



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8502017**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Nieuw, in het bloed geïdentificeerd eiwit, werkwijze ter bereiding daarvan, werkwijze ter bepaling van dit eiwit en tevens van t-PA-remmer, en farmaceutische preparaten die het eiwit bevatten.**
- ⑤1 Int.Cl.: C07K 15/06, A61K 37/02.
- ⑦1 Aanvrager: Nederlandse Centrale Organisatie voor
Toegepast-Natuurwetenschappelijk Onderzoek te 's-Gravenhage.
- ⑦4 Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

- ②1 Aanvraag Nr. 8502017.
- ②2 Ingediend 12 juli 1985.
- ③2 --
- ③3 --
- ③1 --
- ⑥2 --

- ④3 Ter inzage gelegd 2 februari 1987.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

N.O. 33.343

Nieuw, in het bloed geïdentificeerd eiwit, werkwijze ter bereiding daarvan, werkwijze ter bepaling van dit eiwit en tevens van t-PA-remmer, en farmaceutische preparaten die het eiwit bevatten.

5

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een nieuw eiwit, dat in menselijk bloed geïdentificeerd en eruit geïsoleerd is en ook in bloed van andere zoogdieren, bijvoorbeeld van de rat en het konijn, voorkomt. Dit nieuwe eiwit blijkt specifiek plasminogeen-activator-activiteiten, met name die van weefseltype-plasminogeen-activator (t-PA) en urokinase, te remmen en is PA-bindend eiwit (PA-BP) genoemd.

Het was bekend dat plasma een remming van t-PA vertoont, die bijvoorbeeld gemeten kan worden met een PA-remmingtest (Thromb. Haemostas. 48, 266-269, (1982)). Verondersteld werd dat deze remming te wijten was aan een reeds goed gekarakteriseerde PA-remmer (In: Recent Advances in Blood Coagulation, L. Poller, ed; Churchill Livingstone NY, Vol. 4, blz. 11-33, (1985)), die ook in bloedplaatjes, endotheelcel- en levercelmedia was aangetroffen.

Gevonden werd nu, dat in bloedplasma een tweede eiwit aan de remming van t-PA bijdraagt en dat dit eiwit niet verwant is aan de PA-remmer. Het eiwit met een molecuulmassa van 100000 (gelfiltratie) bleek een reversibel met t-PA-reagerend eiwit te zijn. Dit PA-bindende eiwit (PA-BP) zal hierna in meer bijzonderheden worden beschreven.

De omzetting van fibrinogeen in fibrine is een belangrijk biologisch proces. De vorming van fibrine is cruciaal bij de bloedstolling, maar is ook een belangrijk aspect van andere biologische processen, bijvoorbeeld bij ontstekings- en kwaadaardige ziekten en bij weefselherstelprocessen. De degradatie van fibrine-afzettingen in het organisme wordt gekatalyseerd door de serine-protease plasmine, terwijl plasmine gevormd wordt uit plasminogeen onder invloed van activatoren. Twee typen plasminogeen-activatoren zijn bekend: het weefseltype (t-PA) en urokinase. Het is bekend, dat de fibrine-degradatie geregeld wordt door deze plasminogeenactivatoren, door plasmine-inhibitoren en activator-inhibitoren.

Het belangrijkste remmende eiwit, dat de fibrinolyse via plasminogeenactivatoren regelt, is PA-remmer. Deze remmer is pas sinds 1982-83 geïdentificeerd en zijn activiteit kan op eenvoudige wijze gemeten worden door titratie met t-PA dat op zijn beurt gemeten kan worden bijvoorbeeld via de procedure volgens de Nederlandse octrooiaanvraag 8201987. Bestudering van PA-remmer heeft laten zien dat dit eiwit ook in een

inactieve of latente vorm kan voorkomen.

Nadere bestudering van PA-remmer heeft geleid tot het verkrijgen van antilichamen die de activiteit van de remmer kunnen neutraliseren en die met inactieve vormen reageren. Tevens werd gevonden dat de activiteit van PA-remmer instabiel is bij 37 °C. Bij deze studies werd bij de activiteitsmetingen van PA-remmer in plasma geconstateerd, dat een deel van de remming niet labiel was bij 37 °C en dat dit deel niet reageerde met het antiserum tegen PA-remmer. Verdere studies toonden aan, dat van een tweede PA-remmend eiwit sprake was.

De eigenschappen van PA-BP worden nu in meer bijzonderheden besproken.

Menselijk PA bevat twee homologe kringle-structuren, een domein homoloog met een deel van de epidermale groeifactor, een domein homoloog met de vinger-structuur van fibronectine en een lichte keten domein met het serine-bevattende actieve centrum. Deze domeinen worden geacht een rol te spelen bij het binden van liganden, eiwitten en cellulaire structuren, welke bindingen essentieel zijn voor de regulering van de biologische functie van t-PA. De verwante plasminogeenactivator, urokinase, heeft een kringle en een lichte keten met het actieve centrum.

De regulatie van de beschikbaarheid van t-PA voor fibrinolyse is, mede gezien het grote aantal domeinen in het molecuul, uiterst gecompliceerd.

t-PA wordt bij stolling van fibrinogeen ingebouwd in het stolsel. De beschikbaarheid van t-PA in de circulatie of zijn snelle recrutering uit de endotheelcellen van de vaatwand ten tijde van de stolselvorming is een essentiële parameter voor fibrinolyse. Tekorten hierin betekenen een thrombotische diathese; overmaat t-PA een haemorrhagische diathese.

Van belang is de fibrine-gerichtheid van de werking van t-PA, in tegenstelling tot de werking van urokinase en streptokinase (een bacterieel produkt), waarbij de binding aan fibrine een stimulatie van de werking van t-PA bewerkstelligt van twee grootte-orden. Van deze eigenschap van t-PA wordt gebruik gemaakt bij de toepassing van t-PA als thrombolytisch agens. Hoeveelheden van urokinase en streptokinase, die nodig zijn om bij trombose en bijvoorbeeld het hartinfarct het stolsel op te lossen geven ook beduidende effecten in de circulatie waar ook plasmine-vorming plaats vindt en het plasmine ongewenste proteolyse veroorzaakt met als gevolg een toegenomen bloedingsrisico. Van t-PA is de werking buiten het stolsel beduidend minder.

De regulatie van de beschikbaarheid en werking van t-PA vindt onder andere ook plaats door remming met name door de PA-remmer. In de circula-

latie draagt PA-remmer bij aan de inactiviteit van t-PA en de beperking van ongewenste proteolyse door te vormen plasmine. Het vormt daartoe met t-PA zeer snel een reversibel complex dat langzaam (halfwaardetijd ongeveer een half uur) overgaat in een irreversibel complex waarin t-PA inactief is. De bloedniveaus van PA-remmer zijn echter sterk fluctueabel (van 0 tot 18 IU/ml) en deze actie van PA-remmer is dientengevolge variabel. Bovendien wordt PA-remmer door actief proteïne C en trombine bij de stolling en schijnbaar spontaan bij 37 °C (halfwaardetijd 80-100 minuten) geïnactiveerd. De nieuw gevonden component, PA-BP, heeft een veel stabielere plasmaconcentratie, is stabiel en is dientengevolge een belangrijke continue factor in het voorkomen van activiteit van t-PA in de circulatie.

