



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **93-01116**
(22) Data de depozit: **11.12.1992**
(30) Prioritate: **13.12.1991 SE 9103701.0;**
(41) Data publicării cererii:
30.11.1998 BOPI nr. **11/1998**
(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
28.04.2000 BOPI nr. **4/2000**
(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.
(61) Perfecționare la brevet:
Nr.
(62) Divizată din cererea:
Nr.
(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **SE 92 / 00858 11.12.1992**
(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 93/12143 24.06.1993**
(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 9012879; EP 0267703

(71) Solicitant: **KABI PHARMACIA AB, UPPSALA, SE;**
(73) Titular: **ESPERION THERAPEUTICS, INC., ANN ARBOR, MICHIGAN, US;**
(72) Inventatori: **SIRTORI CESARE, MILANO, IT; FRANCESCHINI GUIDO, MILANO, IT; ABRAHMENSEN LARS, STOCKHOLM, SE; HOLMGREN ERIK, LIDINGO, SE; LAKE MATS, LIDINGO, SE; NILSSON BJORN, SOLLENTUNA, SE; CHMIELEWSKA JOANNA, STOCKHOLM, SE; LIND PETER, UPPSALA, SE;**
(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI**

(54) **PROCEDEE PENTRU PREPARAREA DIMERULUI DE
APOLIPOPROTEINĂ AI-MILANO**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la două procedee de preparare a dimerului de apolipoproteină AI-Milano prin tehnologie recombinantă, ca proteină de fuziune intracelulară în *Escherichia Coli* și prin secretarea apolipoproteinei AI-Milano, monomer și dimer în mediul de cultură bacterian într-un sistem

de expresie *Escherichia Coli*. Dimerul de apolipoproteină AI-Milano este utilizat sub formă de compoziții sau la prepararea unui medicament, pentru prevenirea bolilor cardiovasculare, a aterosclerozei, a infarctului miocardic, pentru tratarea trombozei și stimularea fibrinolizei.

Revendicări: 8
Figuri: 13

RO 115636 B1



RO 115636 B

Invenția se referă la două procedee pentru prepararea dimerului de apolipoproteină AI-Milano care poate fi utilizat la tratamentul aterosclerozei și al bolilor cardiovasculare precum și ca formule farmaceutice retard de Apo AI-M.

5 Este cunoscută influența nivelurilor ridicate ale colesterolului asupra maladiei cardiace coronariene (CHD), care a fost în mod repetat confirmată prin studii epidemiologice și longitudinale. Însă, definirea mecanismelor complexe ale transportului colesterolului în plasmă a permis recunoașterea unei funcțiuni selective a lipoproteinelor circulante în determinarea riscului de CHD.

10 Există, de fapt, patru lipoproteine majore: lipoproteine de înaltă densitate (HDL), de densitate scăzută (LDL), de densitate foarte scăzută (VLDL) și de chilomicroni (CM). În timp ce CM constituie un produs cu viață scurtă al absorbției de grăsimi intestinale, VLDL și, în special, LDL sunt responsabile de transportul colesterolului în țesuturi, incluzând, de exemplu, pereții arteriali. În contrast, HDL este direct implicată în îndepărtarea colesterolului din țesuturile periferice, ducându-l înapoi, fie la ficat, fie la alte lipoproteine, printr-un mecanism cunoscut ca "transport invers de colesterol" (RCT). Rolul protector al HDL este confirmat de un număr de studii (de exemplu, Miller et al. Lancet, 1977; 965 - 968 și Wayne et al., Atherosclerosis 1981; 39: 411 - 419). În aceste studii, nivelurile ridicate ale LDL, mai puțin cele ale VLDL, par a fi clar asociate cu un risc cardiovascular crescut, în timp ce nivelurile înalte de HDL par să confere protecție cardiovasculară. Rolul protector al HDL este confirmat prin studii *in vivo*, care arată că la iepuri, infuzii de HDL pot întârzia dezvoltarea leziunilor arteriale induse de colesterol (Badimon et al, Lab. Invest. 60, 455 -461, 1989) și/sau pot produce o regresie a acestora (Badimon et al., J. Clin. Invest. 85, 1234-1241, 1990).

25 Recent în studiul mecanismului protector al HDL interesul este concentrat pe apolipoproteina AI (Apo AI), componenta majoră a HDL. Nivelurile ridicate de Apo AI în plasmă sunt asociate cu riscul redus al CHD și prezența leziunilor coronariene (Maciejko et al., N engl J Med 1983; 309:385-389, Sedlis et al., Circulation, 1986; 73:978-984).

30 Apo AI din plasmă este o polipeptidă cu catenă unică de 243 aminoacizi a căror secvență primară este cunoscută (Brewer et al., Biochem Biophys Res Commun 1978; 80: 623-630). Apo AI este sintetizată ca un precursor de aminoacid 267 în celulă. Această pre-pro-apolipoproteină este produsă prin scindarea capătului N-terminal, la început intracelular, când se pierd 18 aminoacizi, și apoi printr-o nouă scindare a 6 aminoacizi în plasmă sau în limfă ca urmare a acțiunii proteazelor specifice.

40 Cerința structurală majoră a moleculei de Apo AI se presupune că este prezența unităților repetitive de 11 sau 22 de aminoacizi, presupuși a exista în conformația elicoidală amfipatică (Segrest et al., FEBS Lett 1974; 38; 247-253). Această structură ține seama de activitățile biologice de bază ale Apo AI, adică, legarea lipidelor și activarea lictin-colesterol-acil transferazei (LCAT).

45 Altă proprietate recent descoperită a Apo AI este activitatea sa antivirală. Aceasta este relatată ca urmare a studiilor *in vitro* și este exercitată, atât față de tulpinile de Herpes virus (Srinivas R V et al., Virology, 1756, 48 - 57, 1990) cât și, față de Virusul imunodeficienței Umane (HIV), (Owe et al., J Clin Invest, 86, 1142-1150, 1990). Această activitate pare să fie exercitată printr-o interacție între porțiunile elicoidale amfipatice ale Apo AI și glicoproteinele de înveliș ale virusurilor.

Studiile *in vitro* arată faptul că unii complecși ai Apo AI și lecitină pot determina scurgerea colesterolului liber din celule arteriale extrase din mușchi netezi

RO 115636 B

(Stein et al., Siochem. Biophys Acta 1975; 380: 106-118). Prin acest mecanism, HDL poate, de asemenea, reduce proliferarea acestor celule (Yoshida et al., Exp. Mol. Pathol 1984; 41: 258-266). 50

Mai recent, infuzia de Apo AI sau de HDL la animale experimentale s-a observat că exercită schimbări biochimice semnificative și totodată, reduce extinderea și severitatea leziunilor aterosclerotice. După prima comunicare făcută de Maciejko și Mao (Atherosclerosis 1982; 2:407a), Badimon et al (vezi cele două studii citate mai sus) au descoperit că se poate reduce semnificativ întinderea leziunilor aterosclerotice (-45%) și conținutul acestora în ester colesterol (-58,5%) la iepuri alimentați cu colesterol prin infuzare cu HDL (d=1,063...1,325 g/ml). S-a descoperit, de asemenea, că infuziile de HDL conduc la o limitare până la regresie a 50% din leziunile stabilite. 55 60

S-a arătat, de asemenea, (Esper et al, Atherosclerosis 1987; 7:523a) că infuziile de HDL pot schimba semnificativ compoziția de lipoproteine a plasmei la iepuri Watanabe cu hipercolesterolemie moștenită, care dezvoltă leziuni arteriale timpurii. La aceștia, infuziile de HDL pot mai mult decât să dubleze raportul între HDL protector și LDL aterogenic. 65

Potențialul HDL de a preveni boala arterială la animale experimentale a fost mai departe stimulat prin observarea că Apo AI poate exercita o activitate fibrinolitice *in vitro* (Saku et al, Thromb Res 1985; 39:1-8). Ronneberger (Xth Int. Congr. Pharmacol, Sidney 1987, p. 990) demonstrează că Apo AI extrasă poate accentua fibrinoliza la câinii de vânătoare și la maimuțe *Cynomologus*. O activitate similară poate fi observată *in vitro* la plasma umană. Acest autor a putut confirma o reducere a depozitului de lipide și a formării plăgii arteriale la animalele tratate cu Apo AI. 70

Apolipoproteina AI-Milano (Apo AI-M) este prima variantă moleculară de Apo AI umană descrisă (Franceschini et al, J Clin Invest 1980; 66:892-900). Ea se caracterizează prin substituția Arg 173 cu Cys (Weisgraber et al, J.Biol Chem 1983; 258:2508-2513). Apolipoproteina mutantă este transmisă ca o trăsătură dominantă autosomală și au fost identificate 8 generații de purtători (Gualandri et al, Am J. Hum Genet 1984; 37:1083-1097). 75

Condiția proteinei Apo AI-M de purtător individual este caracterizată prin tr-o reducere remarcabilă a nivelului HDL-colesterolului. În ciuda acesteia, subiecții afectați nu arată aparent un risc crescut de boală arterială; firește, prin examinarea arborelului genealogic apare că acești subiecți pot fi "protejați" de ateroscleroză. 80

Mecanismul efectului protectiv posibil al Apo AI-M la purtători pare să fie legat de o modificare în structura apolipoproteinei mutante, cu pierderea unui α -helix și o expunere crescută a resturilor hidrofobe (Franceschini et al, J Biol Chem 1985; 260:1632-1635). Pierderea structurii etanșe a structurilor α -helix multiple, conduce la o flexibilitate crescută a moleculei, care se asociază cu lipidele mai ușor față de normal. De altfel, complexii apolipoproteină/lipidă sunt mai susceptibili denaturării, ceea ce sugerează că transferul lipidelor este, de asemenea, îmbunătățit în cazul mutantei. 85 90

Folosirea terapeutică a mutantei apolipoproteinei Apo AI-M este în prezent limitată de lipsa unei metode care să permită prepararea acestor proteine în cantitate suficientă și într-o formă corespunzătoare.

O altă trăsătură foarte specifică a Apo AI-M este capacitatea sa de a forma dimeri cu sine însuși precum și complecși cu Apo AII, în ambele cazuri datorită prezenței restului Cys. Prin studierea fracțiunilor de sânge conținând un amestec de apolipoproteine, s-a observat că prezența dimerilor și a complecșilor în circulație poate 95

RO 115636 B

100 fi responsabilă de eliminarea crescută până la înjumătățirea acestora în purtători, așa cum s-a descoperit recent în studii clinice. (Gregg et al, NATO ARW on Human Apolipoprotein Mutants: From Gene Structure to Phenotypic Expression, Limone SG, 1988).

Dimerii Apo AI-M (Apo AI-M/Apo AI-M) acționează ca un factor inhibitor în interconversia particulelor HDL *in vitro* (Franceschini et al, J Biol Chem 1990; 105 265:12224-12231).

Studii mai recente ale amestecurilor conținând dimer s-au bazat pe Apo- AI-M separată din sânge natural de la persoane cu Apo AI-M, dar care s-a obținut numai în cantități mici.

110 Dificultatea producerii Apo AI, și, în special, Apo AI-M prin fracționarea plasmei este considerabilă (Franceschini et al, J. Biol. Chem. 1985; 260:16321-16325). Izolarea și producerea nu pot fi realizate pe scară mare, deoarece este disponibilă numai o cantitate mică de material brut. În plus, apar diferite riscuri asociate cu produsele de fracționare ale plasmei, cum ar fi contaminarea cu agenți infecțioși. Este esențial ca aceasta să se evite.

115 S-au făcut încercări pentru producerea Apo AI umană prin tehnologia ADN recombinant. Este descrisă prepararea Apo AI din *E. coli*, în **EP 0267703**. Procedul descrie o polipeptidă chimeră, în care fragmentul Apo AI este legat de resturile de aminoacid N-terminal ale *beta*-galactosidazei sau de unul sau mai multe domenii de legare a IgG ale proteinei A sau la pro-secvența din Apo AI umană.

120 Existența Apo AI și Apo AI-M în tulpini de drojdie și folosirea componentelor produse în tratamentul aterosclerozei și bolilor cardiovasculare sunt dezvăluite, în **WO 90/12879**. Genele care codifică Apo AI și Apo AI-M conține secvențe ADN, care codifică o secreție recunoscută de drojdie și semnale de procedeu care aparțin genei pentru proteinele mature. S-a folosit o secvență modificată de lider MF-*alfa*, în care ultimele resturi au fost HisGlySerLeuAspLysArg.

125 Problema, pe care o rezolvă invenția, constă în obținerea dimerului de apolipoproteină-AI-Milano prin procedee mai simple, care evită contaminarea plasmei.

Procedul, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că se produce apolipoproteina-AI-Milano prin tehnologie recombinantă ca proteină de infuzie în *E. coli*, scindând apolipoproteina AI-Milano cu acid formic, iar apoi convertind orice monomer prezent în dimer prin oxidare și ulterior purificând dimerul într-o formă efectiv pură. Procedul analog, conform invenției, constă în producerea apolipoproteinei-AI-Milano prin tehnologie recombinantă, secretând apolipoproteina- AI-Milano, monomer și dimer în mediul de cultură bacterian într-un sistem de expresie 135 *E. coli*, iar apoi convertind orice monomer prezent în dimer prin oxidare și ulterior purificând dimerul într-o formă efectiv pură.

Prezența invenției are următoarele avantaje:

140 - dimerul obținut are o puritate mai mare de 90%, și chiar mai mare de 98% și are un efect surprinzător mai bun asupra sistemelor biologice comparativ cu Apo AI;

145 - dimerul purificat Apo AI-M/Apo AI-M are o perioadă de înjumătățire a plasmei prelungită comparativ cu monomerul Apo AI-M, în afară de aceasta are o activitate superioară de stimulare a fibrinolizei, în comparație cu Apo AI-normal, de exemplu, abilitatea sa de a activa direct plasminogenul (care normal nu este Apo AI), o observație care poate fi importantă din punct de vedere biologic și, de asemenea, posibilitatea sa de a acționa ca precursor pentru Apo AI-M.

