektíven hasítja fel a peptidláncot a 158-as helyzetben lévő lizin (Lys) csoport környezetében (I. kasai et al., J. Biol. Chem., 22, 12383–12389/1985). Ez az enzimatisz aktiválás a pro-uPA-t olyan aktivált formává alakítja át, melynek enzimatisz aktivitása nagyon hasonló az u-PA-hoz, és legalábbis a plazmin aktiválás esetében, alapos bizonyíték van arra, hogy ez az enzimatisz aktív termék valóban az u-PA.

Az u-PA-ra vonatkozó „amidolitikus vizsgálatok” ismertek a szakterületen.

A találmány szerinti eljárás szempontjából a kromogén szubsztátok „hidrolízisén” alapuló amidolitikus vizsgálatok az előnyösek.

Sok különböző, ilyen típusú u-PA szubsztát ismert a szakterületen és szerezhető be a kereskedelmi forgalomban. Ezen eljárás során az egyik előnyös szubsztát egy szintetikus oligopeptid származék, a piro-glutamil-glicil-arginil-p-nitro-anilid (piro-Glu-Gly-Arg-pNA), melyet a Kabi cég (Svédország) S2444 jelzéssel hoz forgalomba.

Az u-PA és/vagy a pro-uPA „standard” készítményei is ismertek, és olyan tisztítási eljárással is előállíthatók, melynek során affinitásos segédanyagon immobilizált 5B4-es monoklonális antitestet alkalmaznak.

A validitási kísérletek azt mutatják, hogy a találmány szerinti eljárás vizsgálaton belüli pontossága (VK% = variációs együttható) 3–7% között változik, míg a vizsgálatok közötti pontosság (VK%) általában 5–10% között van. Az analitikai visszanyerés 90–110% között változik.

Az alkalmazási tartomány 1–100 NE/ml u-PA, előnyösen 1,5–55 NE/ml.

A pro-uPA koncentrációját az enzimatisz aktiváció után mért, megfelelő, ekvivalens u-PA nemzetközi egységekben (NE)/ml-ben fejezzük ki.

A találmányt az alábbi példákkal és a találmány szerinti készítmények leírásával szemléltetjük.

1. példa

Immunadszorpció amidolitikus vizsgálat

Mind u-PA-t, mind pedig pro-uPA-t tartalmazó A431-es sejtfelülszöveteket (lásd a 3. készítmény) kétszeresre hígítottunk 60 g/l bovin szérum albumint (BSA), valamint 0,1%-os Tween 20-at — poli-oxi-etilén-szorbítán-mono-laurátot — tartalmazó, 0,3 M nátrium-klorid és pH = 7,3-as 0,1 M nátrium-foszfát puffer oldatával. A referencia standardot (nagy molekulatömegű u-PA) különböző koncentrációkra hígítottuk (52,5, 26,25, 13,12, 6,562, 3,281 NE/ml), 0,15 M nátrium-klorid és 0,05 M pH = 7,3-as nátrium-foszfát puffer (PBS = phosphate

buffer solution) oldatában, mely 0,05% Tween 20-at, 30 g/l BSA-t és 50% Dulbecco-féle módosított Eagle táptalajt (DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium) Flow Laboratories, USA) tartalmaz. Valamennyi standard és minta azonos mennyiségeit (200 µl-t) helyeztük triplikátumban a 8. készítményénél leírtak szerint 5B4-gyel bevont mikrolemez különböző vágataihoz. Az oldatok érintkezését két órán keresztül szobahőmérsékleten, nedves, fedett dobozban biztosítjuk. Ezután a lemezt 8-szor átmoszuk oly módon, hogy kiürítés után megtöltjük 0,05% Tween 20-at tartalmazó foszfát puffer oldattal (PBS-T puffer), majd rázásal szárítjuk. A teljes amidolitikus aktivitás meghatározása céljából (u-PA + pro-uPA) vajatónként 200 µl-nyi 38 mM nátrium-klorid, 50 mM pH = 8,8-as 10 g/l BSA-t tartalmazó TRIS-pufferben („S2444 puffer”) oldott 10 µg/ml-es plazmin oldatot adunk a vajatokhoz. Azon vajatokhoz, ahol az u-PA-t kellett meghatározni, csak „S2444 puffert” adtunk. Egy órán át szobahőmérsékleten végzett inkubálás után a plazmin által katalizált reakciót 0,35 mg/l desztillált vizes aprotinin oldat vajatónként 25 µl-énc hozzáadásával leállítjuk. Az oldatot minden egyes vajatban alaposan összekeverjük, sokcsatornás pipetta segítségével, és 5 percen keresztül szobahőmérsékleten állni hagyjuk. Ezután a S2444-es jelű szintetikus szubsztát oldat (Kabi, Svédország) — 1,5 mg/l desztillált vízben oldva — 25 µl-ét helyeztük 1–1 vajatba, és a fentiek szerint alaposan összekeverjük. A szín előhívását 37 °C-on 2 órán keresztül lehetővé tesszük, és 405 nm-en Titertek Multiskan Photometer (Flow Laboratories, USA) segítségével olvassuk le. A minták u-PA koncentrációját és az u-PA + pro-uPA összkoncentrációját úgy kaptuk meg, hogy a nem kezelt, illetve a plazminnal kezelt vajatok optikai sűrűségét interpoláljuk a standardokkal felvett dózis-hatás görbén. A pro-uPA koncentrációját a „teljes” koncentráció és az így nyert u-PA koncentráció közötti különbség segítségével számítottuk ki.