In de gevormde stolsels is PA-remmer, gezien zijn labiliteit, slechts tijdelijk aanwezig en van belang voor tijdelijke stabilisatie van het stolsel door remming van plasminogeenactivatoren in de stolsel-atmosfeer, o.a. komend van buiten af. De PA-BP is permanent aanwezig en van belang voor de regulatie van PA-activiteit op langere termijn.

Bij trombolytische therapie met PA blijken voor de gewenste trombolyse hoge doses t-PA nodig, ver boven de concentraties van PA-remmer en PA-BP, waarbij systemische effecten niet uitblijven. De doses zijn ook hoog om de zeer snelle klaring van t-PA door de lever (halfwaardetijd van minuten) te compenseren. Bij experimenten in ratten is gebleken, dat preïncubatie van t-PA met plasma, dat alleen PA-BP bevatte, een vertraging van een factor vier in de klaring van het gelabelde t-PA opleverde.

De nieuwe component, PA-BP, uit zijn werking in de t-PA-remmingstest als remming van t-PA in zijn plasminogeen activerende werking. Echter laat nadere analyse zien, dat ook de reactie van t-PA met PA-remmer wordt geremd evenals de reactie met andere plasmaremmers die t-PA irreversibel kunnen neutraliseren. PA-BP moet dus gezien worden als een beschermende factor, die enerzijds t-PA beschermt tegen inactivatie door remmers en anderzijds plasminogeen beschermt tegen activatie met ongewenste plasminevorming. PA-BP is derhalve een veilige carrier voor t-PA in de circulatie. De binding van t-PA aan fibrine bij stolling wordt niet geremd. Deze redeneringen gelden gelijkelijk voor urokinase, aangepast aan zijn specifieke eigenschappen.

Uit deze gegevens kan worden afgeleid dat PA-remmer en PA-BP een verschillende rol spelen in de regulatie van de beschikbaarheid van t-PA en dat de rollen kunnen variëren naar gelang de omstandigheden. Welke domeinen van t-PA betrokken zijn bij de interactie met fibrine, plasminogeen, PA-remmer en PA-BP is nog slechts fragmentarisch bekend. De

fibrinebinding wordt geacht met het vinger-domein te maken te hebben. De plasminogeenactivering is intact als alleen de lichte keten van t-PA wordt bestudeerd. De interactie met PA-BP werd intact bevonden als een door recombinant-DNA-technieken verkregen t-PA-mutant werd bestudeerd, 5 waarbij de N-terminale delen inclusief kringle 1 ontbraken. De lichte keten, waarbij ook kringle 2 ontbreekt, bleek echter geen interactie met PA-BP te hebben, evenmin als t-PA, waarvan het actieve centrum was geïnactiveerd door DFP. Blijkbaar zijn kringle 2 en het actieve centrum van t-PA betrokken in de interactie met PA-BP. Uit bestudering van urokinase 10 met en zonder zijn kringle bleek de aanwezigheid van de kringle niet essentieel voor interactie met PA-BP, echter wel het actieve centrum, omdat prourokinase geen interactie vertoonde. Minimaal is het actieve centrum van de plasminogeenactivatoren dus van belang voor de interactie met PA-BP.

15 De bepaling van PA-BP kan plaats vinden met de bepalingmethode voor PA-remmer, waarbij de eventuele invloed van in het monster ook aanwezige PA-remmer teniet is gedaan door toevoeging van IgG tegen deze remmer of door preincubatie van het monster gedurende een geschikte periode bij bijvoorbeeld 37 °C waardoor exclusief de PA-remmer wordt 20 geïnactiveerd. In deze bepalingmethode kan oplosbare stimulator worden gebruikt of fibrinemonomeer. De dose-response curve voor de bepaling is lineair en de activiteiten van PA-remmer en PA-BP zijn additief.

De interactie tussen t-PA en PA-BP toont een reversibele kinetiek, die in een reciproke plot van vrij tegen gebonden t-PA een schijnbare 25 dissociatie of inhibitieconstante van 1-5 picomolair laat zien. De reversibiliteit van de interactie tussen t-PA en PA-BP is verder kinetisch onderbouwd door de waarneming, dat gedurende uren de hoeveelheid resterend t-PA (ondanks overmaat PA-BP) constant blijft en dat bij verdunning het evenwicht verschuift in de richting van grotere dissociatie 30 met procentueel meer vrij t-PA. Een andere waarneming die het reversibele karakter van de t-PA met PA-BP toont, is gedaan bij toevoeging van t-PA of urokinase aan plasma. Indien een overmaat t-PA of urokinase aan plasma wordt toegevoegd is geen PA-BP activiteit meer meetbaar. Na incubatie bij 37 °C van een dergelijk mengsel blijkt na verloop van tijd de 35 activiteit van PA-BP terug te keren. Blijkbaar wordt in dit geval wel initieel de PA-BP geneutraliseerd en wordt het t-PA en UK gebonden, maar wordt in plasma op langere termijn de toegevoegde t-PA en urokinase door langzame plasmatische remmers zoals alpha-2-antiplasmine irreversibel geïnactiveerd. Hieruit blijkt, dat PA-BP niet blijvend door plasmino- 40 geenactivatoren kan worden geneutraliseerd.

8502017

In plasma is de activiteit van PA-BP stabiel bij incubatie bij 0 tot 56 °C voor perioden tot een week. Bij 37 °C verdwijnt PA-remmer-activiteit met een halfwaardetijd van 80-100 minuten. Na een geschikt aantal malen deze halfwaardetijd bijvoorbeeld door incubatie gedurende een nacht, bevat plasma exclusief de PA-BP-activiteit. De inactivatie van PA-remmer is sterk afhankelijk van de temperatuur met een Q 10 van 5, waardoor de inactivatie bij hogere temperaturen veel sneller verloopt. In plasma is na immuunprecipitatie met IgG tegen PA-remmer een PA-remming over, die thermostabiel is en quantitatief identiek aan PA-BP. Een zelfde activiteit, identiek aan PA-BP blijft over bij toevoeging van een overmaat PA-remmer IgG in de bepalingmethode voor t-PA-remming. De PA-BP-activiteit die resteert na een nacht incuberen van plasma bij 37 °C is ongevoelig voor remming door overmaat IgG tegen PA-remmer. De activiteit van PA-BP is ongevoelig voor de toevoeging van EDTA. De plascentaremmers van plasminogeenactivatoren wordt niet aangetroffen in normaal plasma en de activiteit van PA-BP wordt niet geneutraliseerd door antilichamen tegen de placentaremmers die wel de placentaremmersactiviteit remmen onder gelijke omstandigheden.