RO 115636 B

Se formează, de asemenea, particule de HDL reconstituite/lipoproteină de densitate înaltă) de o unică mărime cum nu s-a găsit la particulele HDL recombinant care conțin Apo AI-M sau Apo AI.

Dimerii puri de apolipoproteina-AI-Milano, numiți Apo AI-M/Apo AI-M, au o puritate de cel puțin 90%, preferabil, cel puțin 98%, s-au izolat și caracterizat din plasmă prin cele două procedee analoge, s-au produs pentru prima dată prin metode recombinante. Ei pot fi utilizați în compoziții farmaceutice cuprinzând Apo AI-M/Apo AI-M, eventual, împreună cu un agent de stabilizare, de exemplu, un compus de stabilizare pe bază de lipidă, cum este o fosfolipidă și/sau un material de suport. 150 155

Compozițiile farmaceutice pot, de asemenea, conține un agent cu conținut mic de lipide și/sau alte medicamente deja cunoscute în tratamentul aterosclerozei și bolilor cardiovasculare cum este heparina, fracțiuni de heparină, fragmente de heparină sau agenți cu conținut scăzut de lipide.

Dimerul de apolipoproteină Apo AI-M poate fi produs, conform prezentei invenții, prin: 160

a) obținerea apolipoproteinei AI-Milano prin tehnologie recombinantă ca proteină de fuziune intracelulară în *E. coli*, scindarea apolipoproteinei AI-Milano cu acid formic și apoi, convertirea oricărui monomer prezent în dimer; sau

b) producerea apolipoproteinei AI-Milano prin tehnologie recombinantă în care apolipoproteina AI-Milano, monomer și dimer, este secretată într-un mediu de cultură bacterian într-un sistem în care se găsește *E. coli* și oricare monomer prezent este convertit apoi la dimer și purificarea dimerului la o formă efectiv pură. 165

Conform punctului a) Apo AI-M este produsă ca o proteină de fuziune intracelulară în bacterii. Partenerul de fuziune este o IgG modificată ca domeniu de legătură din proteina A și o poziție de scindare pentru acidul formic este desemnată între partenerul de fuziune și Apo AI-M. După distrugerea celulară a bacteriilor, proteina de fuziune s-a purificat pe IgG imobilizată și s-a scindat cu acid formic. Prezența Apo AI-M și a dimerului este indicată prin metode de uscure Western, prin electroforeză pe gel SDS. 170 175

Dimerul Apo AI-M poate fi, de asemenea, obținut prin:

c) colectare de plasmă de la purtătorii de apolipoproteină AI-Milano, izolarea apolipoproteinelor HDL, separarea dimerului prin folosirea cromatografiei, de exemplu cromatografia pe Sephacryl, în mai multe trepte sau

d) colectare de plasmă de la purtătorii de apolipoproteină AI-Milano, purificarea monomerului și apoi, convertirea la dimer și purificarea dimerului la o formă efectiv pură. 180

Este important ca separarea din faza c) să fie efectuată în mai multe trepte, preferabil pe o coloană lungă, cum este cea de 300 cm. Dacă este prezent monomerul, el va trebui întotdeauna să fie convertit la dimer, așa cum se prezintă în exemplele următoare. 185

Dimerul este utilizat la tratarea aterosclerozei și a bolilor cardiovasculare precum și la prepararea unui medicament. Dimerul poate acționa, de asemenea, ca un precursor de medicament pentru monomer în tratamentul aterosclerozei și bolilor cardiovasculare. 190

Acest medicament poate fi folosit pentru tratarea aterosclerozei și bolilor cardiovasculare și pentru prevenirea și tratarea bolilor cardiocirculatorii majore cum sunt infarctul miocardic, angina instabilă, ocluzii vasculare periferice și restenoza post angioplastie coronariană.

RO 115636 B

195 Când sunt tratate condițiile arteriale cronice, sunt tratate, atât coronarele, cât și arterele periferice care sunt caracterizate prin placă ocluzivă. Dimerii vor fi folosiți pentru infuzie intrinsecă cu scopul de a induce îndepărtarea grăsimii din plăci sau, eventual, în asociere cu tratamente stabilite pentru ateroscleroză și boli cardiovasculare, cum este folosirea heparinei, fracțiunilor de heparină și fragmentelor de heparină și/sau medicamente care reduc nivelurile de circulație ale lipoproteinelor atero-
200 genice.

Medicamentul care conține dimerul poate fi folosit pentru prevenirea și tratarea trombozei în diferite cazuri clinice și poate fi folosit în stimularea fibrinolizei.

205 Structurile amfipatice sunt prezente în număr extins în dimerul Apo AI-M și dimerul se pare că are un efect antiviral.

În continuare, se dau 10 exemple de realizare a invenției, în legătură și cu fig. 1...13:

- fig. 1 și 2 ilustrează dependența randamentului, în procente, de concentrația proteinelor;

210 - fig. 3, ilustrează cinetica formării Apo AI-M/Apo AI-M într-o perioadă de timp de 24 h;

- fig. 4, ilustrează grupul de legătură sintetic;

- fig. 5, ilustrează plasmida;

- fig. 6, ilustrează analiza Western după scindarea proteinei de fuziune;

215 - fig. 7, ilustrează spectrul UV al Apo AI-M/Apo AI-M;

- fig. 8...10, ilustrează spectrele UV ale derivatului secundar;

- fig. 11, ilustrează spectroscopia de fluorescență;

- fig. 12, ilustrează spectroscopia CD;

- fig. 13, ilustrează rHDL conținând Apo AI, Apo AI-M și Apo AI-M/Apo AI-M.

220 **Exemplul 1. Izolarea dimerului din plasmă**

a). *Prepararea apolipoproteinelor*

Se colectează probe de sânge rezistente pe Na₂-EDTA (1 mg/ml) de la diferiți purtători de Apo AI-M și se prepară plasmă prin centrifugare la viteză joasă, la 4°C. Lipoproteinele de densitate înaltă (HDL, d=1,063...1,21 g/ml) din plasmă se izolează
225 prin centrifugare secvențială (Havel RJ, Eder Ha, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J.Clin. Invest. 1955; 34, 1345...1354) într-o ultracentrifugă Beckman L5-50B echipată cu un rotor 50,2 Ti. După o ultracentrifugare de 48 h, la 40000 rot/min, la 4°C, fracțiunea de vârf conținând HDL se diluează 1:1 cu NaCl 0,15 M, 0,01% Na₂-EDTA, soluție de KBr (pH=7,4; d=1,21 g/ml) și se recentrifughează la 40000
230 rot/min, la 4°C, timp de 48 h. HDL se dializează exhaustiv față de NH₄HCO₃ 5mM, Na₂-EDTA 0,01%, pH=7,4, se liofilizează și se delipidizează cu dietileter/EtOH (3:1 v/v). Concentrația proteinelor se măsoară, fie prin analiza aminoacizilor, fie prin metoda lui Lowry et al (Lowry OH, Rosenbrought NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem 1951; 193, 265...275).

235 b). *Izolarea Apo AI-M/Apo AI-M*

Pentru izolarea Apo AI-M/Apo AI-M, apolipoproteinele HDL din exemplul 1a) sunt solubilizate în tampon Tris-HCl 0,1M, Na₂-EDTA 0,04%, NaN₃ 0,01%, pH=7,4, conținând o soluție 6M guanidină HCl (Gdn-HCl). Apolipoproteinele sunt trecute pe o coloană Sephacryl S-399 HR (2,6 x 150 cm) echilibrată cu 0,1 M Tris-HCl, 0,04% Na₂-EDTA, 0,01% NaN₃, pH=7,4, cu conținut de Gdn-HCl 4M și 0,1% 2-mercaptoetanol. Apolipoproteinele sunt eluate cu aceeași soluție tampon, la o viteză
240 de 1,5 ml/min și se colectează fracțiuni de 10 ml.

RO 115636 B

- Fracțiunile colectate care conțin Apo AI-M/Apoi AI-M se concentrează sub vid și se repun pe aceeași coloană. 245
- Fracțiunile colectate, care conțin Apo AI Apo AI-M purificat sunt dializate față de o soluție 5mM de NH_4HCO_3 , 0,01% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, la $\text{pH}=7,4$, se liofilizează și se păstrează la -20°C în Tris-HCl 0,1 M, 0,04% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,01% NaN_3 , $\text{pH}=7,4$ conținând o soluție Gdn-HCl și 3M.
- Preparatele Apo AI-M/Apoi AI-M sunt de puritate 98%, conform determinării prin HpSEC și SDS-PAGE. 250
- Prin această metodă s-a izolat dimerul pur de Apo AI-M din plasmă.
- Exemplul 2.** Purificarea monomerului din plasmă și transformarea lui ulterioară în dimer
- a). Purificarea Apo AI-M 255
- Pentru purificarea monomerului Apo AI-M, apolipoproteinele HDL din exemplul 1 a) se dizolvă în 0,1 M Tris-HCl, 0,04% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,01% NaN_3 , $\text{pH}=7,4$, conținând Gdn-HCl 6M și 2-mercaptoetanol 1%.
- După 4 h de incubare la 37°C , Apo-HDL redusă se aplică pe o coloană Sephacryl S-200 (2,6 x 150 cm) echilibrată cu 0,1 M Tris-HCl, 0,04% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,01% NaN_3 , $\text{pH}=7,4$ conținând Gdn-HCl 4M și 0,1% mercaptoetanol. Apolipoproteinele se eluează cu același tampon, la o viteză scăzută de 1,0 ml/min, se colectează fracțiuni de câte 5 ml. Fracțiunile colectate corespunzătoare AI + Apo AI-M se dializează față de NH_4HCO_3 5mM, 0,01% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, $\text{pH}=7,4$ și se liofilizează. 260
- Apolipoproteinele au fost dizolvate în tampon 0,1 M Tris-HCl, 0,04% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,01% NaN_3 , $\text{pH}=7,4$ conținând Gdn-HCl 6 M și 1% 2-mercaptoetanol. După 4 h de incubare la 25°C , este îndepărtat 2-mercaptoetanolul prin cromatografie pe Sephacryl G25 și apoi, imediat sunt trecute pe o coloană Thyopropyl-Sepharose (1x10 cm) echilibrată cu Tris-HCl 0,1M, 0,04% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,01% NaN_3 , $\text{pH}=7,4$ conținând o soluție Gdn-HCl 4M. După recirculare peste noapte, la o viteză de curgere scăzută (0,15 ml/min), Apo AI normală este eluată cu Tris-HCl 0,1 M, 0,04% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,01% NaN_3 , $\text{pH}=7,4$ conținând o soluție Gdn-HCl 4M. Apo AI-M este eluată apoi cu aceeași soluție tampon, care conține Gdn-HCl 4 M și 1% 2-mercaptoetanol. Fracțiunile care conțin Apo AI-M se comasează, se dializează cu NH_4HCO_3 3,5 mM, 0,01% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, $\text{pH}=7,4$, se liofilizează și se mențin la -20°C în Tris-HCl 0,1 M, 0,04% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,01% NaN_3 , $\text{pH}=7,4$ conținând o soluție 3M Gdn-HCl și 0,1% 2-mercaptoetanol. Preparatele Apo AI-M au o puritate mai mare de 98% verificată prin HPSEC, SDS-PAGE și concentrare izoelectrică. 265
- b). Sinteza Apo AI-M/Apoi AI-M 270
- Soluțiile de Apo AI-M sunt dializate cu tampon Tris-HCl 25 mM, $\text{pH}=9,0$. Apo AI-M redus este diluat la concentrația finală dorită (3,6...53,6 μM) cu tampon Tris-HCl 25 mM, care conține glutathion redus (GSH) (1...5 mM) și se preincubează la 25°C , timp de 5 min. Oxidarea este inițiată prin adăugare de glutathion oxidat (GSSG) (0,1...10 mM) și are loc în tuburi subțiri închise, la aceeași temperatură, timp de 24 h. Oxidarea este urmărită prin SDS-PAGE. După colorare și decolorare, gelurile sunt analizate cu un densimetru cu laser LKB Ultrascan XL, iar distribuția procentuală a benzilor de proteine individuale este calculată cu software-ul LKB 2400 Gelscan XL. Vitezele de oxidare sunt urmărite prin HPSEC. 275
- Pentru optimizarea sintezei dimerului se efectuează experimentări de oxidare adițională în prezență de GSH/GSSG+Gdn-HCl și GSH/GSSG+tioeredoxină (Pigiet VP et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1986; 83:7643-7647). 280
- 290

RO 115636 B

Oxidarea Apo AI-M se efectuează în tuburi închise, în prezența unor concentrații variabile de glutatation redus/oxidat (GSH/GSSG). Randamentul reacției dimerului este dependent, atât de concentrația proteinei (fig. 1, tabelul 1) cât și de raportul concentrațiilor GSH/GSSG (fig.2, tabelul 1). Prin creșterea concentrației proteinei de la 8,9 μM, până la 53,6 μM, procentajul de apo AI-M/Apo AI-M crește cu 26%...51% (fig. 1, tabelul 1). O scădere a raportului molar GSH/GSSG de la 1/2 până la 1/16 determină o reducere cu 43% a randamentului; pe de altă parte, creșterea concentrației GSH/GSSG, la un raport molar constant GSH/GSSG, este corelată cu creșterea cu 42% a formării Apo AI-M/Apo AI-M (fig.2, tabelul 1). Atât, temperatura de reacție, cât și prezența unui denaturant al proteinei (Gdn-HCl) nu afectează gradul de producere a Apo AI-M/Apo AI-M. Are loc o formare semnificativă de Apo AI-M/Apo AI-M și prin incubarea Apo AI-M cu GSH/GSSG în prezența 0,2 mM tioredoxinei (tabelul 1).