Az I., II. és III. táblázat egy reprezentatív vizsgálat eredményeit mutatja be.

Részletesebben, az I. táblázat a fenti példában leírt vizsgálatot végzett u-PA és pro-uPA mérések vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti pontosságát mutatja be; a II. táblázat a fenti példában leírt vizsgálat szerint előállított A431-es sejtfelülszövetek adott ekvimoláris u-PA és pro-uPA keverék analitikai visszanyerését szemlélteti, a III. táblázat pedig a fenti meghatározásnak megfelelően mért u-PA és pro-uPA koncentrációkat mutatja be, a vizsgált minta különböző hígításai esetén.

I. táblázat

Vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti pontosság A431-es sejtfelülszövetben (n = 8)

	Átlag	u-PA, NE/ml SD	VK%	Átlag	pro-uPA, NE/ml SD	VK%
Vizsgálaton belüli						
A	1,59	0,10	6,780	13,6	0,93	6,860
B	7,7	0,35	4,284	20,7	1,518	7,329
Átlag						7,090

I. táblázat folytatása

Vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti pontosság A431-es sejt-felülszoban (n = 8)

	Átlag	u-PA, NE/ml SD	VK%	Átlag	pro-uPA, NE/ml SD	VK%
Vizsgálatok közötti						
A	1,69	0,26	15,540	13,1	0,945	7,190
B	8,25	0,62	7,590	21,0	1,819	8,647
C	5,43	0,308	5,663	25,0	1,987	7,940
D	1,61	0,174	10,837	29,37	1,603	5,461
E	nm	–	–	26,85	2,419	8,970
F	nm	–	–	27,1	2,91	10,700
G	nm	–	–	3,84	0,384	9,990
Vizsgálaton belüli						
H	nm	–	–	3,3	0,28	8,760
I	nm	–	–	4,40	0,48	10,908
L	3,2	0,178	5,557	8,66	0,582	6,772
Átlag			9,037			8,529

n = 8 minden esetben

nm = nem mérhető

SD = standard deviáció

VK% = variációs koefficiens (%)

IIa) táblázat

A431-es sejt-felülszókhoz hozzáadott ekvimoláris u-PA és pro-uPA keverék analitikai visszanyerése

Hozzáadott ^{b)}	Várt ^{c)}	Amidolitikus aktivitás ^{a)} , NE/ml Talált	T/V ^{d)} , %
300	398,1	459,6	115,4
150	248,1	290,2	104,5
75	173,1	175,5	101,4
37,5	135,6	107,5	107,5
18,75	116,85	115,8	99
Összaktivitás		Átlag	105,5

a) S2444 hidrolízissel meghatározva, plazmin kezelést követően

b) Ekvimoláris u-PA és pro-uPA keverék formájában

c) Kezdeti koncentráció az A431-es sejt-felülszóban 98,1 e/ml

d) T/V = talált/várt

IIb) táblázat

A 431-es sejt-felülszóhoz hozzáadott u-PA és pro-uPA analitikai visszanyerése

"A" minta Hozzáadott u-PA (NE/ml)	Visszanyerés (%)	"B" minta Hozzáadott pro-uPA A(NE/ml)	Visszanyerés (%)
64,5	100,5	18,8	103,0
23,5	99,6	9,3	89,1
11,6	92,9	4,6	93,7

IIb) táblázat folytatása

A 431-es sejt-felülszóhoz hozzáadott u-PA és pro-uPA analitikai visszanyerése

"A" minta Hozzáadott u-PA (NE/ml)	Visszanyerés (%)	"B" minta Hozzáadott pro-uPA A(NE/ml)	Visszanyerés (%)
5,8	89,9	2,3	102,2
2,9	93,0	—	—
Átlag	95,2	Átlag	96,9

A kezdeti u-PA koncentráció nem volt mérhető sem az „A”, sem a „B” mintában;
a pro-uPA kezdeti koncentrációja 42,56 NE/ml volt az „A” mintában, a „B” mintában pedig 5,32 NE/ml.

III. táblázat

u-PA és pro-uPA koncentrációk a 431-es sejt-felülszókban, különböző hígítások esetén

Hígítási arány	Várt	u-PA, NE/ml Talált	T/V (%)	Várt	pro-uPA, NE/ml Talált	V/T (%)
1,5	31,89	30,57	95,2	53,36	56,03	105
2,25	31,89	31,89	100,0	53,36	56,19	105,3
3,375	31,89	34,1	107,1	53,36	40,03	91,9
5,0625	31,89	33,78	105,9	53,36	58,1	108,8

A fenti kísérletek megismétlése esetén — vizelet vagy u-PA-t és/vagy pro-uPA-t tartalmazó fermentációs bakteriológiai táptalaj felhasználásával — lényegében azonos pontosságú, megbízhatóságú és érzékenységre eredményeket kaptunk.