De identiteit van PA-BP met bekende remmers die interactie vertonen met de fibrinolysecomponenten is uitgesloten op basis van de concentratie in plasma die voor geen van de bekende remmers, exclusief PA-remmer, zo laag is. PA-BP is normaal aanwezig in antiplasmin deficient plasma. Gezuiverd tetranectine (Nederlandse octrooiaanvraag 8501682) vertoont geen remming van t-PA. Plasminogeen en fibrinogeen kan uit plasma verwijderd worden zonder PA-BP-activiteit aan te tasten. Alpha-2-macroglobuline en C1-inactivator komen op een duidelijk andere plaats dan PA-BP bij gelfiltratie van plasma. In fibroblastenmedium, waarin protease nexin aanwezig is werd geen PA-BP gedetecteerd.

PA-BP in plasma kan van PA-remmer gescheiden worden door gelfiltratie waarbij de PA-remmer bij hoog molecuulgewicht terecht komt en PA-BP ongeveer samenvalt met plasminogeen bij een molecuulgewicht van 100000. De beide pieken voldoen aan de karakteristieken dat PA-remmer met het antiserum is te neutraliseren en temperatuur labiel is terwijl PA-BP ongevoelig is voor het antiserum en temperatuur stabiel is. Hiermee in overeenstemming is, dat gelfiltratie van plasma dat vooraf 24 uur bij 37 °C is geïncubeerd alleen de PA-BP oplevert.

PA-BP kan met ammoniumsulfaat worden geprecipiteerd tussen 30 en 50% verzadiging en met polyethyleenglycol tussen 0 en 9%. PA-BP wordt niet gebonden aan lysine-agarose waardoor plasma via deze kolom plasminogeen vrij kan worden gemaakt zonder verlies aan PA-BP. PA-BP bindt

8502017

niet aan een kolom met DFP behandeld t-PA aangevend dat een intact actief centrum van t-PA essentieel is voor de interactie met PA-BP.

Bij elektroforese in agarose geeft PA-BP een enkele activiteitspiek die samenloopt met de alpha-1-globulinen van plasma. Bij iso-electrische
5 focusering verschijnt PA-BP bij pH 5-5,5 in overeenstemming met de elektroforetische mobiliteit in de agarose.

PA-BP werd in tegenstelling tot t-PA-remmer niet in meetbare hoeveelheden aangetroffen in geconditioneerde media van cultures van endotheelcellen, HEP G2 cellen en van hepatocyten. Ook in middels droogvrie-
10 zen sterk geconcentreerde media (20x) konden geen meetbare hoeveelheden PA-BP worden aangetoond.

In triton X-100 extracten van bloedplaatjes werd PA-remmer aangetoond, doch geen PA-BP, zoals duidelijk was uit het feit dat alle PA-remming rembaar was met het antiserum tegen PA-remmer.

15 In gepooled normaal plasma werd een concentratie van PA-BP vastgesteld van 5 IU/ml, hetgeen bij een molecuulgewicht van 100000 overeenkomt met de lage waarde van 10 ng/ml of 0,1 nmol/l. Dat is 10-100-voudige overmaat ten opzichte van vrij t-PA in een plasma verkregen onder rustcondities. Bij de inhibitie/dissociatieconstante van t-PA en PA-BP
20 van 1-5 pmolair betekent het, dat nagenoeg alle t-PA in complex met PA-BP verkeert. In gezonde individuen werd een PA-BP-concentratie aangetroffen, die vrij constant was (standaard deviatie 15%); dit in tegenstelling tot de grote interindividuele variatie in PA-remmer. Nu duidelijk werd dat bij de PA-remmingsbepaling in plasma de PA-BP-waarde moest
25 worden afgetrokken van het totaal om PA-remmer specifiek te meten werd de interindividuele variatie in die PA-remmer nog opvallender en werden vele gevallen met nagenoeg nul PA-remmeractiviteit gezien. Blijkbaar is PA-remmer frequent niet aantoonbaar in plasma.

Variaties in PA-remming in plasma kunnen nu te wijten zijn aan de
30 twee onderscheiden componenten. Er werd echter gevonden dat de variaties hoofdzakelijk die in PA-remmer betroffen en dat bijvoorbeeld het dagritme en de acute phase reactie van de remming de PA-remmer betroffen, terwijl de PA-BP constant was of beperkt fluctueerde.

Ook in dierlijke plasma's, zoals van de rat en het konijn, werd een
35 thermostabiele component aangetroffen in plasma, vergelijkbaar met PA-BP. Er werden sterke fluctuaties gezien door bijvoorbeeld injectie van endotoxine in PA-remmer, terwijl PA-BP constant blijft.

Bij infuus in ratten van ratteplasma met een hoog gehalte aan PA-remmer (verkregen door injectie van endotoxine en bloedbemonstering
40 na 4 uur in een ander dier) werd waargenomen dat de PA-remmer een snelle

klaring met een halfwaardetijd van 3-4 minuten vertoonde, terwijl de
 eveneens door het infuus toegenomen niveau van PA-BP nauwelijks geduren-
 de de observatieperiode daalde. Dit duidt op een halfwaardetijd voor
 PA-BP in de grootte-orde van dagen. Dit betekent dat de stabiele plasma-
 5 concentraties van PA-BP ook gedurende en na het circuleren van grote
 hoeveelheden t-PA, zoals na DDAVP-infuus, niet door snelle synthese
 worden bereikt. Er moet worden aangenomen dat bij de snelle klaring van
 t-PA uit de circulatie via de lever het t-PA van het PA-BP dissocieert.

Samenvattend zijn de eigenschappen van het nieuwe eiwit volgens de
 10 uitvinding, PA-bindend eiwit (PA-BP) genaamd, de volgende:

PA-BP is een plasma-eiwit met een molecuulmassa van 100000, bepaald
 met gelchromatografie op Ultrogel ACA 44.

De electroforetische mobiliteit is bij agarose-electroforese gelijk
 aan die van alpha-1-globulinen van plasma.

15 Het isoelectrische punt is 5-5,5.

PA-BP is thermostabiel, tot ten minste 56 °C gedurende dagen.

PA-BP bindt niet aan fibrine en verhindert niet de binding van t-PA
 aan fibrine. PA-BP bevat geen suikerresiduen, die binden aan concanava-
 line A.

20 PA-BP remt de t-PA activiteit met een schijnbare inhibitieconstante
 van 1-5 picomolair. Deze remming is reversibel op korte en lange termijn
 en belemmert tevens de inactivatie van t-PA door andere remmers.

PA-BP heeft interactie met urokinase, niet met prourokinase.

Voor de interactie met PA-BP is een actief centrum van de plasmino-
 25 geenactivatoren nodig.