Cinetica reacției de oxidare este urmărită prin HPSEC analitic. Apo AI-M dă picuri distincte ca dimer și monomer, cu timp de retenție de 10,8 și, respectiv, 12,7 min. Sinteza AI-M/AI-M (GSH/GSSG, 2mM/4mM, concentrația de 8,9 μM a AI-M) este aproape terminată după 3 h; o prelungire a incubării până la 24 h, nu a mai mărit formarea de AI-M/AI-M (fig.3).

Tabelul 1

Proteină (μM)	GSH (mM)	GSSG (mM)	Randament (%)	Observații
3,6	1,0	0,1	34,8	0,2 mM tioredoxină
8,9	1,0	2,0	9,1	
8,9	1,0	2,0	9,9	4°C
8,9	1,0	4,0	7,2	
8,9	1,0	4,0	7,7	4°C
8,9	1,0	8,0	6,6	
8,9	1,0	16,0	5,2	
8,9	2,0	4,0	19,6	
8,9	4,0	8,0	18,7	
8,9	5,0	10,0	23,9	
8,9	1,0	2,0	9,8	4M Gdn-HCl
17,9	2,0	4,0	23,3	
17,9	4,0	8,0	25,5	
17,9	5,0	10,0	27,5	
35,7	2,0	4,0	25,9	
35,7	4,0	8,0	27,7	
35,7	5,0	10,0	27,9	
53,6	2,0	4,0	25,4	
53,6	4,0	8,0	30,4	
53,6	5,0	10,0	36,1	

RO 115636 B

Condiții de reacție: tampon Tris-HCl 25 mM, pH=9,0

temperatura: 25°C

timpul: 24 h

335

Exemplul 3. *Producerea prin tehnologie recombinantă a Apo AI-M/Apo AI-M*

În acest exemplu se arată că Apo AI-M poate fi produsă prin metoda *E. coli* recombinantă și că se formează dimeri. Totuși folosirea acidului formic conduce la un produs secționat, cu doi aminoacizi la atomii săi de N terminali. Secționarea nu presupune alterarea activității moleculei de Apo AI-M.

340

a). *Construcția vectorului de expresie pKP644*

Forma replicativă a bacteriofagului M13mp18, care conține cADN-ul ce codifică proteina Apolipo AI-M (Sharpe CR et al, Nucleic Acids Research, volumul 12, no.9, p. 3917, 1984 și Cheung MC et al, Biochem. Biophys. Acta 960, pp. 73-82, 1988) se digerează cu enzima de restricție BamHI și se purifică prin electroforeză în gel de agaroză cu temperatură de gelificare scăzută (LGT). Fragmentul de 822 pb, care corespunde la gena po AI-M se taie și se leagă de plasmida pUC9, digerată în prealabil cu BamHI și tratată cu fosfodiesterază din intestine de vițel.

345

Amestecul de legare este utilizat pentru a transforma componenta *E. coli* JM83 și se culeg coloniile albe din plăcile de agar ce conțin ampicilină, X-Gal și IPTG. Se prepară plasmida DNA și se purifică pe coloane QuiaGene (QuiaGene Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Cal. 91311 USA) conform cu recomandările fabricantului. Plasmida derivată, denumită pUC/Apo AI-M este digerată cu EcoRI și NcoI. O parte alicotă din amestecul de digestie este analizată prin electroforeză în agaroză, pentru a confirma orientarea corectă. O altă parte alicotă este utilizată pentru a lega agentul de legare sintetic "Δ ApoAI-Eco" (fig.4) de capătul 5' al genei Apo AI-M pentru a genera gena ΔapoAI, care constă din 724 bp. Secvența ΔapoAI generează un loc Asp-Pro la N terminal al proteinei codificate, care ușurează scindarea cu acid formic. Componenta *E. coli*, care este transformată cu amestecul de legare și plasmida derivată (denumită pUC/ΔApo AI-M) este izolată pe coloane QuiaGene ca mai sus.

350

355

360

Plasmida pUC/ΔApo AI-M și vectorul de expresie pEZZ sunt digerate cu EcoRI și BamHI, se purifică prin electroforeză în agaroză LGT și fragmentul de 799 bp al pUC/ΔApo AI-M se leagă de fragmentul de 2763 pb al pEZZ. Amestecul de legare este utilizat pentru a transforma componenta *E. coli* RV 308, iar plasmida DNA a fost preparată ca mai sus.

365

Pentru procedeele experimentale vezi J. Sambrook, E.F.Fritsch și T. Maniatis (1989) Molecular Clonings; A Laboratory Manual, 2nd edit. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. Plasmida derivată este denumită pKP644 (fig.5).

b). *Expresia proteinei de fuziune ZZ-ΔApo AI-M*

370

40 de ml de cultură *E. coli* RV308/pKP644 lăsată peste noapte, crescută la 30°C, în LB cu 50 mg/ml kanamicină, este inoculată în 2 x 500 ml mediu A minimal (Curr. Meth. In Mol. Biol.) Cu adăugarea a 0,2 g/l de acizi Casamino, 1mM MgSO₄, 0,25% glucoză și 50 mg/ml kanamicină. Cultura este incubată la 37°C, timp de 24 h, sub agitare energetică.

375

c). *Purificarea inițială a Apo AI-M*

1,0 l de cultură *E. coli* (RV308/pKP644), care conține plasmida descrisă este centrifugat, iar celulele pelete se resuspendă în 30 ml de 1 x TS (Tris HCl 25 mM, 0,2M NaCl, 1mM EDTA) și GdnHCl 6M și se omogenizează printr-o singură trecere printr-o presă franceză (SLM Instruments Inc.) La o presiune de lucru de 29,5 at. Suspensia obținută se incubează la temperatura camerei cu o agitare ușoară, timp de

380

RO 115636 B

o oră și se centrifughează. Supernatantul este apoi diluat la concentrație finală a GdnHCl de 1mM(adică de 6 ori) și se încarcă pe o coloană cu curgere rapidă încărcată cu 15 ml de Sepharose IgG echilibrată cu 1 x TS. După încărcare, coloana se
385 spală cu 5 volume de coloană de 1 x TS, apoi cu acetat de amoniu 20 mM pH=5,4 până când pH-ul eluatului atinge valoarea 5,4. Materialul legat este eluat cu 25 ml Hac și se înregistrează absorbția la 280 nm (A_{280}). Randamentul la un litru de cultură este 1,9 mg bazat pe valoarea A_{280} .

d). Scindarea proteinei de fuziune

390 Eluatul este împărțit în părți alicote, liofilizat și resuspendat în acid formic 75%, 50% și, respectiv, 25%. Soluțiile se incubează la 37°C, timp de 28 h și după aceea se liofilizează pentru a îndepărta acidul formic. Produsele scindate sunt analizate folosind SDS-PAGE, apoi o analiză Western. Aproximativ 5 mg de proteină totală se
395 încarcă pe gel SDS-PAGE gradient 8...25% în condiții nereducătoare. Probele se efectuează în duplicat. Un gel este pătat cu Coomassie și unul este utilizat pentru analiza Western. Rezultatele sunt redată în fig.6. Unul din produsele de clivare comigrează cu Apo AI nativ purificat și produce un semnal în analiza Western. Analiza
400 Western se efectuează utilizând anticorpi policlonali conjugați cu peroxidază de hrean (The Binding site Ltd; Cambridge; England) și se evidențiază prin procedee standard.

400 Fig. 6 redă analiza proteinelor rezultate după scindarea proteinei de fuziune. Panoul A: gel Coomassie pătat SDS-PAGE (8...25%). Linia 1: 25% acid formic, linia 2:50% acid formic; linia 3: 75% acid formic; linia 4:Apo AI nativ purificat (Sigma) și linia 5: marker LMW (Farmacia). Panoul B:analiza Western a gelului duplicat. Linia
405 1: Apo AI nativ purificat (Sigma); linia 2: 75% acid formic; linia 3: 50% acid formic și linia 4: 25% acid formic. Prezența unei benzi la dublul greutatea moleculară a Apo AI-M în analiza Western arată că sunt prezenți dimerii Apo AI-M.

Exemplul 4. Producerea de Apo AI-M în bioreactoare

Construcția vectorilor pentru secreția directă a Apo AI-M în spațiul periplasmatic și mediul de creștere

410 În acest exemplu este arătat procedeul care constă în producerea apolipoproteinei AI-Milano prin tehnologie recombinantă, în care apolipoproteina AI-Milano, monomer și dimer, este secretată într-un mediu de cultură bacterian într-un sistem în care se găsește *E.coli* și oricare monomer prezent este convertit apoi la dimer și purificarea dimerului la o formă efectiv pură formându-se molecula corect completată.

415 Construcția vectorilor pentru secreția directă a Apo AI-M pe spațiul periplasmatic și mediul de creștere.

Tulpini și vectori. Tulpinile Escherichia coli K12 utilizate sunt HB101 F, hsd S20 (rB⁻, mB⁻) supE44, HB101 F, hsd S20 (rB⁻, mB⁻), supE44, ara14, i⁻, galK2, lacY1, proA2, rspL20, xzl-5,mtl-1, recA13, rB⁻, mB⁻, mcrA(+), mcrB(-) (Boyer et al., 1969, J. Mol. Biol. 41:459-472), DH5a F, F80DlacZDN15, D(lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, gyrA, I⁻, thi-1, hsdR17 (r_k⁻, M_k⁺), supE44, re1A1, (BRL USA). RV308 DlacX74, galOP::IS2(galOP308),strA, I⁻ (Maurer et al., 1980, J. Mol. Biol. 139:147-161) și BC50 xy -7, ara-14, T4-R, I⁻. Tulpinile HB101 și DH5a se folosesc pentru subclonarea fragmentelor de DNA. Plasmida pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene 19:259-268) se
420 utilizează pentru subclonarea unui fragment BamHI de 820 pb al unei copii c-DNA de Apo AI uman obținut de la S.Sidoli (Milano). Secvența de nucleotidă de cDNA Apo AI uman se poate obține de la Geneank sub numărul de înregistrare X02162 (Seilhammer et al., 1984, AND 3:309-317). Acest vector este denumit pKP575. De asemenea, un fragment Eco RI-Pst I de 856 bp din DNA Apo AI-M uman (copie cDNA
425 obținută de la S.Sidoli), s-a subclonat în plasmida pUC9.

RO 115636 B

Acest derivat este denumit pKP576. Plasmidele pKP683 și pKP764 sunt derivate ale plasmidei pTrc 99 (Amann et al., 1988, Gene 69:301-315) și a unui derivat pUC cu transposonul (Tn903) derivat de la markerul rezistent la kanamicină din pUC4-K (Vieira et al., 1982, Gene 19:259-268 și Oka et al., 1981. J. Mol. Biol. 147:217) și terminatorii de transcripție (T1T2) ai bacteriofagului fd, din pUEX2 (Bressan et al., 435 Nuclei Acid Res. 15:10056).

Metode întrebuintate. Tulpinile bacteriene se cultivă pe mediu Luria Bertani (LB) sau pe mediu de triptonă de drojdie (2xYT) cu ampicilină (Ap) 50 μg/ml sau kanamicină (Km) 70 μg/ml pentru prepararea plasmidei DNA și pentru analiza de expresie la scară mică (Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratorz 440 Press). Baza de agar cu triptoză din sânge (Difco, USA), suplimentată cu 50 μg/ml Ap sau 70 μg/ml Km, se utilizează pentru creșterea de celule pe plăci de agar. Se aplică tehnicile DNA recombinant coform cu Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratorz Press. Endonucleazele de restricție și ligaza T4 AND s-au obținut de la Boehringer Mannheim (Germania), New England Biolabs (Beverly, USA) sau 445 Pharmacia (Uppsala, Suedia). Izopropil-b-D-galactozidul (IPTG) se obține de la firma Sigma (USA). Se utilizează agaroză cu gelifiere și temperatură de topire scăzute (NuSieve GTG, FMC Bioproducts, USA) pentru a izola fragmentele DNA. Amplificările PCR se efectuează utilizând aparatul cu ciclu termic DNA și polimeraza Taq AND de la Perkin-Elmer/Cetus Instruments (Norwalk, USA). Linkerii oligonucleotidelor sunt 450 sintetizați pe un aparat Pharmacia-LKB Gene Assembler Plus de la Pharmacia (Uppsala, Suedia) utilizând metoda cu triester fosfit pe fază solidă. Determinarea secvenței de nucleotidă se realizează pe un aparat de secvențare a DNA, Applied Biosystem 373A, utilizând trusa de secvențare cu ciclu terminator Taq DyeDeoxy™ de la Applied Biosystem (USA). 455

Programele de calculator DNA utilizate

Se utilizează programul MacIntosh PlasmidARTIST (versiunea 1.2) (Clontech, USA) pentru desenarea hărților plasmidei și se utilizează GCG Sequence Analysis Software Package (Genetics Computer Group, Inc., Madison Wisconsin, USA) pentru manipularea secvențelor DNA pe calculatoarele Digital VAX. 460

Construcția, expresia și secreția Apo AI-M în bacterii.

Scopul construcțiilor de vectori este obținerea unui sistem de producere a secreției pentru Apo AI-M în E.coli cu o cantitate foarte mare de Apo AI-M secretată în mediul de creștere.

Se sintetizează două oligonucleotide pentru legarea copiilor de Apo AI și Apo 465 AI-M cADN la fragmentele DNA, care codifică secvențele bacteriene semnal. Fragmentul de 14 bp EcoRI și NcoI și fragmentul de 40 bp NcoI al pKP757 este reamplasat de către un fragment sintetic de 37 pb EcoRI NcoI într-o plasmidă denumită pKP580. Locul de scindare BbsI din acest fragment sintetic DNA este același ca și M1ul, care facilitează clonarea diferitelor fragmente ce codifică sec- 470 vențele bacteriene semnal. Plasmida pKP631 este construită prin înlocuirea unui fragment de 702 bp NcoI-DraIII al pKP575 (Apo AI) cu un fragment de 702 bp NcoI-DraIII al pKP576 (Apo AI-M). Din plasmida pKP631 se izolează un fragment BbsI-HindIII de 820 bp și se inserează la M1ul și HindIII al unui vector plasmidă care este denumit pKP682. Acest vector conține un promotor tac (Ptac), un derivat al unei sec- 475 vențe semnal ompA, două terminatoare de transcripție și un marker rezistent la kanamicină. Se izolează un fragment de 1501 bp NruI-NruI din pKP682 și se inserează într-un vector similar dar cu Ptac înlocuit cu promotorul Ptrc. Acest vector de expresie este denumit pKP683.