Pontosabban, a validitási kísérletek azt mutatják, hogy a vizsgálaton belüli pontosság (VK%) 3–7% között, a vizsgálatok közötti pontosság (VK%) pedig általában 5–10% között változik. Az analitikai visszanyerés 90–110%.

A vizsgált anyag alkalmazási tartománya 15 mg/ml és 100 mg/ml közé esik.

1. készítmény

5B4-es anti-u-PA monoklonális antitest előállítás

a) Anti-u-PA monoklonális antitestek előállítása

Erősen tisztított 54000 dalton molekulatömegű 120.000 NE/mg aktivitású u-PA-val (PERSOLV[®] RICHTER) immunizálunk 7 hetes nőstény Balb/c egereket. Ezen u-PA komplett Freund-adjuvánsban oldott 10 µg-ját injiciáljuk az állatok peritoneumába, 60 nappal a fúzió előtt. 30 nappal később újabb 10 µg-t adunk be az egereknek. A fúzió előtt 10 nappal hagyományos ELISA módszerrel mérjük az anti-u-PA antitest-titert, a farokvénából vett vérmintákban, és 5 nappal az egyesítés előtt egy utolsó 10 µg-os, hirtelen, lökésszerű u-PA injekciót adunk be intravénásan azon állatoknak, melyek antitest titere 1:10000-nél magasabb. Ezután a fúzió napján kivesszük az állatok lépét, és a lépsejteket (körülbelül 1x10⁸) 50%-os PEG 6000-ben levő, 5x10⁷ X63-Ag8653-as egér mieloma sejtekkel egyesítjük.

A lényegében C.Milstein és G. Köhler módszere szerint végzett fúzió után a sejteket 10%-os főtális

borjuszérummal és HAT táptalajjal (0,1 mM hipoxantin, 0,25 mM aminopterin, 0,017 mM timidin, Flow Laboratories) kiegészített, Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalajban reszuszpendáljuk, és 5 különböző — egér makrofágokat tartalmazó — Costar lemezre (adagoló réteg) helyezzük őket.

A HAT táptalajt 3 naponként cseréljük, és a fúziót követő 10. nap után a felülszóhat 2–3 naponként ELISA immunassay segítségével vizsgáljuk, anti-u-PA monoklonális antitestek jelenléte szempontjából.

b) Anti-u-PA monoklonális antitestet termelő hibridomák szűrése ELISA módszerrel

A Perlman-módszer (Immunochemistry, 8, 873 /1971/) módosítása szerint rugalmas, 96 vájatos mikrotiteres lemezeket (Dynatech), vájatonként 50 µl pH = 7,2-es foszfát-pufferes sóoldatban és 0,5 M nátrium-kloridot tartalmazó, pH = 7-es 0,05 M-os nátrium-foszfátban oldott, 20 µg/ml-es u-PA-val vonjuk be, és 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk. 0,05%-os Tween 20-as foszfát pufferes sóoldattal végzett alapos mosás után a vájatosokat 3%-os bovin szérumból albumin foszfát-pufferes sóoldattal telítjük 3 órán keresztül, szobahőmérsékleten, a nem-specifikus kötést elkerülése érdekében. Gondos mosás után 50 µl felülszó hibridoma tenyészetet (vagy aszcites-folyadék azonos mennyiségét) adjuk hozzá a vájatosokhoz, és 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten reagáltatjuk őket egymással. A lemezeket ezután mossuk és 1:1000 hígítású torma-peroxidázal (PI61, DAKO) konjugált, egér ellen termelt nyúl Ig-nal szobahőmérsékleten, 90 percen keresztül inkubáljuk. Alapos mosást követően a lemezeket vájatonként

200 μ l 1 mg/ml-es — 0,1 M pH = 5-ös citrát-pufferben és 1,7 mM H₂O₂-ben oldott — o-fenilén-diamin (SIGMA) kromogénoldattal inkubáljuk. A szín előhívása 20 percen belül megtörténik. Ezután 492 nm-en leolvassuk az optikai sűrűséget vakpró-
bával szemben, antigén és antitest nélkül. Azon
vájatokat tekintjük pozitívnak, amelyekben a szín
intenzitása 4-szer magasabb a vakpróbánál.

c) *Anti-u-PA-t termelő hibridomák klónozása*

Anti-u-PA antitestet termelő hibridomákat ki-
válogatjuk, meghatározott hígítással klónozzuk, tö-
megkultúrában tenyésztjük, és előzetesen 0,5 ml
PRISTAN^R-rel (2,6,10,14-tetra-metil-pena-dekán,
Aldrich) kezelt Balb/c egerek peritoneumába inji-
ciáljuk. 15 nappal később összegyűjtjük az ascites-
folyadékot. Az anti-u-PA monoklonális antitestek
koncentrációja a 10–20 mg/ml-es tartományba esik.
Protein-A Sepharose vagy urokináz-Sepharose af-
finitásos kromatográfia segítségével tisztítjuk őket.