Bij de interactie met PA is kringel 2 betrokken.

PA-BP is verschillend van PA-remmer volgens immunologische criteria
 en in eiwitchemische karakteristieken en qua distributie in het
 lichaam.

30 PA-BP heeft een constante plasma-concentratie van ongeveer 10
 ng/ml, gekoppeld aan een langzame klaring van dagen uit de circulatie en
 komt niet noemenswaardig voor in plaatjes en cultuurmedia van endotheel-
 cellen en hepatocyten.

De uitvinding heeft betrekking op PA-BP met de bovengenoemde eigen-
 35 schappen. De uitvinding betreft ook werkwijzen voor de bereiding van
 PA-BP. In de eerste plaats kan PA-BP worden verkregen uit bloed of
 bloedfracties van zoogdieren, zoals van de mens of van het konijn of de
 rat, door middel van gebruikelijke eiwitzuiveringstechnieken, die aange-
 past zijn aan de eigenschappen van het eiwit.

40 De uitvinding omvat eveneens PA-BP, dat bereid is uit celcultures

of door middel van micro-organismen of andere gastheerorganismen, die gemodificeerd zijn met behulp van recombinant-DNA-technieken.

De zuivering van PA-BP kan uitgevoerd worden door affiniteitschromatografie op een kolom met gekoppelde plasminogeenactivator of
 5 gemuteerd t-PA waarin de N-terminale delen inclusief één kringle, kunnen worden gemist. De affiniteitschromatografie kan bijvoorbeeld in afwezigheid van plasminogeen worden uitgevoerd en kan worden gecomplementeerd met traditionele scheidingstechnieken aangepast aan de eigenschappen van het eiwit. Het actieve centrum van de plasminogeenactivatoren dient
 10 intact of marginaal gemodificeerd te zijn.

De uitvinding betreft verder aantonnings- en bepalingsmethoden, waarbij de voorbehandeling van het monster of de toevoeging van PA-remmer-antilichamen de bestaande methoden specifiek maken. Tevens betreft de uitvinding werkwijzen om de bestaande bepalingsmethoden voor PA-rem-
 15 mer specifiek te maken voor deze specifieke factor. Alle bekende bepalingsmethoden voor PA-remming in plasma en andere monsters kunnen hierbij worden toegepast. Zo wordt de bepalingsmethode specifiek voor PA-BP door toevoeging van PA-remmer-antilichamen of door preïncubatie van het monster gedurende een geschikte periode, bijvoorbeeld gedurende ten
 20 minste 10 uren bij 37 °C teneinde de PA-remmer te inactiveren. De specifieke bijdrage van PA-remmer wordt berekend als de activiteit, geneutraliseerd door de antilichamen of geïnactiveerd door de preïncubatie.

PA-BP is in menselijk plasma aanwezig in een gemiddelde concentratie van 0,1 nmol/l. Dit gemiddelde is bepaald in normale gezonde vrij-
 25 willigers. De PA-BP-concentratie verandert niet gedurende de dag (0900-1500 uur) en is niet sterk veranderd in patienten met een acute fase-reactie of sepsis. Het PA-BP-gehalte wordt niet verlaagd door tijdelijke verhoging van circulerend t-PA zoals door DDAVP-infuus.

PA-BP regelt de beschikbaarheid van t-PA en urokinase door reversi-
 30 bele binding van de plasminogeenactivatoren op een eigen wijze, waarbij de binding van t-PA aan fibrine niet verhinderd wordt doch waarbij wel de activiteit van plasminogeenactivatoren geremd wordt in afwezigheid van gepolymeriseerd fibrine en aanwezigheid van fibrine- en fibrinogeenfragmenten of -afbraakprodukten. Plasminogeenactivatoren worden
 35 beschermd tegen inactivatie door andere processen.

Gezien deze rol van PA-BP kan PA-BP gebruikt worden als middel voor het reguleren van de fibrinolyse. Door de langzame klaring uit de circulatie kan met weinig materiaal een beduidende verhoging van de plasma-
 spiegel voor langere tijd bereikt worden. Het kan van waarde zijn voor
 40 het verminderen van systemische effecten van plasminogeenactivatoren.

3502017

Het kan van waarde zijn als toevoeging aan t-PA of urokinase bij thrombolytische therapie en systemische effecten ten opzichte van de thrombolytische verminderen. Het kan van waarde zijn bij de beteugeling van van fibrine onafhankelijke werkingen van plasminogeenactivatoren, zoals bij
 5 extracellulaire afbraak, bij gedissemineerde intravasculaire stolling.

Daarom heeft de uitvinding ook betrekking op farmaceutische preparaten, die PA-BP als actief bestanddeel bevatten.

De volgende voorbeelden dienen ter illustratie van de uitvinding. De materialen en methoden, die in de voorbeelden zijn toegepast, zijn de
 10 volgende:

Ultrigel ACA 44 was van LKB (Zweden).

Stimulator werd bereid uit fibrinogeen door behandeling met cyanogeenbromide, zoals beschreven door Verheijen et al (Thromb Haemostas 48, (1982) 266-269).

15 S2251. Dit chromogene plasminesubstraat met de formule H-D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide.2HCl is verkregen van de firma Kabi, Molndal, Zweden.

Plasminogeen. Plasminogeen is geïsoleerd van fractie III volgens Cohn door affiniteitschromatografie op lysine-eupergit.

t-PA. t-PA is geïsoleerd uit media van celkweek van de Bowes melanomacellijn, zoals beschreven in Kluft et al. In: Advances in Biotechnological Processes vol. 2 (Mizrahi, A. v. Wezel AL, eds) New York: AR Liss, 1983, blz. 97-100. t-PA is gekoppeld aan sepharose volgens de instructies van de firma Pharmacia voor CNBr-sepharose. t-PA is geïnactiveerd door behandeling met diisopropylfluorofosfaat (1 mM). De lichte
 20 keten van t-PA die het actieve centrum bevat is verkregen door reductie van twee-ketenig t-PA, reoxidatie en scheiding middels gelfiltratie. Een mutant t-PA waarin het vinger-, groeihormoon- en N-terminale kringle-domein ontbreken werd bereid door recombinant DNA manipulatie aan het c-DNA coderend voor melanoma t-PA. Expressie van de mutant werd verkregen in CHO (Chinese Hamster Ovarium) cellen.
 25 30

Urokinase is verkregen als een mengsel van hoog- en laagmoleculaire vorm van Leo, Ballerup, Zweden en als laagmoleculaire vorm van de firma Abbott.

Pro-urokinase is door adsorptie aan een kolom met IgG tegen urokinase gezuiverd uit celcultures van apeniercellen.
 35

IgG tegen PA-remmer. PA-remmer is geïsoleerd uit endotheelcelmedia, zoals beschreven door Van Mourik et al (J. Biol. Chem. 259, (1984), 14914-14921). Een antiserum werd opgewekt door immunisatie van konijnen en de IgG's werden gezuiverd met Protein A Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Zweden).
 40

8302017

Endotoxine, *Escherichia coli* (serotype 0128:B12) is van Sigma, St. Louis, U.S.A.