RO 115636 B

480 Plasmida pKP764 este construită prin înlocuirea fragmentului Dralll-HindIII de 88 bp al pKP683 cu un fragment sintetic DNA de 14 bp, care conține terminatori de translație mai puternici și distrugerea locului Dralll prin introducerea unui A la capătul unde este supralegat Dralll la terminația 3'.

485 Transformarea tulpinilor *E. coli* se efectuează conform descrierii lui Sambrook și alții, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Construcțiile plasmidelor utilizate pentru experimentele de expresie și pentru producerea de Apo Al-M sunt analizate din punct de vedere al redării structurii lor cu enzima de restricție, iar gena structurală a Apo Al-M este confirmată de determinarea secvenței de nucleotidă. Tulpinile *E. coli* cu plasmidele corespunzătoare utilizate pentru creșterea în bioreactoare se prepară
490 astfel: celulele sunt lăsate să crească peste noapte în mediu LB sau 2xYT suplimentat cu Km în baloane la 30°C. După centrifugare, celulele sunt resuspendate 0,5 volum de mediu de depozitare cu înghețare avansată conform cu Gergen și alții, 1979, Nucleic Acid Res. 7:2115. Părți alicote sunt răspândite în crioampule de 1 ml și depozitate la -75°C, până la folosire.

495 Mediile de creștere pentru creșterea celulelor în bioreactoare. Mediul A: 16 g/l triptonă (Difco, USA), 8 g/l extract de drojdie (Difco, USA), 5 g/l NaCl și 0,05 g/l kanamicină. Mediul B: 2,5 g/l (NH₄)₂SO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 2 g/l K₂HPO₄, 0,5 g/l Na₃-citrat, 5 g/l extract de drojdie (Difco, USA). După sterilizare, mediul este suplimentat cu: 10 g/l glucoză inițială, 0,05 g/l kanamicină, 1 g/l MgSO₄ x 7 H₂O
500 și 0,07 g/l clorhidrat de tiamină. Se adaugă o soluție cu urme de elemente (1ml/l) și o soluție de vitamine (0,65 ml/l). Soluția cu urme de elemente conține: 27 g/l FeCl₃ x 6 H₂O, 4 g/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 g/l CoCl₂ x 6 H₂O, 7 g/l Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 8 g/l CuSO₄ x 5 H₂O, 2 g/l H₃BO₃, 5 g/l MnSO₄ x 4 H₂O, 11 g/l CaCl₂ x 2 H₂O și 50 ml/l Hcl. Soluția de vitamine conține: 0,5 g/l pantotenat de calciu, 0,5 g/l clorură
505 de colină, 0,5 g/l acid folic, 1 g/l inositol, 0,5 g/l nicotinamidă, 0,5 g/l clorhidrat de piridoxină, 0,05 g/l riboflavină și 0,5 g/l clorhidrat de tiamină. Ca antispumant se utilizează adeganol (0,2 ml/l). Când a este necesar, se adaugă antispumant în timpul cultivării.

Cultivarea RV308/pKP683 într-un bioreactor de 3,5 l

510 Cultura stocată înghețată puternic este utilizată pentru a inocula 500 ml mediu A și se precultivă în baloane Erlenmeyer de 2 l cu șicană, la 30°C, timp de 8...10 h. Un volum de inocul corespunzător la 10% din volumul util de lucru al reactorului este transferat în bioreactor. Cultivarea se efectuează într-un bioreactor de 3,5 l (Belach AB, Suedia) cu un volum de lucru de 2,5 l. Temperatura este de 30°C, în timpul fazei
515 de creștere înainte de inducție, iar apoi crește la 37°C, pH-ul menținându-se la 7,0 cu o soluție de amoniac 25%. Viteza de aerare este menținută la 1 vvm și tensiunea oxigenului dizolvat (D.O.T.) este menținută la 30% prin modificarea vitezei elicei. După ce s-a consumat glucoza inițială, este inițiată o șarjă de alimentare cu glucoză, menținând sistemul la limitarea glucozei prin alimentarea cu o soluție de 60% glucoză.
520 Debitul inițial de alimentare, 0,04 g/min este menținut, timp de 3 h și apoi este crescut treptat la 0,04 g/min în decurs de 3 h. Creșterea celulelor este înregistrată urmărind densitatea optică (OD). Concentrația Apo Al-M în supernatant este determinată prin radioimunoanaliză (trusa Apolipoproteină Al RIA 100, art. nr. 109152-01, Kabi Pharmacia, Suedia). După 12 h de cultivare, la o valoare OD de 58, sinteza
525 proteinei este indusă prin adăugare de IPTG 0,5 mM, iar temperatura s-a ridicat la 37°C, după 4 h de la inducere, concentrația de Apo Al-M este de 2,3 g/l, iar după alte 2 h concentrația este de 2,5 g/l.

RO 115636 B

Cultivarea BC50/pKP764 într-un bioreactor de 3,5 l

Cultivarea se realizează așa cum a fost descris mai înainte, dar nu se mai adaugă kanamicină în mediul din bioreactor. După 15 h, la o valoare OD de 60, se adaugă IPTG și se ridică temperatura. După 10 h, concentrația de Apo AI-M în supernatant este de 3,7 g/l, iar după 22h de la inducere, concentrația este de 4,4 g/l. 530

Cultivarea BC50/pKP764 într-un bioreactor de 300 l

Se utilizează un bioreactor de 300 l (Chemoferm AB, Suedia) cu un volum de lucru de 180 l. Inoculul este preparat așa cum a fost descris mai înainte pentru creșterea RV308/pKP683 într-un bioreactor de 3,5 l, exceptând faptul că timpul de precultivare în baloanele aflate sub agitare este de 14 h. Inoculul este transferat într-un bioreactor de însămânțare de 50 de l cu un volum de lucru de 18 l. Mediul utilizat în baloanele aflate sub agitare precum și în bioreactor este mediul A. Mediul din bioreactorul de însămânțare este suplimentat cu 5 g/l glucoză și temperatura a fost de 30°C, pH-ul și aerarea sunt cele descrise mai sus pentru creșterea RV308/pKP683 într-un bioreactor de 3,5 l și D.O.T. nu a fost niciodată sub 30%. Când cultura a ajuns la o valoare OD de 4, conținutul bioreactorului de însămânțare este transferat în bioreactorul de 300 l. În acest bioreactor, temperatura, pH-ul și aerarea mediului sunt cele descrise mai sus pentru creșterea RV308/pKP683 într-un bioreactor de 3,5 l. Înainte de inducere D.O.T. este menținut la, sau peste 30% prin creșterea vitezei elicei până la maximum, iar după aceea prin creșterea presiunii aerului. După inducere, presiunea aerului se mărește la 2 bar, conducând la un D.O.T. de 15...20%. După 16 h de cultivare în bioreactor, când cultura are o valoare OD de 51, se adaugă IPTG și temperatura se mărește la 37°C. 540 545 550

Concentrația Apo AI-M ca monomer și dimer este de 1,3 g/l, la 5 h după inducere și în cursul următoarei ore, în timp ce bioreactorul s-a răcit, concentrația Apo AI-M crește la 1,5 g/l.

Tot monomerul prezent este transformat în dimer și purificat, conform metodelor cunoscute. 555

Exemplul 5. *Caracterizarea Apo AI-M/Apo AI-M din plasmă*

Apo AI-M/Apo AI-M din exemplul 1 purificat dă o singură bandă în gelurile SDS-PAGE nereduse, supraîncărcate. În SDS-PAGE analitice, greutatea moleculară aparentă a proteinei este, cum era de așteptat, de 56 kD. Apo AI-M/Apo AI-M prezintă o structură izoformă complexă, caracterizată prin prezența a cel puțin 6 benzi diferite de proteină, în intervalul 5,3...5,6 pI, în gelurile IEF nereduse, denaturate. 560

Spectrul UV al Apo AI-M/Apo AI-M (1,1 mg/ml) prezintă un maximum tipic de absorbție la 280 nm, cu un prag la 290,2 nm [fig.7]. Proteina calculată E (1 cm, 1%) la 280 nm este de 16,9. Pentru a evalua expunerea reziduurilor tirozinei în Apo AI-M/Apo AI-M, se efectuează o a doua analiză derivată a spectrului UV, așa cum este descris de Ragone și alții "Determinarea expunerii tirozinei în proteine prin spectroscopia derivatei a doua", *Biochemistry* 1984; 23: 1871-1875. A doua derivată a spectrului UV prezintă în mod tipic, două minime în jurul a 283 și 290 nm și două maxime în jurul a 287 și 295 nm [fig.8-10]. Gradele relative de expunere a tirozinei [alfa] calculate pentru Apo AI-M/Apo AI-M nativ și Apo AI-M/Apo AI-M + DMPC sunt de 0,75 și, respectiv, 0,49 (tabelul 2). 565 570

Caracteristicile proteinei Apo AI-M/Apo AI-M

	Apo AI-M/ Apo AI-M	Apo AI-M/ Apo AI-M+DMPC
575	Greutatea moleculară (kD)	56,0
	Punctul izoelectric	5,3-5,6 ¹
	Spectroscopie UV:	
	E (1cm, 1%)	16,9 ²
	Expunerea tirozinei (alfa)	0,75 ²
580	Spectroscopie de fluorescență:	
	Lungimea de undă Exc maximă (nm)	280
	Lungimea de undă Em maximă (nm)	338
	Spectroscopia CD	
	<i>alfa</i> -helix %	52,2 ³ 57,8 ⁴

585

- 1 cel puțin 6 forme izomorfe în geluri IEF denaturate
 2= o valoare mare indică o creștere a expunerii tirozinei
 3= concentrația proteinei 0,1 mg/ml
 4= concentrația proteinei 1,1 mg/ml.

590

S-au înregistrat excitația și spectrele de emisie fluorescente ale Apo AI-M/Apo AI-M (0,1 mg/ml). Lungimea de undă maximă a excitației a reziduurilor triptofanil din Apo AI-M/Apo AI-M este la 280 nm și nu se schimbă când urmează asocierea cu DMPC. Spectrul de emisie (excitația la 280 nm) prezintă un maximum al lungimii de undă la 344 nm (fig. 11); asocierea cu DMPC determină o schimbare spre albastru a acestui maxim (338 nm), asociată cu o creștere cu 24% a intensității fluorescenței la maxime (fig. 11).

595

600

Spectrul CD în UV îndepărtat al Apo AI-M/Apo AI-M este caracterizat de minime tipice la 208 nm și 222 nm și un maxim în jurul a 195 nm (fig. 12). Conținutul *alfa*-elicoidal crește semnificativ odată cu mărirea concentrației proteinei de la 0,1 mg/ml la 1,1 mg/ml (fig. 12, tabelul 2). Asocierea Apo AI-M/Apo AI-M cu DMPC determină o creștere în continuare a structurii *alfa*-elicoidale a proteinei (fig. 12, tabelul 2).

Metode pentru caracterizarea produsului
Incubarea cu fosfolipide

605

Cantități cântărite de dimiristoilfosfatidilcolină (DMPC) sunt dizolvate în etanol, iar solventul se evaporă sub N₂; orice urmă de solvent rămasă este îndepărtată sub vid în timp de 2 h. Dispersii de DMPC în tampon fosfat 20 mM, pH=7,4, sunt amestecate cu Apo AI-M/Apo AI-M (0,1 mg/ml în final) la un raport molar DMPC/Apo AI-M/Apo AI-M de 100:1.

610

Spectroscopia

Soluțiile de Apo AI-M/Apo AI-M se dializează față de soluția de tampon fosfat de 20 mM, pH=7,4 și sunt diluate cu aceeași soluție tampon la concentrația dorită de proteină.

RO 115636 B

Spectrele UV normal și a doua derivată ale soluțiilor de Apo AI-M/Apo AI-M și Apo AI-M/Apo AI-M + DMPC sunt înregistrate cu spectrele Jasco Uvidec-610 și Perkin Elmer Lambda-2 la 25°C, utilizând o celulă cu cuarț de 1 cm. Localizarea topografică a reziduurilor de tirozină sunt investigate cu ajutorul ecuației Ragone și alții (R.Ragone, G.Colonna, C. Balestrieri, L.Servillo, G.Irace, "Determinarea expunerii tirozinei în proteine prin spectroscopia derivatei a doua", Biochemistry 1984, 23:1871-1875):

$$\text{alfa} = (r_n - r_a)/(r_u - r_a)$$

în care: *alfa* este gradul de expunere a tirozinei față de solvent, r_n și r_u sunt rapoartele vârfurilor derivate (a/b) pentru Apo AI-M/Apo AI-M nativ și, respectiv, nepliat (în Gdn-HCl 6M) și r_a este raportul derivatei a doua a vârfului pentru o soluție conținând tirozină liberă și triptofan amestecate în același raport molar ca cel din Apo AI-M/Apo AI-M.

Spectrele de fluorescență intrinsecă ale soluțiilor de Apo AI-M/Apo AI-M și Apo AI-M și Apo AI-M/Apo AI-M + DMPC sunt înregistrate cu ajutorul spectrofluorimetrului Jasco FP-550 la 25°C.