d) *Az anti-u-PA monoklonális antitestek tisztítása
Sepharose^R-u-PA-n végzett affinitásos kromatog-
ráfiával*

CNBr-dal aktivált nagy molekulatömegű Sepha-
rose és erősen tisztított u-PA (120.000 NE/mg)
reagáltatásával Sepharose-u-PA konjugátumot ké-
szítünk. A kapcsolódás hatékonysága körülbelül
20 mg u-PA, a duzzasztott gél 1 ml-ére számítva. A
fentiek szerint nyert ascites folyadékot — termelő
hibridománként 1 ml-t — viszünk fel a Sepharose-
urokináz affinitásos oszlopra (1,6 cm x 15 cm),
melyet pH = 8,0-as, 0,01 M nátrium-foszfát puffer-
ben előzetesen ekvilibráltunk. Ugyanazon pufferrel
végzett átöblítést követően a szelektíven adszorbe-
ált anti-urokináz monoklonális antitesteket pH =
3,0-as, 0,1 M ecetsavval eluáljuk. Az ellenanyagot
tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, és PSDE
09005-ös Millipore membránon végzett ultrafiltrá-
lás segítségével koncentrálnak, majd felhasználásig
fagyaszttva tároljuk.

e) *A monoklonális antitest készítmények tisztasá-
gának és homogenitásának ellenőrzése gél-elektrofo-
rézissel*

A fentiek szerint nyert monoklonális antitesttel
SDS-PAGE-t (nátrium-dodecil-foszfát poli-akri-
lamid-gél-elektroforézist) végeztünk, a W.K.La-
emmli által leírt módszer szerint (Nature 227, 680,
1970). Csak a nehéz és könnyű IgG láncoknak meg-
felelő csíkok látszanak, ami arra utal, hogy a fenti
eluátum tiszta immunglobulinokat tartalmaz.

f) *Az affinitási állandó meghatározása*

PH = 7-es foszfát-pufferes sóoldatban szusz-
pendált 20%-os Sepharose-u-PA azonos mennyi-
ségeit (valamennyi 0,5 ml) adjuk hozzá tisztított
anti-u-PA monoklonális antitest készítmények nö-
vekvő koncentrációihoz (e készítmények azonosak
a fenti d) pont szerint előállítottakkal, pH = 7-es
foszfát-pufferes sóoldatban dializálva. A mintákat
két órán keresztül szobahőmérsékleten „vég a vég
felett” forgatjuk. A kontrollokhoz nem adtunk
gyantát.

A nem-kötött antitest koncentrációját spektro-

fotometriás módszerrel határoztuk meg 280 nm-en
(E^{1%}_{1 cm} = 14), míg a kötött antitest koncentrációt
a hozzáadott antitest összmenyiségétől való kü-
lönbség alapján számítjuk ki. Az összes kötési ada-
tot Scatchard módszere (Ann. N. Y. Acad. Sci., 51,
660–672, /1949/) szerint dolgozzuk fel. Az 5B4 el-
nevezésű monoklonális antitest affinitási állandója
1,42 x 10⁷ l/mól.

2. készítmény

Az anti-u-PA immunglobulin (IgG-k) megtisztí-
tása anti-urokináz hagyományos antiszérumtól

Anti-urokináz nyúl antiszérumot állítottunk elő
a szokásos immunizációs eljárások szerint, erősen
tisztított 54000-es molekulatömegű u-PA felhasz-
nálásával (körülbelül 120.000 NE/mg).

Részletesebben, egészséges fehér, New Zealand
nyulakat immunizálunk 500 μ g, komplett Freund-
adjuvánsban lévő, erősen tisztított 54000-es mole-
kulatömegű u-PA-val (körülbelül 120.000 NE/mg).
Az antigén azonos mennyiségét — inkomplett Fre-
und-adjuvánsban — adjuk be, hirtelen lökésszerű
injekciók formájában, 4, 6 és 8 hét elteltével. Az
állatoktól hetente vért veszünk, és az anti-u-PA
antitest titereket anti-u-PA antiszérum enzim —
immunassay segítségével határozzuk meg. 12 hét
után az állatokat teljesen elvéreztetjük, és az IgG
immunglobulin frakciót affinitásos kromatográfiá-
val tisztítjuk, protein-A Sepharose-on. A kapott
antiszérum 1 ml-ét protein-A Sepharose oszlopra
viszük fel (oszlopméret 1,6 cm x 4 cm), melyet
előzetesen 0,1 M pH = 8-as nátrium-foszfát puffer-
rel, 20 ml/órás áramlási sebességnél ekvilibráltunk.
Ugyanazon pufferrel végzett mosás után az IgG-ket
pH = 3-as 0,1 M ecetsavval eluáljuk. 2 ml-es frak-
ciókat gyűjtünk és az IgG-k jelenlétét enzim-immu-
nassay segítségével ellenőrizzük. Az IgG-ket tartal-
mazó frakciókat pH = 7,2-re állítjuk be, és felhasz-
nálásig –20 °C-on fagyaszttva tároljuk.