Wistar ratten zijn verkregen van het Centraal Proefdierenbedrijf TNO, Zeist en proeven zijn uitgevoerd onder Nembutal-anaesthesie (60 mg/kg ip).

Endotheelcellen zijn geïsoleerd uit navelstrengvaten door collagenase-vertering en zijn gekweekt tot confluentie op met fibronectine gecoate schalen in Dulbecco's modificatie van Eagles medium, zonder serumtoevoegingen. Cellen van de permanente hepatomacellijn HEP G2, hepatocyten en fibroblasten zijn onder standaardcondities gekweekt in serumvrije media.

Plasma is verkregen van donorbloed gestabiliseerd met 0,10 volume van een oplossing die 0,11 M natriumcitraat bevat.

Gelfiltratie op Ultrogel ACA 34. Deze werd uitgevoerd in een kolom van 275 ml, die geëquilibreerd en gepakt was met 0,10 M Tris HCl buffer, pH 7,4 en 0,05 M NaCl. De kolom werd geijkt door gebruikmaking van verschillende merkeiwitten en door interne ijking via de meting van het plasmaplasminogeen volgens de streptokinase-activeringsmethode van de firma Kabi, Molndal, Zweden.

De isoelectrische focussering werd uitgevoerd in staafjes polyacrylamidegelen die na elektroforese in plakjes werden gesneden. De pH-gradient werd gemeten door extractie van de plakjes in water. De t-PA-remming werd gemeten na extractie van de plakjes in meetbuffer van de remmingmeetmethode. Twee pH-gradienten van 3,5-9,5 en van 4-6 werden bestudeerd.

t-PA-meting. t-PA wordt geïncubeerd bij 25 °C in 0,25 ml Tris-HCl buffer (0,10 M, pH 7,5), die 0,13 μ M plasminogeen, 0,1% (v/v) Tween 80, 0,12 mg/ml fibrinogeenfragmenten (stimulator of fibrinemonomeer) en 0,30 mM chromogeen plasminesubstraat (bijvoorbeeld S2251) bevat. De lichtadsorptie bij 405 nm wordt gemeten na verschillende incubatietijden. De meting wordt uitgevoerd in een microtiterplaat met 96 putjes en met een Titertekmeetapparaat (Flow, Irvin, U.K.). De toegenomen lichtadsorptie, gedeeld door het kwadraat van de incubatietijd is evenredig met de activatorconcentratie. De activiteit van t-PA wordt uitgedrukt in International Units volgens de Eerste internationale standaard van de WHO, code 83/517.

Voorbeeld I.

De t-PA-remmermeting wordt uitgevoerd als een titratie van een remmer bevattend monster, bijvoorbeeld plasma, met een reeks t-PA. De t-PA-activiteit wordt gemeten met de bovengenoemde t-PA-metmethode.

8502017

Fig. 1 laat zien hoe toevoeging van 20 μ l plasma in de meting een curve geeft die bij extrapolatie naar de X-as de hoeveelheid remming geeft uitgedrukt in de hoeveelheid geneutraliseerd t-PA. Fig. 1 laat tevens zien dat plasma dat gedurende een nacht geïncubeerd is bij 37 °C minder remming vertoont. Deze restremming is niet te remmen met immuun-globulinen tegen PA-remmer, geïsoleerd uit endotheelmedium. Deze immuun-globulinen hebben wel effect op vers plasma en verminderen de remming van t-PA tot het niveau van het geïncubeerde plasma. Daarom staat bij deze curve de aanduiding plasma -(minus) t-PA-inhibitor.

10 Voorbeeld II.

Thermolabiliteit van PA-remmer. Fig. 2. laat zien, dat de t-PA-rem-activiteit van PA-remmer in gepooled normaal plasma terugloopt bij incubatie bij temperaturen hoger dan 0 °C. De remming door PA-BP is hierbij afgetrokken. De inactivatiesnelheid (k) is sterk temperatuur-afhankelijk met een toename met een factor 5 per 10 °C temperatuursverhoging (in-
15 zet). Hierbij werd geconstateerd, dat de restremming van PA-BP stabiel blijft voor minstens een week en tot een temperatuur van 56 °C in ieder geval. Eenzelfde inactivatiesnelheid van PA-remmer werd tot nu toe gevonden in alle individuele plasma's.

20 Voorbeeld III.

Remmingskinetiek. Uit resultaten, zoals in fig. 1, kan door bewerking de schijnbare inhibitieconstante verkregen worden door tegen elkaar uit te zetten de reciproke waarden van vrij en gebonden t-PA. Extrapolatie van deze lineaire curven laat een asafsnede op de X-as zien die voor
25 totaal plasma, endotheelcelmedium en geïncubeerd plasma (PA-BP) in alle gevallen eenzelfde waarde van 1-5 picomolair vertegenwoordigt. Als een mengsel van t-PA en geïncubeerd plasma of gezuiverd PA-BP wordt gemeten in verschillende verdunningen wordt een verschillend percentage vrije t-PA gevonden. Bijvoorbeeld werd bij 1 in 10, 1 in 3 en onverdund res-
30 pektievelijk 38%, 33% en 22% vrij t-PA gevonden in een situatie met ondermaat t-PA. Dit duidt op een reversibele complexvorming.

Voorbeeld IV.

Reversibele binding van PA en PA-BP. Toevoeging van een viervoudige overmaat t-PA of urokinase ten opzichte van de totale remcapaciteit van
35 normaal plasma liet bij meting zien dat alle remming ten opzichte van t-PA in de remmermeting was geneutraliseerd. Na een nacht incuberen van de mengsels bij 37 °C bleek wederom remming meetbaar die kwantitatief gelijk was aan de PA-BP-activiteit en verder stabiel bleef. Blijkbaar waren t-PA en urokinase in het plasmamilieue, zoals bekend is, langzaam
40 geïnactiveerd door andere in grote hoeveelheden aanwezige proteaserem-

mers en was PA-BP weer vrijgekomen en blijkbaar niet irreversibel geneutraliseerd.

Voorbeeld V.

PA-BP-meting in plasma. Plasma wordt daartoe voorbehandeld door incubatie gedurende een geschikte periode (twee uur bij 45 °C of gedurende een nacht bij 37 °C) om PA-remmer te inactiveren. Daarna wordt remming gemeten volgens de eerder genoemde t-PA-remmermeetmethode. Deze methode blijkt ook te werken voor plasma van bijvoorbeeld de rat en het konijn waarin ook PA-BP werd aangetroffen. De incubatietechniek is met name ook geschikt voor monsters met aanzienlijke hoeveelheden t-PA, zoals na stimulatie van de fibrinolyse en bij infuus van t-PA, waarbij de storende PA-activiteit ook verdwijnt door de incubatie (zie voorbeeld IV). Als alternatief voor humaan materiaal waarin nagenoeg geen vrije t-PA of urokinase voorkomt, zonder voorbehandeling van plasma, wordt de t-PA-remmermeting uitgevoerd met toevoeging aan het meetsysteem van een overmaat IgG tegen de endotheel-PA-remmer. Van het gebruikte antiserum is dat ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ IgG.