Spectrele de dicroism circular (CD) ale soluțiilor de Apo AI-M/Apo AI-M și Apo AI-M/Apo AI-M + DMPC sunt înregistrate cu un spectropolarimetru Jasco J500A la 25°C. Valorile medii de elipticitate a rezidului /THEYA/ sunt exprimate în gradexcm²xdmol⁻¹ și sunt calculate cu ajutorul ecuației:

$$\text{/THEYA/} = \text{/THEYA/} \times 106 / (10 \times l \times c)$$

unde /THEYA/ este elipticitatea observată în grade, 106 este greutatea moleculară medie reziduală a proteinei, *l* este lungimea căii în centimetri și *c* este concentrația proteinei, în g/ml. Procentul *alfa*-elicoidal se calculează folosind ecuația:

$$\% \text{ alfa elice} = \text{/THEYA/}_{208 \text{ nm}} - 4000 / (33000 - 4000)$$

(Greenfield N., Fasman GD, "Spectrul de dicroism circular calculat pentru evaluarea conformației proteinei", Biochemistry, 1969, 8:4108-4116).

Electroforeza

Focusarea analitică izoelectrică și SDS-PAGE sunt efectuate așa cum a fost descris anterior (G. Franceschini, M. Sirtori, G. Gianfranceschi, CR Sirtori, "Relația dintre apoproteinele HDL și izoproteinele AI în subiecții cu anormalitatea AI-MY, Metabolism 1981, 30:502-509).

Focusarea izoelectrică este realizată în geluri de acrilamidă 10%, conținând uree 6M și amfoline 4% (pH=4-6). După focusare peste noapte, gelurile sunt fixate și stropite cu Coomassie Brilliant Blue R-250 în acid acetic/alcool izopropilic. Punctul izoelectric (pI) al oricăror benzi de proteine necunoscute este calculat prin trasarea diagramei pI a proteinelor cunoscute (standarde de la Bio-Rad și apo-HDL), în raport cu distanța de migrare respectivă.

Pentru SDS-PAGE se întrebuintează geluri de acrilamidă 14% conținând 0,1% SDS. Gelurile sunt tratate așa cum a fost descris anterior și se calculează greutatea moleculară a proteinelor necunoscute din diagrama logaritmică a greutatei moleculare a proteinelor standard (Kabi-Pharmacia) față de distanța de migrare.

Cromatografia de excludere de înaltă performanță

Separările analitice HPSEC se efectuează folosind un cromatograf de lichide Jasco cu o coloană 10 μm TSK-G3000 (7,5x300 nm). Coloana HPSEC este echilibrată și eluată cu un tampon fosfat 0,1M, NaCl 0,1 M, pH=7,2, conținând uree 8M.

RO 115636 B

Proteinele sunt eluate la o viteză de curgere de 0,5 ml/min și citirile se fac la 220 nm. Ariile de vârf sunt integrate folosind integratorul HP-3390.

665 **Exemplul 6.** *Obținerea particulelor rHDL care conțin Apo AI, Apo AI-M sau Apo AI-M/Apo AI-M*

Particulele de lipoproteine de înaltă densitate reconstituite (rHDL) sunt fabricate utilizând tehnica prezentată de A.V.Nichols și alții, Biochem. Biophys. Acta 750:353-364 (1984) și C.E.Matz și alții, J.Biol.Chem. 257:4535-4541 (1982).

670 Dimerul Apo AI-M recombinant (din exemplul 4) și Apo AI, purificat din plasma umană, sunt dizolvate în Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 0,01%, NaN₃ 0,006% pH=8,0 (tamponul A), conținând Gdn-HCl 4M la o concentrație de 6 mg/ml. Pentru comparație, disulfura legată la unii din Apo AI-M/Apo AI-M este redusă prin adăugare de DTT 20 mM la tamponul A + Gdn-HCl. Proteinele sunt dializate față de soluția tampon A și sunt diluate la 5,2 mg/ml cu aceeași soluție tampon.

675 Fosfolipidele, fie, fosfatidilcolină din ou (EPC), fie, palmitoileilfosfatidilcolină (POPC), sunt dizolvate în CHCl₃, uscate sub N₂ și menținute în vid peste noapte. Se adaugă colat de sodiu la un raport colat/PC de 0,55 în greutate; amestecul este agitat energetic, timp de 3 min, la temperatura camerei și apoi, este incubat la 4°C, timp de 2 h. Apoi se adaugă proteina la un raport, în greutate, de PC/proteină de
680 2,17 (POPC) sau 2,47 (EPC), iar amestecul este agitat, timp de 3 min, la temperatura camerei și este incubat, la 4°C, peste noapte. După dializă față de soluția tampon A, timp de 5 zile, amestecul este centrifugat la 11000 rpm, timp de 5 min, în centrifuga Beckman Microfuge și este colectat supernatantul.

685 rHDL sunt separate prin electroforeză în gel de poli(acrilamidă în gradient, nedenaturată (GGE) și mărimea particulei este determinată, așa cum a fost descris anterior de A.V.Nichols și alții în Meth. Enzymol. 128:417-431 (1986).

Toate apolipoproteinele testate sunt asociate aproape complet cu lipidele prin procedeul descris, lucru demonstrat de vârful foarte mic de apolipoproteină față de lipidă de pe gelurile GGE. Recuperarea proteinei din rHDL variază, între 68 și 100%,
690 în 10 preparate diferite.

Profilele GGE ale particulelor HDL reconstituite sunt arătate în fig.13. HDL reconstituit cu Apo AI și EPC dă un vârf major pe GGE, cu un diametru de 9,6 nm; componentele minore, de dimensiuni mai mari sau mai mici, sunt, de asemenea, detectabile. rHDL care conține EPC și Apo AI-M/Apo AI-M constă din două componente majore (diametrul de 8,6 și 12,9 nm) și două componente minore (diametrul de 7,9 și 10,8 nm) (fig.13); aceleași dimensiuni ale particulelor sunt obținute și când
695 Apo AI-M/Apo AI-M este reconstituit cu POPC.

Toate cele trei apolipoproteine sunt aproape complet încorporate în complexii stabili lipidă-proteină cu diferite mărimi ale particulelor rHDL, diferite distribuții și compoziții. În particular, rHDL format cu Apo AI-M/Apo AI-M recombinant constă din două componente majore, cea mare fiind unică în familia Apo AI-conținând rHDL.

700 *Evaluarea biologică a Apo AI-M/Apo AI-M*

Exemplul 7. *Comportarea cinetică a dimerului Apo AI-M în raport cu monomerul Apo AI-M în recipiente normale*

705 Dimerii manifestă o persistentă prelungită în circulație, ceea ce s-a arătat prin studii cinetice pe om, prezentate mai jos.

La voluntari sănătoși, este administrat i.v. Apo AI-M marcat cu I¹²⁵ sau Apo AI-M/Apo AI-M marcat la fel. După cum se poate observa și din tabelul 3, βt_{1/2}(h) al plasmei este calculat după două metode diferite, la fel și viteza de fracționare catabolică (FCR). Acestea două confirmă un catabolism remarcabil redus al dimerului față de monomer.
710

RO 115636 B

Catabolismul foarte lent al Apo AI-M/Apo AI-M arată că aceste molecule pot scădea concentrația lipoproteinei și acționează probabil ca un precursor eficient pentru Apo AI-M. În acest fel, prin injectarea de Apo AI-M/Apo AI-M, se poate prevedea că dimerul poate rămâne în plasmă o perioadă de timp prelungită, în acest fel interacționând direct cu metabolismul lipoproteinei și cu sistemul fibrinolitic. 715

Tabelul 3

Comportarea cinetică a Apo AI-M/Apo AI-M față de monomerul Apo AI-M în recipiente normale (n=2)

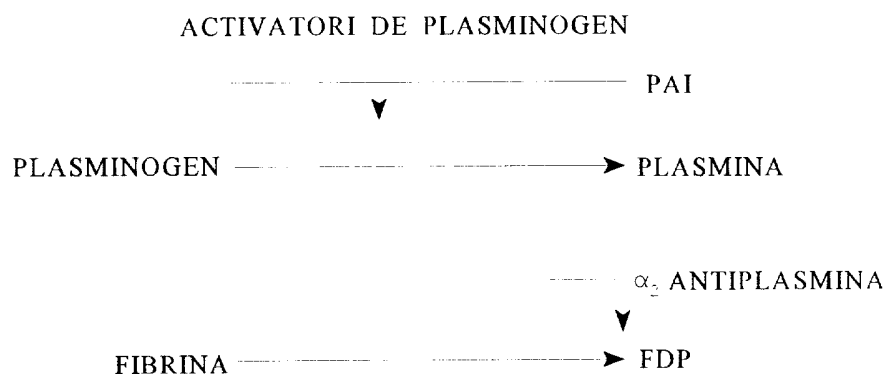
		Apo AI-M	Apo AI-M/Apo AI-M	
Modul monoexponențial	$\beta t_{1/2}(h)$	16,07	52,04	720
	MRT(h)	23,19	75,09	
Modul biexponențial	$\beta t_{1/2}(h)$	22,61	70,29	725
	MRT(h)	28,97	89,16	
	FCR(h)	2,3% /h	1,1% /h	

Efectul Apo AI-M/Apo AI-M asupra sistemului fibrinolitic

Sistemul fibrinolitic constituie apărarea principală împotriva depunerii de fibrină pe pereții vaselor și, ca atare, joacă un rol important printre mecanismele care împiedică tromboza. 730

Enzima care răspunde de liza fibrinei este plasmina. Plasmina este formată din precursorul inactiv plasminogen prin acțiunea activatorilor specifici (activatorul plasminogen de țesut, t-PA și urochinaza, UPA). Atât, procesul de activare, cât, și acțiunea plasminei sunt reglate de inhibitori specifici-inhibitorul 1 al activatorului plasminei (PAI) și, respectiv, α_2 -antiplasmina. 735

Schema sistemului fibrinolitic este prezentată mai jos:



FDP-produsul de degradare al fibrinei

Investigațiile din exemplele 7-9 sunt prezentate pentru a găsi modul de acționare al dimerului Apo AI-M când este afectat sistemul fibrinolitic uman. Sunt studiate autoactivarea plasminogenului și activarea sau cu uPA și tPA în prezența și în absența Apo AI-M/Apo AI-M. Apo AI-M izolat din plasmă este utilizat ca martor (produs Sigma nr. A 9284). 755

Activarea sistemului fibrinolitic este măsurată cu ajutorul substraturilor cromogenice. Aceste substraturi conțin o grupă cromoforă de paranitroanilină, care poate fi scindată din molecula substratului prin acțiunea plasminei.

RO 115636 B

760 P-NA liber este de culoare galben intens și poate fi cu ușurință urmărită la o lungime de undă de 405 nm. Cantitatea de p-NA eliberată este direct proporțională cu cantitatea de activitate enzimatică generată.

Toate măsurătorile sunt efectuate cu cititorul cu microplacă THERMOmax controlat cu ajutorul versiunii 2,01 a programului SOFTmax™ de la Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA.

765 Șarjele utilizate în aceste studii sunt produse prin tehnici recombinante conform exemplului 4. Purificarea constă dintr-un schimb ionic, interacțiune hidrofobă și cromatografie prin gel filtrare, urmate de ultrafiltrare și uscare prin înghețare, toate acestea fiind metode biochimice cunoscute. Toate șarjele investigate au un conținut mai mare sau egal cu 90% din forma de dimer, așa cum este indicat prin HPLC în
770 fază inversă. Concentrația este determinată folosind proba Kabi Pharmacia apolipoproteină AI RIA 100.

Sunt investigate trei preparate A, B și C.

Exemplul 8. *Autoactivarea plasminogenului în prezența Apo AI-M/Apo AI-M și Apo AI*

775 Glu-plasminogenul (în concentrație finală de 94 μg/ml) este incubat, timp de 3 h, la 37°C, în soluție tampon Tris 0,1 mol/l, pH=7,6. Generarea de plasmină este urmărită cu substratul cromatogenic S-2251 (H-D.Val-L-Leu-L-Lys-pNA), obținut de la Chromogenix AB, Molndal, Suedia. Este folosită o concentrație finală de 0,6 mmol/l. Plasminogenii folosiți în aceste încercări sunt obținuți de la Chromogenix AB sau de
780 la IMCO Inc., Stockholm, Suedia.

Sunt testate în această încercare șarjele de Apo AI-M/Apo AI-M (concentrația finală de 3,9-75 μg/ml), iar cantitatea de plasmină generată în prezența lor este comparată cu cantitatea de plasmină generată în prezența Apo AI (concentrația finală de 125g/ml) și cu cantitatea de plasmină generată în absența oricărui adaos (martor)
785 (tabelul 4).

Se constată, în mod surprinzător, că, Apo AI-M/Apo AI-M poate mări activarea plasminogenului în absența oricărui activator de plasminogen. Apo AI derivat din plasmă nu a afectat în nici un fel molecula de plalsminogen.

Tabelul 4

790 *Generarea spontană de activitate a plasminei în plasminogen. Efectul Apo AI-M/Apo AI-M și Apo AI*

Proba	Concentrația finală	OD 405 nm
	Apo (μg/ml)	
Martor	0	52
+ Apo AI	125	49
+ Apo AI-M/Apo AI-M		
A	75	288
B	313	325
B	156	153
800 B	78	104
B	39	67

RO 115636 B

Activitatea constatată poate fi atribuită lui Apo AI-M/Apo AI-M. Inșă, pe baza acestor date nu se poate exclude că Apo AI-M/Apo AI-M este contaminat cu enzimă(e) proteolitică(e), care ar putea activa plasminogenul. Se efectuează experimente pentru a exclude această posibilitate. 805

Toate preparatele Apo AI-M/Apo AI-M utilizate în încercările fibrinolitice sunt testate cu substraturi cromatogenice S-2252 (H-D-Val-L-Leu-Lys-pNA), sensibile la activitatea de tipul plasmininei și S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) sensibile la proteazele specifice argininei. Substraturile sunt obținute de la Chromogenix AB. Concentrația finală a Apo AI-M/Apo AI-M în încercări este identică cu cea utilizată în încercările fibrinolitice și astfel, ea poate varia la diferite șarje. 810

Proba: 25 μg Apo AI-M/Apo AI-M de concentrație finală 60-70 μg/ml;
150 μl soluție tampon Tris 0,1 mol/l cu pH=7,8;
50 μl S-2251 0,6 mmol/l sau S-2288 1,0 mmol/l. 815

Proba conține numai soluție tampon și substrat și este utilizată ca martor pentru hidroliza nespecifică a substratului. Toate probele sunt efectuate în dublu exemplar.