3. készítmény

A431-es sejt-felülszóró előállítása

A431-es humán epidermoid karcinoma sejteket
tenyésztünk, előnyösen Fabrian és munkatársainak
módszere (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 565,
1977) szerint. Pontosabban, az A431-es sejteket
10% főtális borjúsérumot (Flow Laboratories),
100 E/ μ l penicillint, 100 μ g/ml streptomycint (Flow
Laboratories) és 2 M glutamint (Flow Laboratori-
es) tartalmazó Dulbecco-féle módosított Eagle-
táptalajon tenyésztjük egybeolvadásig, műanyag te-
nyésztőedényekben, 150 cm²-es tenyésztési felüle-
ten (NUNC). Ezután a felülszórókat összegyűjtjük,
centrifugáljuk a törmelék eltávolítása céljából, és
–80 °C-on tároljuk proteáz inhibitor (aprotinin,
10 g/ml) jelenlétében, a felhasználásig.

4. készítmény

5B4-es anti-u-PA monoklonális antitest immo-
bilizálása aktivált agarózon

Aktivált agarózt (kereszt-kötésű, 10 atom
hosszúságú összekötő karokkal kapcsolt agaróz
szemcsék N-hidroxizukcinimid aktív észter-szár-
mazéka; Affi-gél 10^R, Bio-rad Inc., 14 g, nedves)
3-szoros térfogatú izopropil-alkohollal és 3 térfo-

gatnyi hideg desztillált vízzel mossuk át, 20 percen belül. A gélt ezután reszuspendáljuk pH = 8-as, 0,1 M nátrium-bikarbonát pufferben (végső térfogat = 20 ml). Erősen tisztított, a fentiek szerint előállított, 0,1 M, pH = 8-as nátrium-bikarbonát pufferben oldott (9,7 ml) 5B4-es monoklonális antitestet adunk hozzá a gél szuszpenzióhoz. 4 óra múlva szobahőmérsékleten 1 M vizes etanolamin-hidrokloridot (1,5 ml) adunk hozzá pH = 8-on, a gyanta nem-reagált észtercsoportjainak blokkolása céljából. A blokkoló reakció szobahőmérsékleten egy órán belül teljesen végbemegy. A gélt ezután oszlopra visszük fel, a kötő puffer (pH = 8-as 0,1 M vizes nátrium-bikarbonát) 10-szeres térfogatával mossuk, majd 0,1 M vizes ecetsavval, ezt követően pedig 1 M vizes nátrium-kloridot tartalmazó 0,1 M vizes ecetsavval, s végül 0,5 M vizes nátrium-kloridot tartalmazó pH = 7-es 0,05 M-os vizes nátrium-foszfát pufferrel. A kötés hatékonyságát a felülúszó mintákban spektrofotometriás módszerrel vizsgáljuk 280 nm-en, a reakció előtt és után. E mintákat a vizsgálat előtt pH = 2-re állítottuk be, hogy kiküszöböljük az N-hidroxi-szukcinimid interferenciát a leolvasások során.

A gyanta 1 ml-ére vonatkoztatva 2,5–4 mg 5KB4-es monoklonális antitestet immobilizáltunk.

5. készítmény

a) Az 5B4-Agaróz adszorbens kapacitásának megállapítása

Az 5B4-agaróz maximális kapacitását „tisztá” és tisztítatlan u-PA készítményeken állapítottuk meg. 5B4-agaróz oszlopot (1,6x10 cm) ekvilibrálnak 0,5 M NaCl-ot tartalmazó 0,05 M pH = 7-es nátrium-foszfát pufferben, majd „tisztá” u-PA-t (120.000 NE/mg) viszünk fel rá, míg az észterolitikus aktivitás észlelhetővé nem válik a kifolyó anyagban. Az oszlopot ezután az ekvilibráló pufferrel mossuk, és az enzimet deszorbeáljuk azáltal, hogy 1 M NaCl-os 0,1 M ecetsavval eluáljuk. A kötött frakcióban visszanyert összaktivitást tekintjük az oszlop maximális kapacitásának.

Az u-PA esetében (120.000 NE/mg) az 5B4-agaróz kapacitása 216.000 NE/ml.