Voorbeeld VI.

PA-BP in media en klinische monsters. Met de PA-BP-meetmethode werd vastgesteld dat in plasma's van normale donoren een hoeveelheid PA-BP voorkomt, die vrij constant is (standaarddeviatie 15%) en equivalent is aan 5 IU t-PA/ml. Geen variatie werd gezien gedurende de dag tussen 0900 en 1500 uur en in patienten met een duidelijke acute fase-reactie met een hoge PA-remmerspiegel zoals na meervoudig trauma (twee of meer grote botbreuken). Tijdens DDAVP-infuus blijkt PA-BP slechts tijdelijk geneutraliseerd te worden door het circulerende t-PA en altijd normaal aantoonbaar na incubatie van plasma. Injectie van endotoxine (10 $\mu\text{g/kg}$) bij ratten leidde na 4 uur tot excessief hoge remmingwaarden in plasma (tot 1500%), die echter geheel te wijten waren aan PA-remmer; PA-BP bleef onveranderd. In media van celcultures van endotheelcellen en HEP G2 cellen is alle t-PA-remming te remmen met IgG tegen PA-remmer. Ook 20-voudige concentrering van de media liet geen meetbaar PA-BP-gehalte zien. Triton X-100 extracten van bloedplaatjes gepelletteerd uit bloed liet t-PA-remming zien die geheel te remmen was met IgG tegen PA-remmer. Fibroblastenmedium dat protease nexin bevat, gaf geen PA-BP-activiteit te zien. PA-BP werd niet aangetroffen in euglobulinefracties van plasma.

Voorbeeld VII.

Specificiteit van PA-BP. Met de t-PA-remmer-meetmethode werd nagegaan welke componenten, toegevoegd aan een plasma dat alleen PA-BP bevatte, de PA-BP-activiteit beïnvloedde. Zo werd gevonden, dat toevoe-

ging van 10 ng/ml Leo urokinase of Abbott urokinase de PA-BP-activiteit voor 50% neutraliseerde duidend op een even sterke binding als voor t-PA. Prourokinase gezuiverd uit apeniercellen (14 ng/ml) en aanwezig in humaan fibroblastenmedium (100 ng/ml) had geen enkel effect. Eenzelfde
 5 experiment voor t-PA liet zien dat met DFP geïnactiveerd t-PA (100 ng/ml) en de geïsoleerde, actieve lichte keten van t-PA (10 ng/ml) geen enkel effect sorteerden.

Het t-PA van de meetprocedure werd vervangen door een deletie-mutant t-PA verkregen via recombinant DNA manipulatie. Deze mutant
 10 bevatte niet meer de vinger-, groeihormoon- en kringle-1-domeinen. Hiermee bleek nog steeds de PA-BP-activiteit normaal meetbaar. Blijkbaar is de interactie tussen PA-BP en plasminogeenactivatoren primair afhankelijk van een intact actief centrum en bij t-PA tevens van kringle 2.

Voorbeeld VIII.

15 Gelfiltratie van PA-BP. Gelfiltratie van 5 ml plasma over Ultrogel ACA 44 laat een scheiding zien van PA-remmer en PA-BP. De twee pieken in fig. 3 zijn geïdentificeerd door hun thermolabiliteit. PA-BP blijkt te chromatograferen op een plaats overeenkomend met een molecuulgewicht van 100.000, dicht bij plasminogeen (90.000) en na aldolase (147.000).

20 Voorbeeld IX.

Fibrinebinding van t-PA. Aan plasma dat door incubatie bij 37 °C alleen PA-BP-activiteit vertoonde is t-PA toegevoegd in hoeveelheden die equivalent waren aan de PA-BP-capaciteit en tweemaal die hoeveelheid. Het plasma werd gestold door toevoeging van calciumchloride en trombine
 25 en het gevormde stolsel werd verwijderd. In het gevormde serum bleek in de controle zonder t-PA en de twee plasma's met t-PA evenveel PA-BP aantoonbaar, gelijk aan de hoeveelheid in het uitgangsplasma. Dit toont aan dat de t-PA-binding aan het stolsel heeft plaatsgevonden ongehinderd door PA-BP.

30 Voorbeeld X.

Bescherming van t-PA tegen remming. In de PA-remmingmeetmethode werden verschillende incubatietijden bestudeerd bij verschillende omstandigheden. In plasma dat alleen PA-BP bevatte werd geconstateerd dat bij t-PA-concentraties beneden het niveau van PA-BP de t-PA-activiteit
 35 gedurende 5 uur bij 25 °C stabiel blijft. Boven het equivalentiepunt wordt t-PA door plasmatische remmers geïnactiveerd met een halfwaardetijd van ongeveer 1 uur, met de bijzonderheid dat de inactivatie stopt bij ongeveer het equivalentiepunt. Blijkbaar beschermt PA-BP t-PA tegen inactivatie door plasmaremmers. In eenzelfde opzet waarbij serumvrij
 40 medium van celcultures wordt gebruikt waarin alleen PA-remmer aanwezig

is, laat zien dat de t-PA-activiteit langzaam irreversibel wordt geïnactiveerd (halfwaardetijd 2,5-3 uur). In plasma waarin zowel PA-BP als PA-remmer aanwezig zijn wordt t-PA langzaam geïnactiveerd met een halfwaardetijd van 2,5-3 uur boven het equivalentiepunt van PA-BP en is de
5 t-PA-activiteit stabiel onder dit equivalentiepunt. Blijkbaar beschermt PA-BP ook tegen de werking van PA-remmer.

C o n c l u s i e s

1. Eiwit, dat PA-bindend eiwit (PA-BP) is genoemd en ten minste de volgende eigenschappen vertoont:

- 5 a. het heeft een molecuulmassa van ongeveer 100000, zoals bepaald door gelchromatografie op Ultrogel ACA 44;
- b. het heeft een electroforetische mobiliteit in agarose bij pH 8,6 gelijk aan die van alpha-1-globulinen van plasma;
- c. het heeft een isoelectrisch punt van 5-5,5;
- 10 d. het eiwit bindt specifiek en reversibel aan t-PA en urokinase bij aanwezigheid van een vrij actief centrum en specifiek kringle 2 van t-PA;
- e. het eiwit is thermostabiel tot ten minste 56 °C;
- f. het eiwit wordt geklaard uit de circulatie met een halfwaarde-
- 15 tijd in de orde van dagen.