Placa de microtitru este incubată, la 37°C și se citește absorbanta la intervale de timp de o oră. 820

Tabelul 5

Activitatea amidolitică a două șarje de Apo AI-M/Apo AI-M (A și B), după 4 h de la incubare, la 37°C (OD 405 nm)

		Apo AI-M/Apo AI-M	Substrat	
S-2251	A	23	22	825
	B	22		
S-2288	A	37	34	
	B	37		

Intr-o altă serie de experimentări, Apo AI-M/Apo AI-M este tratat cu un inhibitor ireversibil de proteaze ale serinei, diizopropilfluorofosfat DFP (produs de Sigma nr. D 0789). Concentrația finală a Apo AI-M/Apo AI-M în KHCO₃ 0,2 mol/l, pH=7,6 ca soluție tampon, este de aproximativ 75 μg/ml. La această soluție se adaugă DFP de concentrație finală 123 mmol/l. După 4 h, proba de incubare este dializată peste noapte, față de două schimbări de soluție tampon carbonat. 830

Se determină activitatea, folosind aceleași condiții ca cele descrise anterior, utilizând Apo AI-M/Apo AI-M tratat cu DFP și Apo AI-M/Apo AI-M netratat. După o incubare de 3 h, cu plasminogen și S-2251, OD la 405 nm a fost de 0,209 pentru probele conținând Apo AI-M/Apo AI-M tratat cu DFP, de 0,234 pentru probele conținând Apo AI-M/Apo AI-M netratat și de 0,030 pentru probele numai cu plasminogen. Astfel, se poate concluziona că efectul de activare a plasminogenului observat este direct corelat cu prezenta Apo AI-M/Apo AI-M și nu se datorează vreunui potențial contaminant proteolitic. 835

Exemplul 9. *Efectul Apo AI-M/Apo AI-M asupra activării plasminogenului cu activatori de plasminogen t-PA și uPA* 840

Activatorul urochinază (uPA) și activatorul plasminogenului din țesut (t-PA) transformă plasminogenul în plasmină prin scindarea proteolitică a unei singure peptide legate Arg 560-Val 561 în molecula de plasminogen. În timp ce urochinaza cu două catene poate activa direct plasminogenul, t-PA necesită prezența fibrinei pentru 845

RO 115636 B

850 activarea optimă a plasminogenului. Prezența de cantități catalitice de fibrină, care împreună cu t-PA și plasminogenul formează un complex ternar, mărește eficiența enzimatică a t-PA de aproximativ 600 de ori.

Activarea plasminogenului cu t-PA este studiat folosind trusa existentă în comerț Spectrolyse^R (fibrină) t-PA/PAI de la Biopool AB, Umea, Suedia.

855 În această încercare, plasminogenul este incubat cu t-PA, în prezența substratului cromogenic D-But-CHT-Lys-pNa și desAA fibrinogen (monomer de fibrină), care acționează ca un stimulator al activării. Plasmina generată scindează substratul, eliberând pNa liber.

860 Apo AI-M/Apo AI-M este adăugat la acest sistem și este comparat cu preparatul Apo AI de la Sigma. Efectul ambelor apolipoproteine este testat în sistem, atât în prezența, cât și în absența fibrinei.

Exemplu de sistem de încercare:

25 μl soluție tampon Spectrolyse

25 μl preparat Apo sau soluție tampon

865 20 μl t-PA (de concentrație finală - 1,7 UI/ml)

150 μl reactiv Spectrolyse PAR (amestec de plasminogen și substrat)

10 μl Desa fib (=monomer fibrină) sau 10 μl soluție tampon.

Probele sunt incubate pe plăci de microtitrare, la 37°C, timp de 3 h.

870

Tabelul 6

Efectul Apo AI-M/Apo AI-M și al Apo AI asupra activării plasminogenului de către t-PA în prezența și în absența fibrinei. Rezultatele sunt exprimate ca OD, după 3h de incubare la 37°C la 405 nm

Proba	Concentrația finală Apo (μg/ml)	OD 405 nm + fibrină	OD 405 nm - fibrină
875 t-PA martor	0	656	48
+ Apo AI	54	1050	66
+ Apo AI-M/Apo AI-M			
A	65	1665	446
B	54	2366	225

880

S-a observat o stimulare semnificativă a activării plasminogenului cu Apo AI-M/Apo AI-M, atât în prezența, cât și în absența fibrinei. Apo-AI stimulează activarea într-un grad mai scăzut în prezența fibrinei. În absența fibrinei, stimularea Apo AI-M/Apo AI-M este foarte pronunțată în comparație cu stimularea foarte mică produsă de Apo AI.

885

Apo AI-M/Apo AI-M are, de asemenea, un efect de potențare important când plasminogenul este activat cu uPA. Urochinaza utilizată în aceste încercări este un preparat cu greutate moleculară mare obținut de la Calbiochem.

890

Urochinaza (de concentrație finală 2,5 UI/ml) este amestecată cu plasminogenul (de concentrație finală 94 μg/ml) și cu substratul S-2252 (de concentrație finală 0,6 mmol/l). La această probă, se adaugă Apo AI-M/Apo AI-M de concentrație finală 75 sau 62 μg/ml. Reacția are loc în soluție tampon Tris 0,1 mol/l, pH=7,6. Similar cu t-PA, se observă o stimulare potențială a generării de plasmină de către urochinază, când s-a adăugat la această probă Apo AI-M/Apo AI-M (tabelul 7).

Efectul Apo AI-M/Apo AI-M asupra activării plasminogenului de către uPA. Rezultatele sunt exprimate ca OD, după 4 h de incubare, la 37°C la 405 nm

Proba	Concentrația finală µg/ml	OD 405 nm
uPA	0	325
+Apo AI-M/Apo AI-M		
A	75	1263
B	62	1868

900

Acest efect de potențare asupra fibrinolizei persistă chiar și atunci când Apo AI-M/Apo AI-M este preparat sub formă de compoziții farmaceutice împreună cu un suport. Ca suport potențial, se utilizează lipozomi constând din fosfatidilcolină, PC, (12 mg/ml). Concentrația Apo AI-M/Apo AI-M (șarja C) în lipozomi este de 3,6 mg/ml.

905

Activarea plasminogenului (concentrație finală de 94 µg/ml) cu uPA (de concentrație finală 2,5 IU/ml) este testată în prezența lipozomilor, care conțin Apo AI-M/Apo AI-M și este comparat cu activarea realizată, în prezența lipozomilor fără proteine. Probele sunt incubate, timp de 4 h, la 37°C cu S-2251 și se urmărește continuu activarea plasminei.

910

Tabelul 8

Activarea plasminogenului de către uPA. Efectul Apo AI-M/Apo AI-M, șarja C, în lipozomi. Rezultatele sunt exprimate ca OD la 405 nm

915

Proba	OD 405 nm
uPA + plasminogen	221
+ lipozomi fără proteină, 250 µg/ml PC	499
+ Apo AI-M/Apo AI-M 75 µg/ml în lipozomi, 250 µg/ml PC	1084

920

Prezența lipozomilor singuri a stimulat activarea plasminogenului aproximativ de două ori. Adăugarea de Apo AI-M/Apo AI-M la lipozomi a mărit acest efect de cinci ori în comparație cu proba care conține numai urochinază drept activator.

Exemplul 10. *Efectul Apo AI-M/Apo AI-M asupra conversiei urochinazei cu o singură catenă în urochinază cu două catene*

925

Urochinaza cu o singură catenă (scuPA) este un precursor al urochinazei cu două catene (uPA). În contrast cu uPA, scuPA are numai o activitate amidolitică foarte scăzută față de substraturile sintetice mici. Activitatea amidolitică este cel mai mult 0,4% din activitatea uPA. Însă, scuPA, în ciuda faptului că este o proenzimă, are capacitatea de a activa plasminogenul la plasmină. În amestecurile de plasminogen și scuPA, se efectuează o secvență de trei reacții care sunt implicate în activarea plasminogenului la plasmină:

930

1) scuPA + plasminogen → scuPA + plasmină

2) plasmină + scuPA → plasmină + uPA

3) uPA + plasminogen → uPA + plasmină

935

Este studiată secvența de reacție care conduce la conversia scuPA în uPA în prezența plasminogenului. Activitatea urochinazei este detectată cu ajutorul substratului S-2444 cromogenic, specific urochinazei (pyro-Glu-Gly-Arg-pNA, Chromogenix AB). Șarjele de Apo AI-M/Apo AI-M sunt adăugate la sistem, iar cantitatea de activitate

RO 115636 B

940 uPA generată este comparată cu cantitatea de activitate obținută în probele fără adăugare de apolipoproteină. Urochinaza cu o singură catenă utilizată în aceste încercări este un produs recombinant obținut de la Grunenthal GmbH, Aachen, Germania (lot nr. 0088808).

25 μ l Apo sau soluție tampon
945 75 μ l Tris 0,05 mol/l, pH=7,6, conținând NaCl 0,1 mol/l și 0,02% Tween 80
25 μ l scuPA, 454 pmol/l concentrația finală
50 μ l S-2444, 1 mmol/l concentrația finală
25 μ l plasminogen, 52,1 nmol/l concentrația finală.

950 Probele sunt incubate, la 37°C, timp de 90 min. Creșterea densității optice, măsurând cantitatea de uPA generată, este înregistrată continuu în timpul ultimelor 30 min ale incubării.

Tabelul 9

955 Efectul Apo AI-M/Apo AI-M asupra conversiei scuPA în uPA. Rezultatele exprimate ca mOD/min la 405 nm

Proba	Concentrația finală Apo (μ g/ml)	mOD/minut
scuPA	0	73
+ plasminogen	0	132
+ Apo AI	62	118
+ Apo AI-M/Apo AI-M		
B	62	200
A	75	240

965 Conversia scuPA în uPA în prezența plasminogenului este stimulată de Apo AI-M/Apo AI-M, în timp ce Apo AI izolat din plasmă nu a avut un efect însemnat în acest sistem.

970 Efectele observate ale Apo AI-M/Apo AI-M asupra încercărilor fibrinolitice din aceste studii sunt crescute comparativ cu efectele date de Apo AI izolat din plasmă. Apo AI-M/Apo AI-M are capacitatea potențială de stimulare a activității fibrinolitice, care este superioară lui Apo AI. Este probabil că acest efect mărit al Apo AI-M/Apo AI-M față de Apo AI se va constata și *in vivo*.

Revendicări

975 1. Procedeu pentru prepararea dimerului de apolipoproteină AI-Milano, **caracterizat prin aceea că** apolipoproteina AI-Milano se produce prin tehnologie recombinantă ca proteină de fuziune intracelulară în *Escherichia coli*, scindează apolipoproteina AI-Milano cu acid formic, se convertește în dimer, prin oxidare, orice monomer prezent și ulterior se purifică dimerul într-o formă efectiv pură.

980 2. Procedeu pentru prepararea dimerului de apolipoproteină AI-Milano, **caracterizat prin aceea că** apolipoproteina AI-Milano se produce prin tehnologie recombinantă secretând apolipoproteina AI-Milano, monomer și dimer în mediul de cultură bacterian într-un sistem de expresie *Escherichia coli*, iar apoi convertind în dimer, prin oxidare orice monomer prezent, după care se purifică dimerul într-o formă efectiv pură.
985

RO 115636 B

3. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, proteina de fuziune este scindată între o aspargină și o entitate prolină.

4. Procedeu, conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizat prin aceea că**, monomerul este convertit în dimer prin oxidare cu glutatation sau tioredoxină.

5. Procedeu, conform revendicării 5, **caracterizat prin aceea că**, monomerul este convertit în dimer prin oxidare cu glutatation oxidat. 990

6. Procedeu, conform revendicării 5, **caracterizat prin aceea că**, concentrația de glutatation oxidat variază în intervalul 0,1...10,0 mM.