Ugyanezen kísérleteket megismételtük tisztítatlan u-PA készítmény (700 NE/mg) felhasználásával, s ekkor 174.000 NE/ml-es kapacitást nyertünk.

b) A pro-uPA, nagy molekulatömegű -u-PA, kis molekulatömegű -u-PA és a 18000-es u-PA amino-terminális fragmens immunadszorpciója 5B4-agarózon

Tisztított nagy molekulatömegű u-PA-t inkubálunk 8 órán keresztül 0,2 M NaCl-ot tartalmazó

1 ml 50 mM-os, pH = 8-as nátrium-foszfát pufferben. Nagy molekulatömegű u-PA-t, kis molekulatömegű u-PA-t és 18000-es proteolitikus fragmenst 4:4:2 arányban nyerünk. E termékeket gélszűrés segítségével választjuk szét és izoláljuk keresztkötésű, ellenőrzött porusú poli-dextránon (Sephadex^R G 100, szuper-minőségű; 1,5x100 cm); ezt 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 5 mM pH = 4-es nátrium-foszfát pufferrel ekvilibrálnak, és 3 ml/óra áramlási sebességgel ugyanazon keverékkel eluáljuk.

Ezt követően összegyűjtjük az egyetlen terméket tartalmazó eluált frakciókat. 0,1 tf% Tween^R 20-at tartalmazó pH = 7,5-ös foszfát-pufferes sóoldatban lévő (a fent leírtak szerint készített) 5B4-agaróz skaláris mennyiségeinek szuszpenzióit adjuk hozzá 0,5 ml ugyanazon pufferben oldott pro-uPA nagy molekulatömegű-u-PA, kis molekulatömegű-u-PA, illetve 18000-es amino-terminális fragmens u-PA-oldatokat — valamennyit 250 µg/ml mennyiségben — tartalmazó kémcsövekhez, és a végső térfogatot ugyanezen pufferrel 1,5 ml-re egészítjük ki.

Valamennyi mintát forgatjuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül, majd 2000 rpm-en 5 percig centrifugáljuk. A nem-kötött anyagot úgy határozzuk meg, hogy a felülúszók optikai sűrűségét 280 nm-en leolvassuk, a kötött anyagot pedig a hozzáadott összes anyagtól való különbsége alapján határozzuk meg.

Ezen kísérletekben a pro-uPA, a nagy molekulatömegű u-PA és a 18000-es amino-terminális fragmensnek több mint 90%-a kerül immunadszorpció révén az 5B4-agarózra, míg a kis molekulatömegű-u-PA nem immunadszorbeálódik.

6. készítmény

Az u-PA tisztítása 5B4-agarózon mért immunafinitás segítségével

Egy kromatográfiás oszlopot (1,6x9 cm) a 2. példa szerint készített 5B4-agaróz immunadszorbenssel töltünk meg és 0,5 M vizes nátrium-kloriddal és 0,05 M pH = 7-es vizes foszfát pufferrel ekvilibrálnak. Ezután a tisztítatlan vizelet koncentrátumot 60 ml óránkénti áramlási sebességgel felvisszük az oszlopra. Az ekvilibráló pufferrel végzett átmosás után az u-PA-t 1 M vizes nátrium-kloriddal és 0,1 M vizes ecetsavval eluáljuk.

Az u-PA-t tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, semlegesítjük és mélyhűtéssel szárítjuk.

A visszanyert u-PA specifikus aktivitása mindig nagyobb 130.000 NE/mg-nél

A mennyiségi adatokat a következő táblázat tartalmazza:

IV. táblázat

Frakció	Térfogat ml	Teljes fibrinolitikus aktivitás ^{a)} NE	%	Teljes észterolitikus aktivitás ^{b)} EE	Összfehérje mg aktivitás	Specifikus aktivitás NE/mg	Tisztítási faktor	NE/EE
Tisztítatlan kivonat	186	1772394	100	897	2007	883	–	–
Nem-kötött frakció (A)	270	141791	8	164	–	–	–	846
Kötött frakció (B)	56	1374240	77,5	683	9,52	144353	163	2012

a) meghatározva lényegében az 1979-es Addendum of the British Pharmacopoea-ban leírt módszer szerint

b) meghatározva lényegében a Sherry és munkatársai által leírt módszer
(J. Lab. Clin. Med., 64, 145, 1964) szerint, ALME-n

V. táblázat

Tromboplasztinos szennyeződések:	0-alvadás 193 NE/ml-es plazmaértéknél (a National Heart and Lung Institute, USA, szerint a 0-alvadás értéke: 80 NE/ml plazma)
Akut toxicitás egérben:	100.000 NE/kg i.v. dózisban nem toxikus
Szisztémás tolerálhatóság kutyában:	20.000 NE/kg dózis esetén nem volt szignifikáns változás az artériás vérnyomásban

A HPLC analízis során nagy molekulatömegű (54000-es) u-PA jelenléte és kis molekulatömegű (330000-es) u-PA hiánya volt megfigyelhető.

A kapott u-PA tisztaságát nátrium-dodecil-szulfát-poliakril-amidon végzett gél-elektroforézissel is bizonyítottuk. Valóban, ez a vizsgálat is megerősíti, hogy az 5B4-agarózon tisztított u-PA termék lényegében 54000-es molekulatömegű u-PA.

A kísérleteket néhányszor megismételtük — több mint 50 alkalommal — anélkül, hogy az eredmények szignifikánsan változtak volna.