2. Werkwijze ter bereiding van PA-BP, waarbij bloed of bloedfracties of celcultuurmedia, onderworpen worden aan methoden, die bekend zijn voor het isoleren van eiwitten, welke methoden aangepast zijn aan
20 de specifieke eigenschappen van PA-BP.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, waarin de isoleringsmethoden affiniteitschromatografie op urokinase of t-PA met ten minste kringle 2 omvatten, waarbij de genoemde activatoren een intact actief centrum
25 hebben.

4. Werkwijze voor het bepalen van het gehalte aan PA-BP in een monster, met het kenmerk, dat men de in het monster eventueel aanwezige PA-remmer inactieveert en daarna het gehalte aan PA-BP met
30 behulp van voor PA-remmer gebruikelijke methoden bepaalt.

5. Werkwijze voor het bepalen van het gehalte aan PA-remmer en PA-BP in een monster, met het kenmerk, dat men een gebruikelijke bepaling van PA-remmer uitvoert, de aanwezige PA-remmer inacti-
35 veert, daarna het gehalte aan PA-BP met behulp van voor PA-remmer gebruikelijke methoden bepaalt en de voor PA-remmer gevonden waarde corrigeert met de voor PA-BP gevonden waarde.

6. Werkwijze volgens conclusie 4 en 5, met het ken-
40 merk, dat men de inactivering van PA-remmer uitvoert door incubering

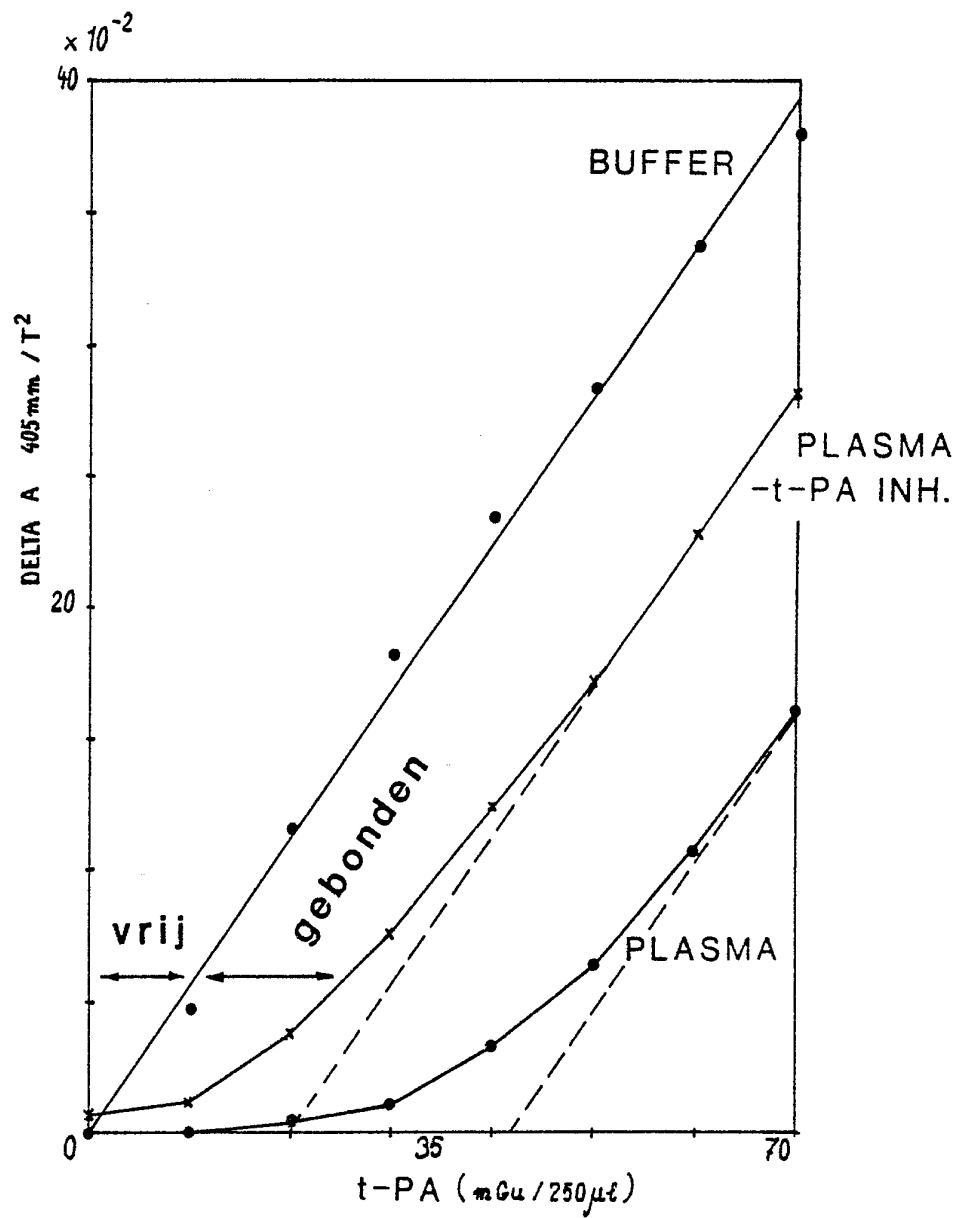
van het monster bij een temperatuur van ten minste 30 °C.

7. Werkwijze volgens conclusie 4 en 5, m e t h e t k e n-
m e r k, dat men de inactivering van PA-remmer uitvoert door neutralisa-
5 tie daarvan met antilichamen tegen deze remmer.

8. Farmaceutische preparaten, die PA-BP bevatten.

9. Farmaceutische preparaten volgens conclusie 8, die behalve PA-BP
10 ook een plasminogeenactivator, zoals t-PA of urokinase, bevatten.