7. Procedeu, conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizat prin aceea că**, dimerul de apolipoproteină AI-Milano obținut are o puritate de cel puțin 90%, preferabil, cel puțin 98%. 995

8. Procedeu, conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizat prin aceea că**, dimerul obținut este utilizat sub formă de compoziții farmaceutice sau la prepararea unui medicament, pentru tratamentul aterosclerozei, al bolilor cardiovasculare, pentru prevenirea sau tratamentul afecțiunilor cardio-circulatorii majore, cum ar fi, infarctul miocardic, angina instabilă, ocluziile vasculare periferice acute și restenoza după angioplastie coronariană, pentru tratamentul stărilor arteriale cronice, pentru prevenirea și tratamentul trombozei, precum și la stimularea fibrinolizei. 1000

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **ing. Petrea Dana-Maria**

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;

A 61 K 37/02;

A 61 K 35/16;

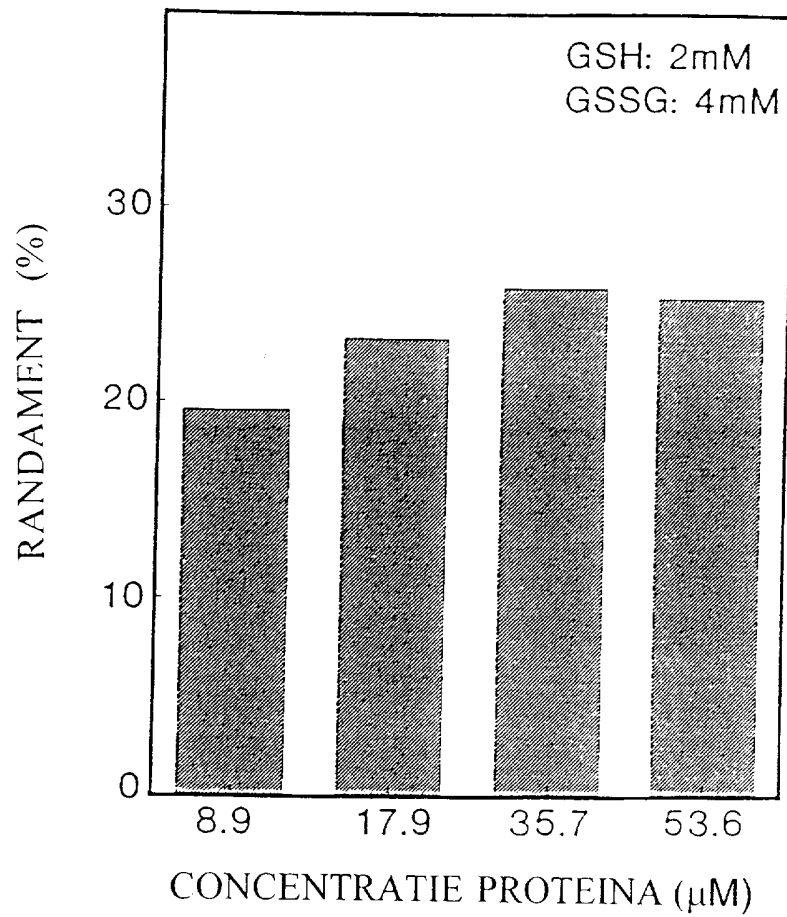


Fig. 1

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;
A 61 K 37/02;
A 61 K 35/16;

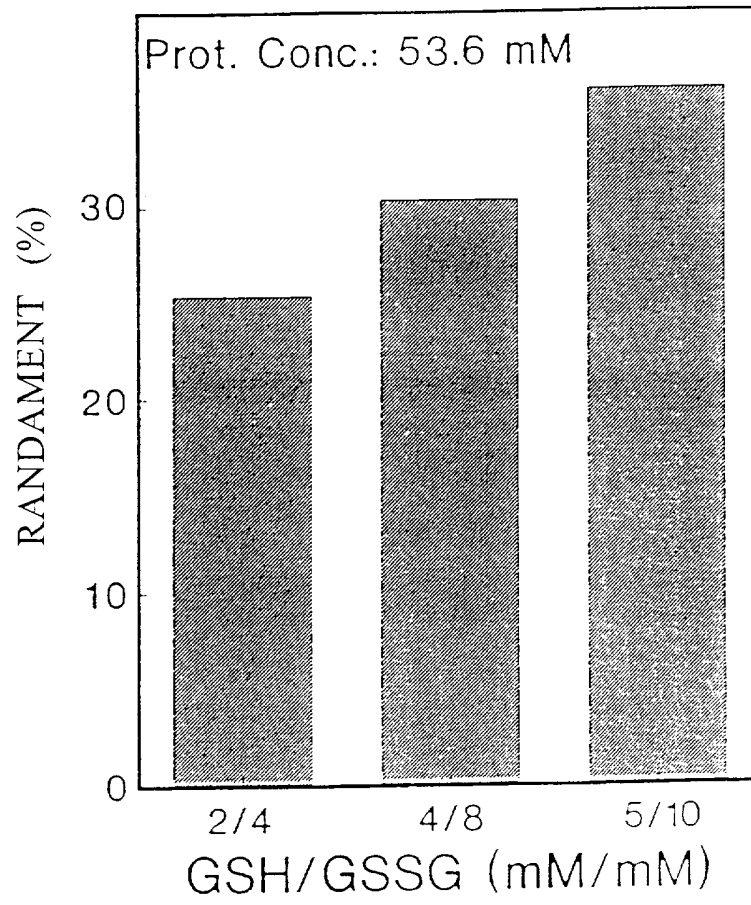


Fig. 2

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;

A 61 K 37/02;

A 61 K 35/16;

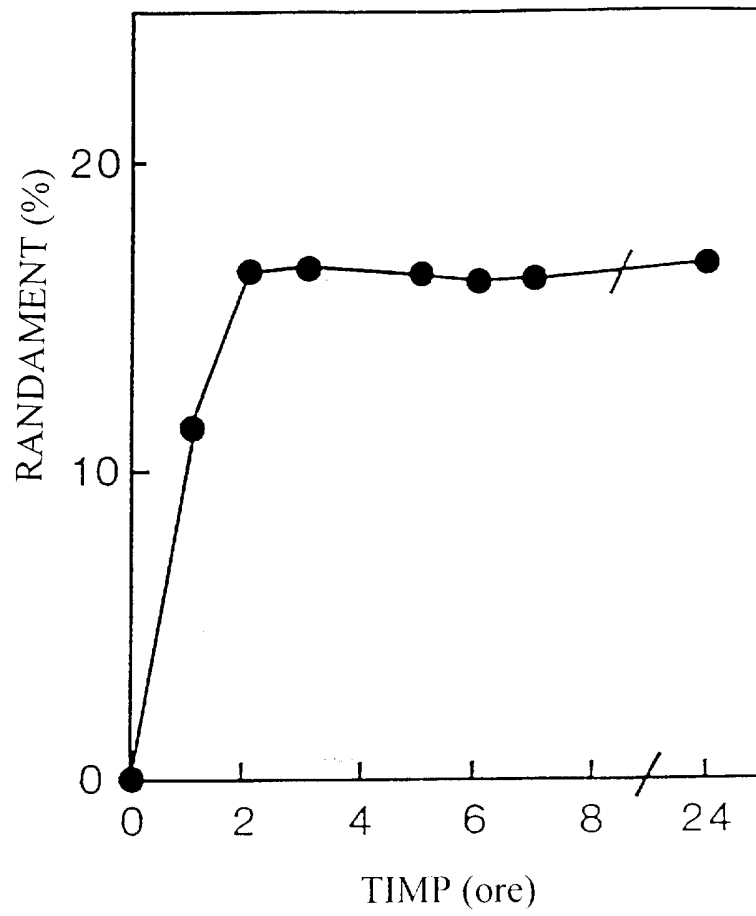


Fig. 3

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;

A 61 K 37/02;

A 61 K 35/16;

Linker- Δ ApoAI-Eco

Lungimea linker-DApoAI-Eco (circular) : 28 bp;

Restricție simplă de la 1 la 28

>< AvaII	>< BanII
	>< Bsp1286
>< EcoRI	>< DsaI
	>< EcoT141
	>< NcoI
	>< NspII
	>< StyI
GAAATCGGAC CCACCGCAGA GCCCATGG	
AsnSerAsp ProProGlnSerProTrp	
10	20 28

DApoAI-Eco-5 : 22 bp; +1 at: 1;

5'-AATTOGGACC CACCGCAGAG CC
10 20 22

DApoAI-Eco-3 : 22 bp; +1 at: 1;

5'-CATGGGCTCT GCGGTGGGTC CG
10 20 22

Fig. 4

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;
A 61 K 37/02;
A 61 K 35/16;

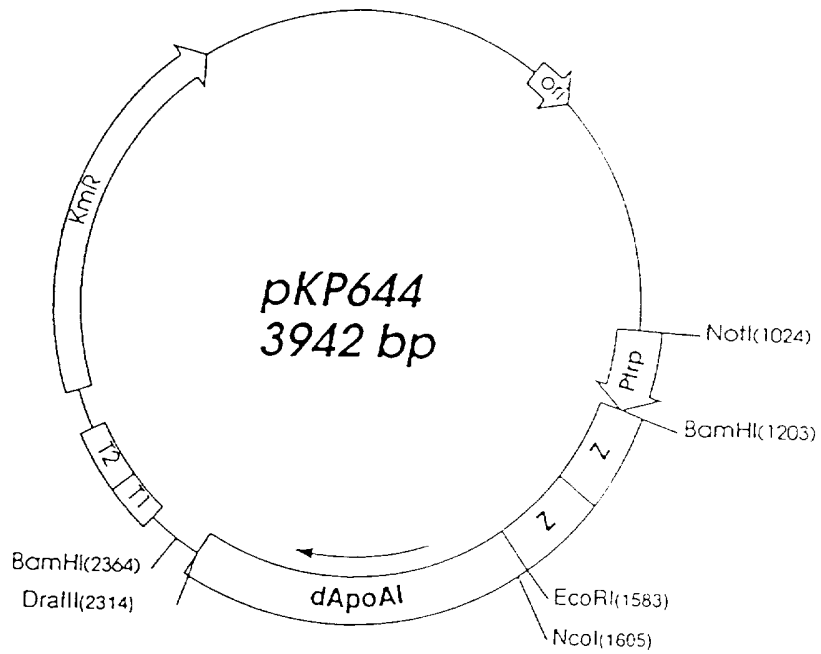


Fig. 5

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;

A 61 K 37/02;

A 61 K 35/16;

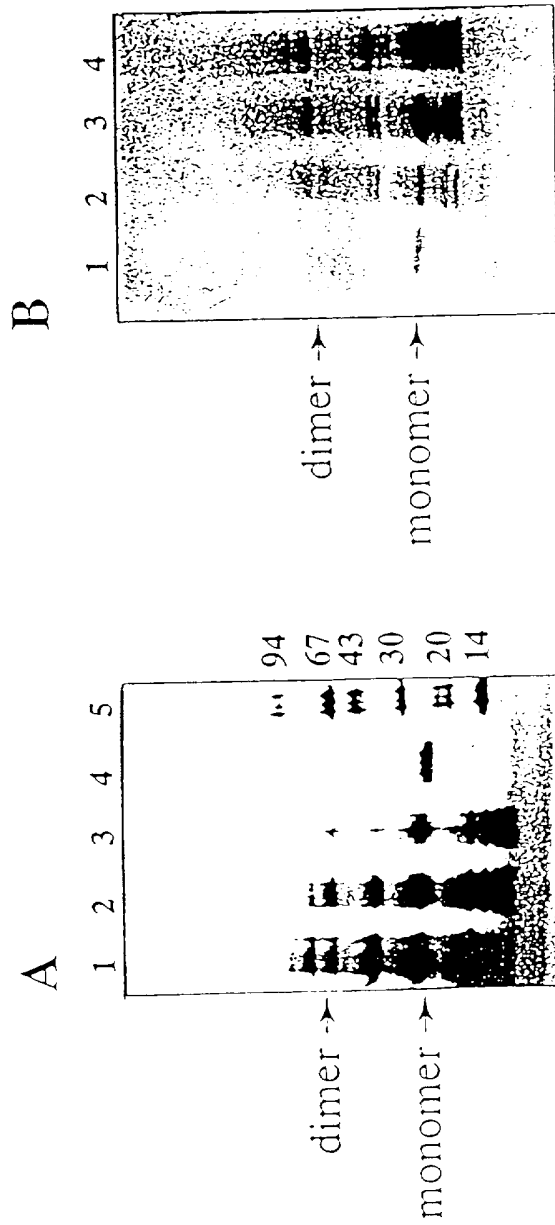


Fig. 6

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;

A 61 K 37/02;

A 61 K 35/16;

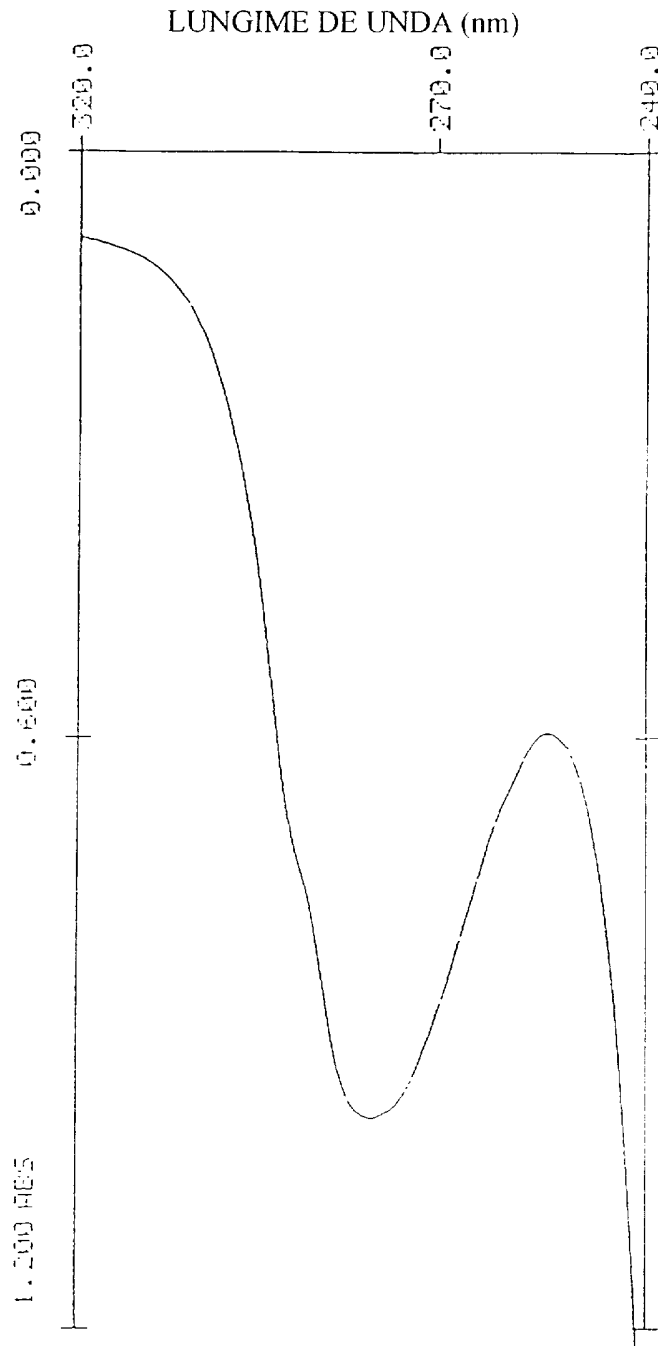


Fig. 7

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;
A 61 K 37/02;
A 61 K 35/16;