Az oszlopra felvitt fibrinolitikus aktivitás 70–80%-a következetesen kimutatható a kötött frakciókban. Amikor a nem-kötött frakciókat újra felvisszük az oszlopra, az egész aktivitás kimutatható az átáramló folyadékban, ami arra utal, hogy ezen aktivitás nem az u-PA-nak, hanem inkább az u-PA-tól független fibrinolitikus aktivitással rendelkező aspecifikus proteázoknak tulajdonítható.

7. készítmény

A pro-uPA tisztítása

Az 1. készítménynél leírtak szerint előállított 5B4-es oszlopot (1,6x10 cm) 0,1%-os Triton X-100-at (Rohm and Hass) tartalmazó 0,15 M NaCl-dal és 0,5 M pH = 7-es nátrium-foszfát pufferrel ekvibráltuk. Az oszlopra 10 l A431-es sejt-felülszót (3. készítmény) visszünk fel 200 ml óránkénti sebességgel, 4 °C-on, majd az ekvibráló pufferrel átmoszuk. A deszorpciót 0,1%-os Triton X-100-at

40

45

50

55

60

65

tartalmazó 1 M NaCl-dal és 0,1 M ecetsavval végzett eluálással hajtjuk végre. A frakciókat összegyűjtjük és S2444-es szubsztráton vizsgáljuk amidolitikus assay segítségével, plazmával végzett aktiválás előtt és után, a fent leírtak szerint. A pro-uPA-t tartalmazó frakciókat összegyűjtjük. Az összegyűjtött oldatot tovább tisztítjuk, és FPLC-n (Pharmacia, Svédország) végzett ioncserélő kromatográfia segítségével koncentrálnuk, 50 mM pH = 4,0-es nátrium-acetát pufferrel ("A" puffer) ekvibrált Mono S HR5/5-ös kationcserélő oszlop (5x50 cm) alkalmazásával. A mintát kétszeresre hígítjuk desztillált vízzel, és felvisszük az oszlopra. Az ekvibráló pufferrel végzett mosás után a kötött pro-uPA-t eluáljuk só/pH gradienssel (0,3 M „A” pufferben oldott NaCl-tól — pH = 4,0-en — 0,7 M „A” pufferben oldott NaCl-ig — pH = 0,5-ig — lineáris gradiens 50 percen belül, áramlási sebesség: 60 ml/óra, végül 1 M NaCl-ot tartalmazó, pH = 5,0-ös „A” pufferrel). Az eluált frakciókat a fent leírt S2444-en végzett amidolitikus vizsgálat segítségével ellenőrizzük, és a pro-uPA-t tartalmazó frakciókat összegyűjtjük és fagyaszta tároljuk.

A kapott termék (pro-uPA) homogénnek tűnik SDS-PAGE során.

Az SDS-PAGE, a Western-blot vizsgált és a zimográfia azt mutatja, hogy a fentiek szerint tisztított pro-uPA egy körülbelül 48000-es molekulatömegű, egyetlen láncú fehérje, mely immunológiai-lag a vizelet-típusú PA-val rokon és különbözik a

szöveti típusú PA-tól.

Az aktív hely a pro-uPA-ban rejtettnek tűnik, mivel nem figyelhető meg [^3H]DFP (3 -diizopropil-fluoro-foszfát) inkorporáció, sem pedig benzamidin-agarózhoz való kötődés.

Ez a pro-uPA továbbá inaktív az S2444-es szintetikus szubsztráton, a plazmin kezelés azonban az u-PA-hoz hasonló, kettős láncú aktív formává (150.000 NE/mg) alakítja át. Ez az aktivált forma a H^2 -DFP-t a 31500-as nehéz láncba inkorporálja, és a benzamidin-agarózhoz kötődik.

Az A431-es sejtekből a fentiek szerint tisztított pro-uPA amino-terminális szekvenciája (26 aminosav) azonosnak bizonyult a vese-sejtekből izolált pro-uPA-val (J. Biol. Chem. 22, 12383–12389 /1985/).

8. készítmény

A mikrolemezek bevonása SB4-gyel

Poli-vinil-klorid mikrolemezek (Falcon Microtest III-as rugalmas vizsgálólemez; Becton Dickinson and Co., USA), valamennyi vágatát 0,15 M nátrium-kloridban és 0,05 M pH = 7,3-as nátrium-foszfát pufferben (PBS) oldott 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es SB4 oldat 200 μl -ével töltöttük meg. Két órán keresztül szobahőmérsékleten, zárt dobozban végzett inkubálás után a mikrolemezeket 5-ször átmostuk oly módon, hogy kiürítettük és PBS-sel töltöttük meg őket. Ezután mindegyik vágathoz PBS-ben oldott 10 g/l-es vocin szérum albumin (BSA) 250 μl -ét adtuk, és szobahőmérsékleten 2 órán keresztül állni hagytuk, a be nem vont felület blokkolása céljából. Ezután a lemezeket ismét átmostuk PBS-sel, rázással szárítottuk és 4 °C-on tároltuk a felhasználásig.