fig-1



8502017

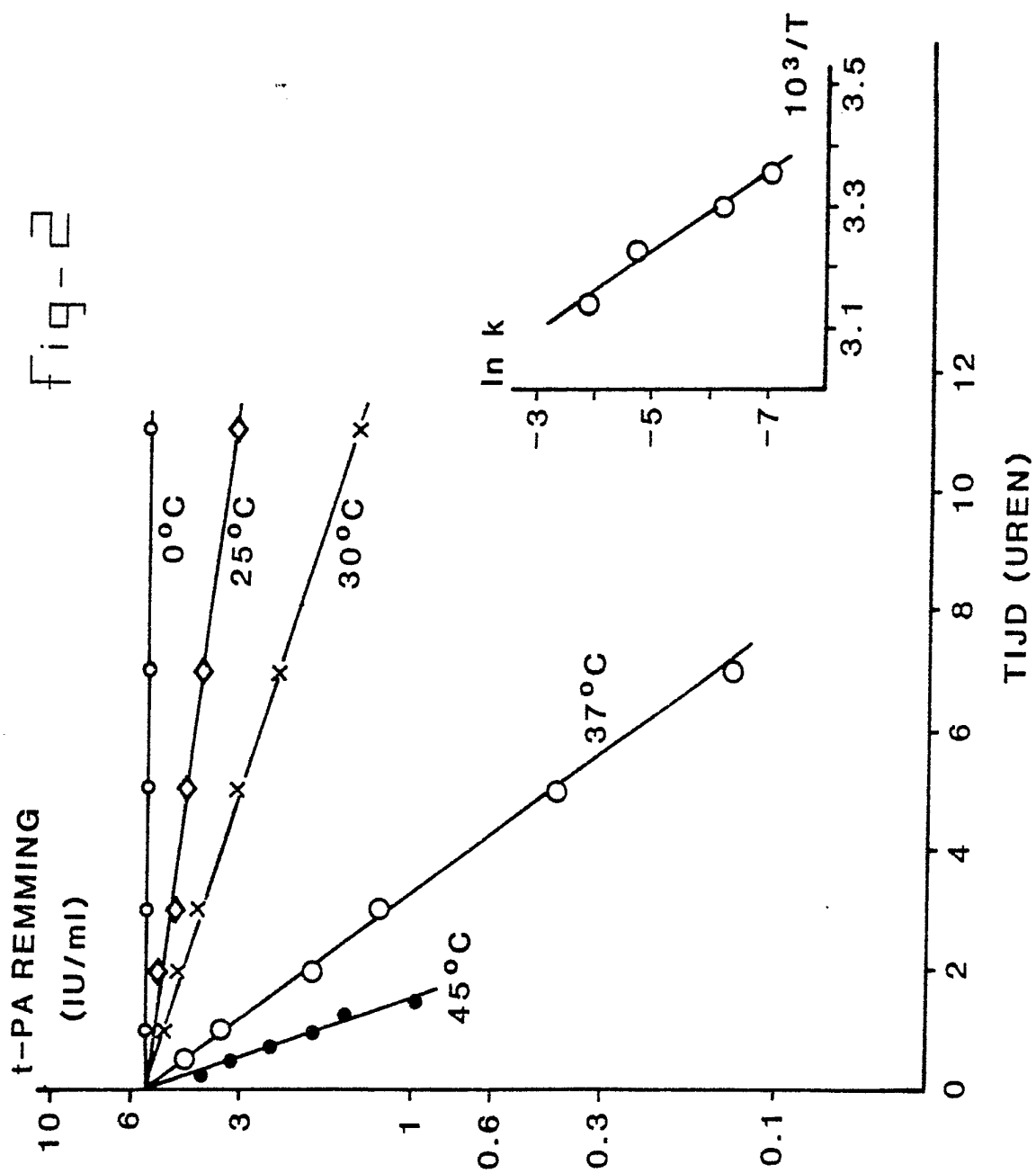
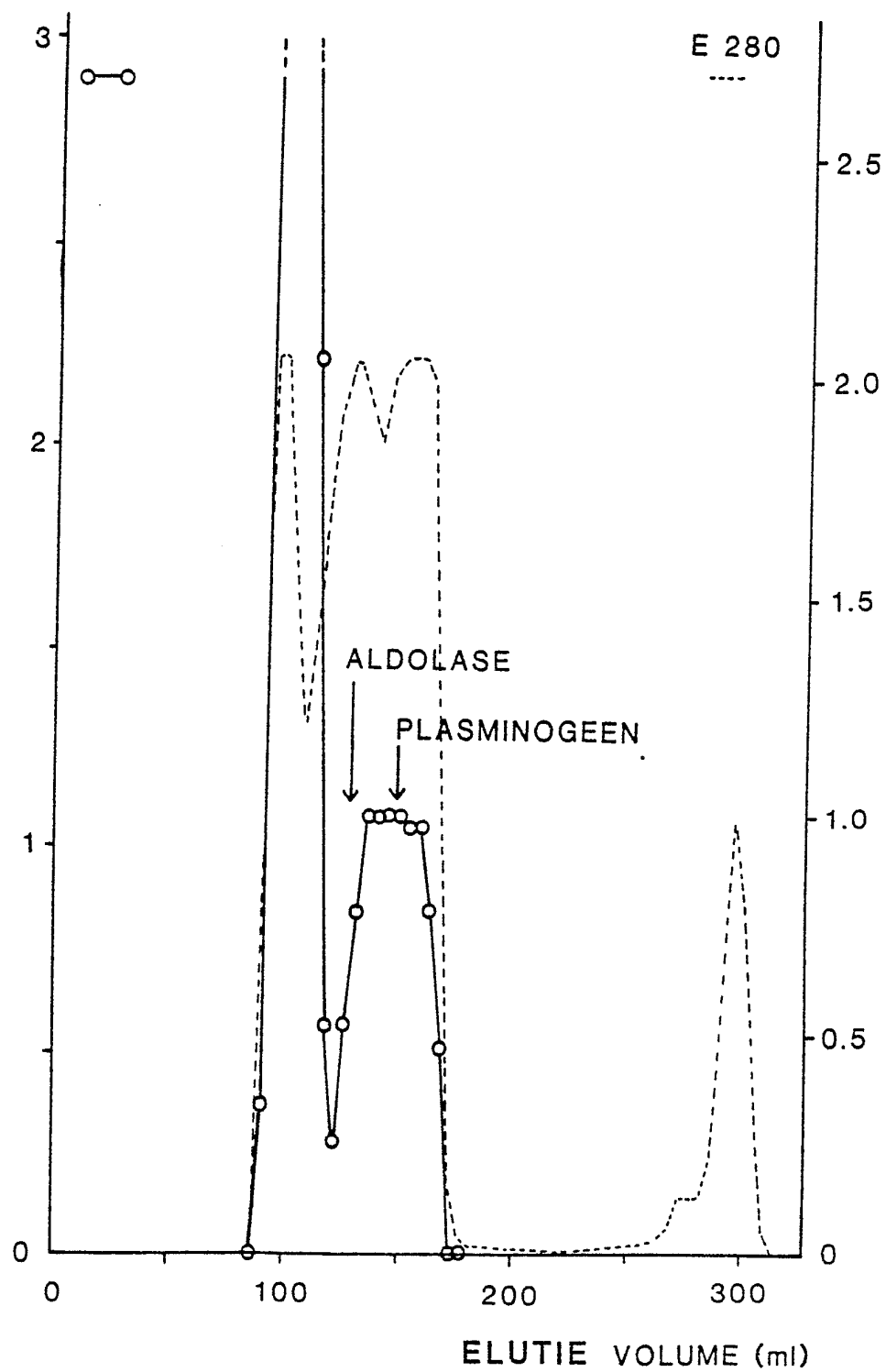


fig-3

ACA 44 ULTROGEL CHROMATOGRAFIE

t-PA REMMING (IU/ml)



3502017