Lényegében ugyanezen eljárást követve, de a 2. készítménynél leírtak szerint előállított, hagyományos antiszérum felhasználásával antiszérummal bevont, az 1. példa szerinti eljárásban alkalmazható mikrolemezt kaptunk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás humán vizelet-plazminogén aktivátornak (u-PA), zimogénjének (humán vizelet-lazminogén aktivátor prekursor, pro-uPA) vagy ezek keverékének meghatározására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) a vizsgálandó oldatot egy analitikai segédanyaggal hozzuk érintkezésbe, amelynek felülete a következő tulajdonságokkal jellemezhető monoklonális antitesttel van bevonva:

- az IgG₁ osztályba tartozik,
- az antigénhez 10^{-6} – 10^{-11} affinitású,
- specifikusan kötődik a nagymolekulatömegű (54000 D) u-PA-hoz, illetve annak prekursorához (azaz a pro-uPA-hoz) anélkül, hogy megkötné a kismolekulatömegű (33000 D) formát),
- anélkül, hogy kötődne a szérumban vagy a vizeletben lévő endopeptidázokhoz,
- anélkül, hogy gátolná az u-PA enzimes aktivitását, illetve a pro-uPA enzimes aktiválását,
- izoelektromos pontja 5,5 és 6 között van,

(ii) pufferes öblítést követően a kezelt analitikai segédanyagok egyik sorozatához valamilyen enzi-

matikus aktivátor pufferes oldatát adjuk, ugyanakkor ezzel párhuzamosan a kezelt analitikai segédanyagok egy másik sorozatához csak a pufferoldatot adjuk;

(iii) az így kapott oldatok koncentrációját az önmagában ismert amidolitikus módszer szerint határozzuk meg szintetikus szfn-előhívó szubsztráton, standard görbéhez viszonyítva; az u-PA koncentrációját közvetlenül azon mintákból határozzuk meg, amelyeket az (ii) lépésben nem kezeltünk az enzimatis aktivátorral, míg a pro-uPA koncentrációját az enzimatis aktivátorral kezelt, illetve csak a pufferrel kezelt mintákban mért vizsgált anyag koncentrációinak különbsége alapján határozzuk meg.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy műanyagból készült analitikai segédanyagot alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy műanyag mikrotiteres lemezek, kémcsövek vagy lemezek, illetve nitrocellulóz vagy nylon membránok közül kiválasztott analitikai segédanyagot alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy polisztirol, poli-vinilklorid vagy polietilén mikrotiteres lemez analitikai segédanyagot alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan analitikai segédanyagot alkalmazunk, mely a következő tulajdonságokkal jellemezhető monoklonális antitesttel van bevonva:

- az IgG₁ osztályba tartozik,
- affinitási állandója $1,42 \times 10^7$ l/mól, előnyösen a Tsapis és munkatársai által leírt módszerrel (Eur. J. Biochem. 64, 369 /1976/) mérve;
- specifikusan köti az u-PA nagy molekulatömegű (54000 D) formáját, illetve annak prekursorát (azaz a pro-uPA-t) anélkül, hogy megkötné a kis molekulatömegű (33000 D) formát, illetve az u-PA — szérumban vagy vizeletben lévő — tromboplasztin szennyeződését;
- megköti az A-lánc 18000 D-os amino-terminális fragsmáját;
- nem csökkenti az u-PA enzimatis aktivitását;
- nem gátolja a pro-uPA enzimatis aktiválását;
- izoelektromos pontja 5,75.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzimatis aktivátort a plazmin, a trombin, a kallikrein és a tripszin közül választjuk ki.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az amidolitikus reakció során az u-PA meghatározáshoz szfn-előhívó szubsztrátként piroglutamil-glicil-arginil-p-nitroanilidet alkalmazunk.

8. Reagens készlet az 1. igénypontban meghatározott eljáráshoz, *azzal jellemezve*, hogy a készlet tartalmaz:

1. egy analitikai segédanyagot, amelynek felülete a következő tulajdonságokkal jellemezhető monoklonális antitesttel van bevonva:

- az IgG₁ osztályba tartozik,
- az antigénhez 10^{-6} – 10^{-11} affinitású,
- specifikusan kötődik a nagymolekulatömegű

(54000 D) u-PA-hoz, illetve annak prekursorához (azaz a pro-uPA-hoz) anélkül, hogy megkötné a kismolekulatömegű (33000 D) formát),
 - anélkül, hogy kötődne a szérumban vagy a vizeletben lévő endopeptidázokhoz,
 - anélkül, hogy gátolná az u-PA enzimes aktivi-

5

tását, illetve a pro-uPA enzimes aktiválását,
 - izoelektromos pontja 5,5 és 6 között van,
 2. a pro-uPa egy enzimatis aktivátorát; vala-
 mint
 3. egy kromogén szubsztátot az u-PA számára.

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
 Felelős kiadó: dr. Szvoboda Gabriella

KÓDEX