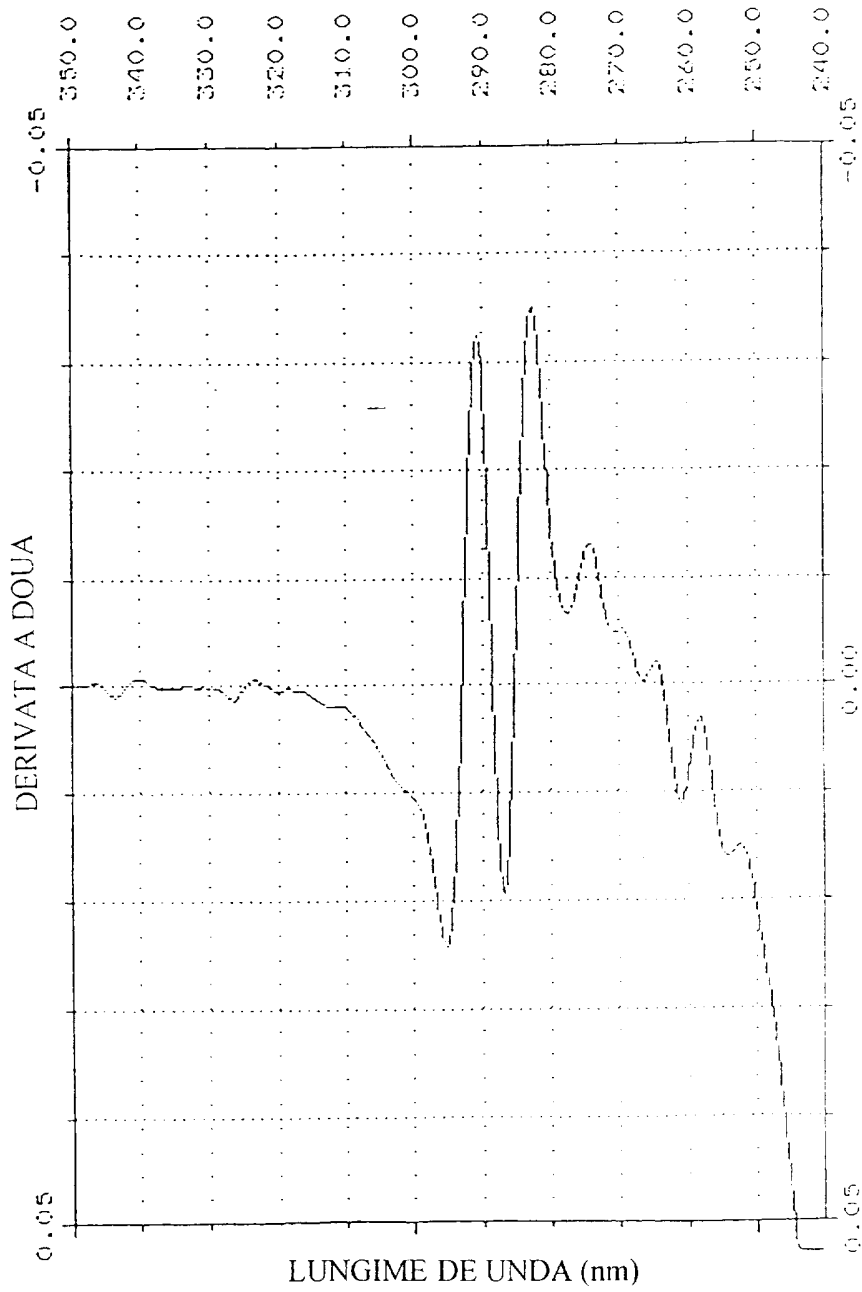


Fig. 8

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;
A 61 K 37/02;
A 61 K 35/16;

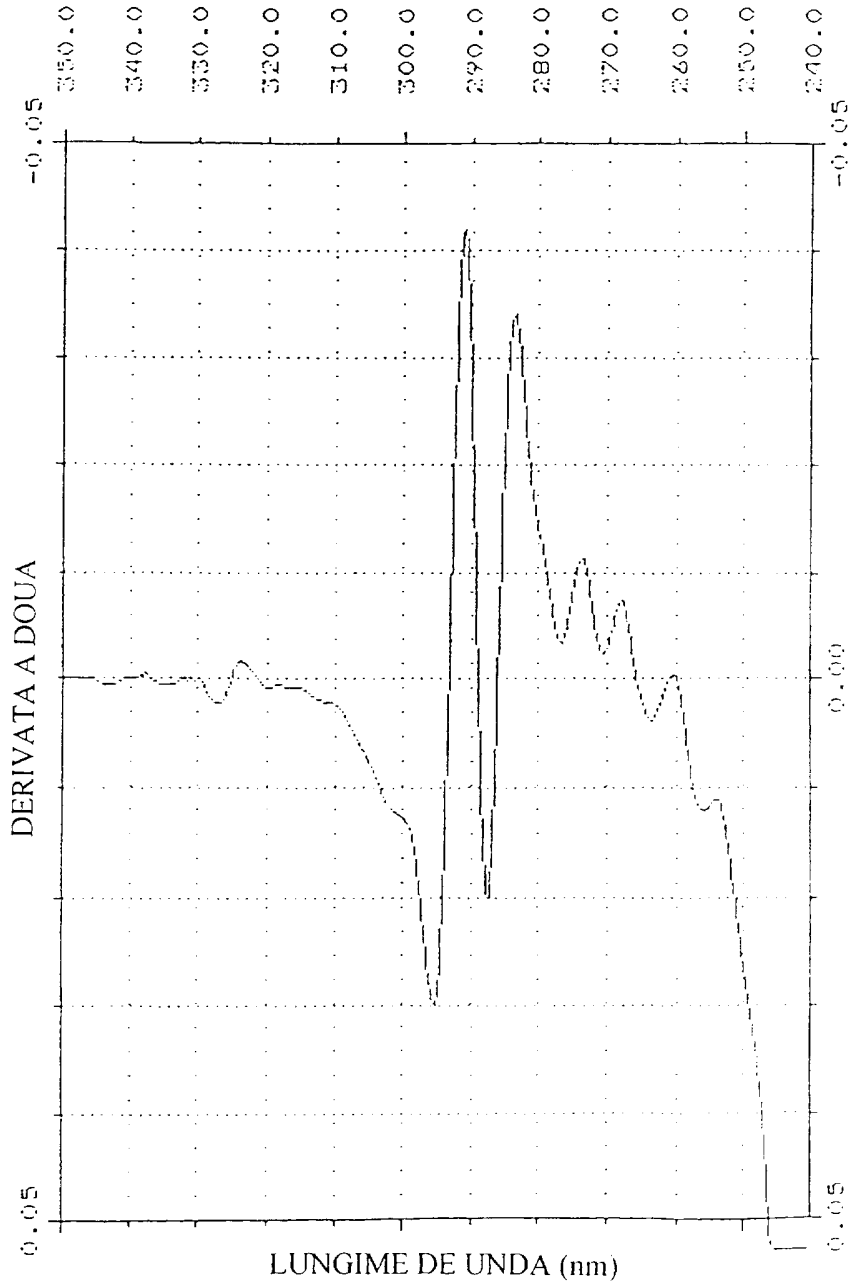


Fig. 9

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;
A 61 K 37/02;
A 61 K 35/16;

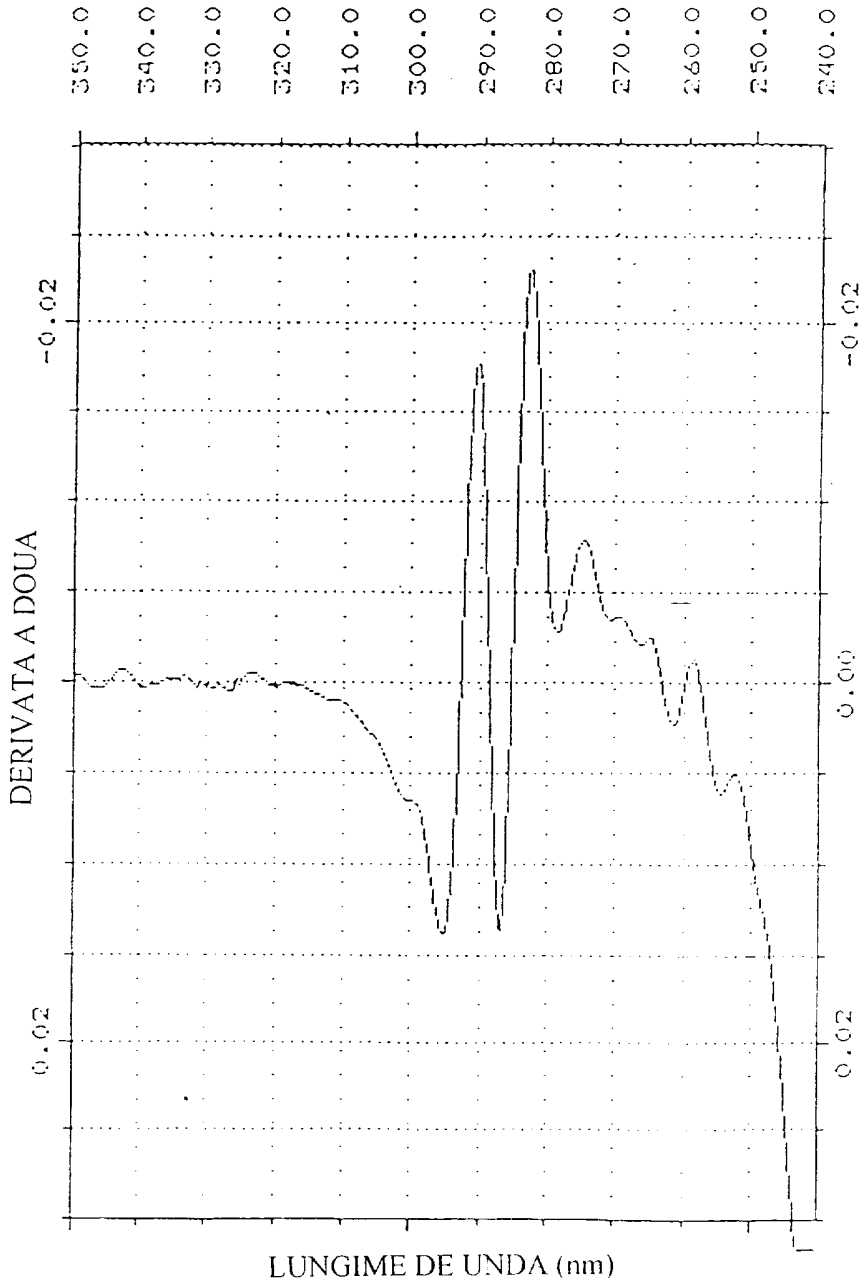


Fig. 10

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;
A 61 K 37/02;
A 61 K 35/16;

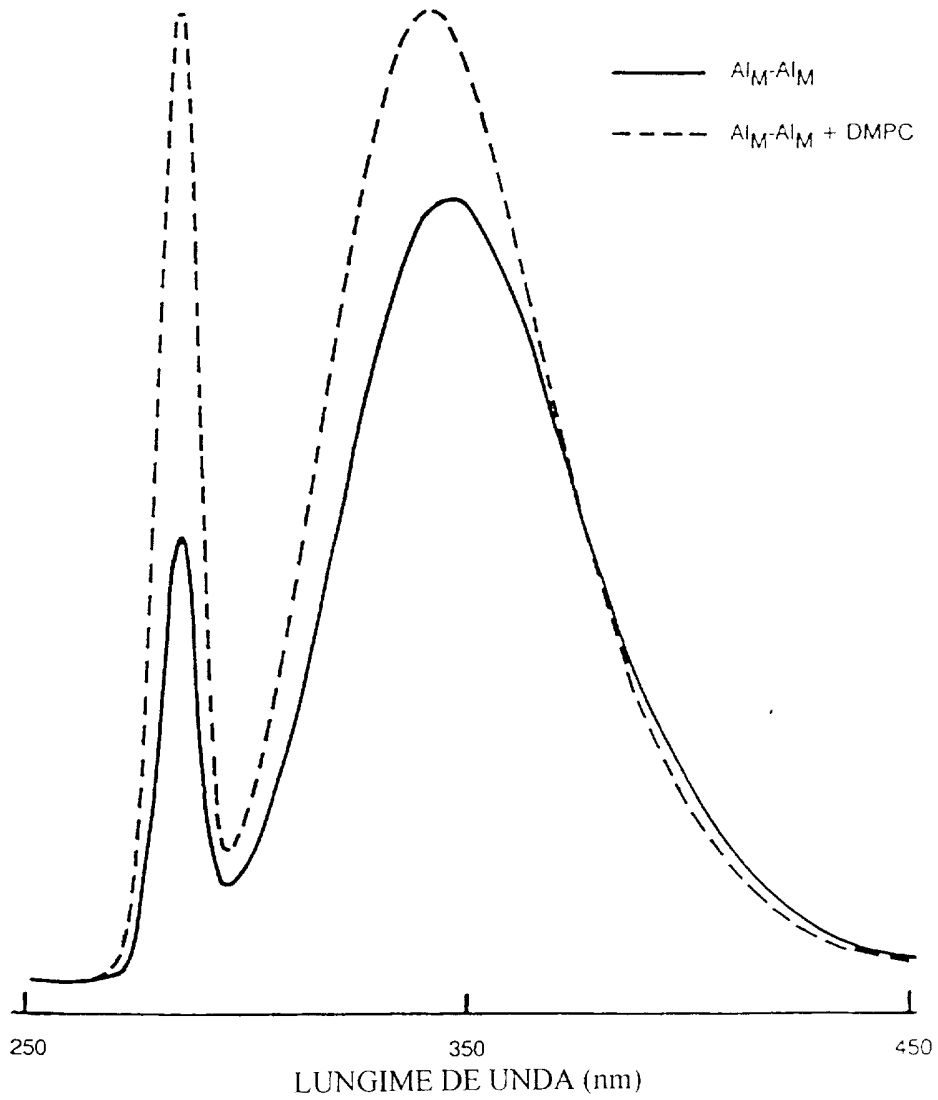


Fig. 11

RO 115636 B

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;

A 61 K 37/02;

A 61 K 35/16;

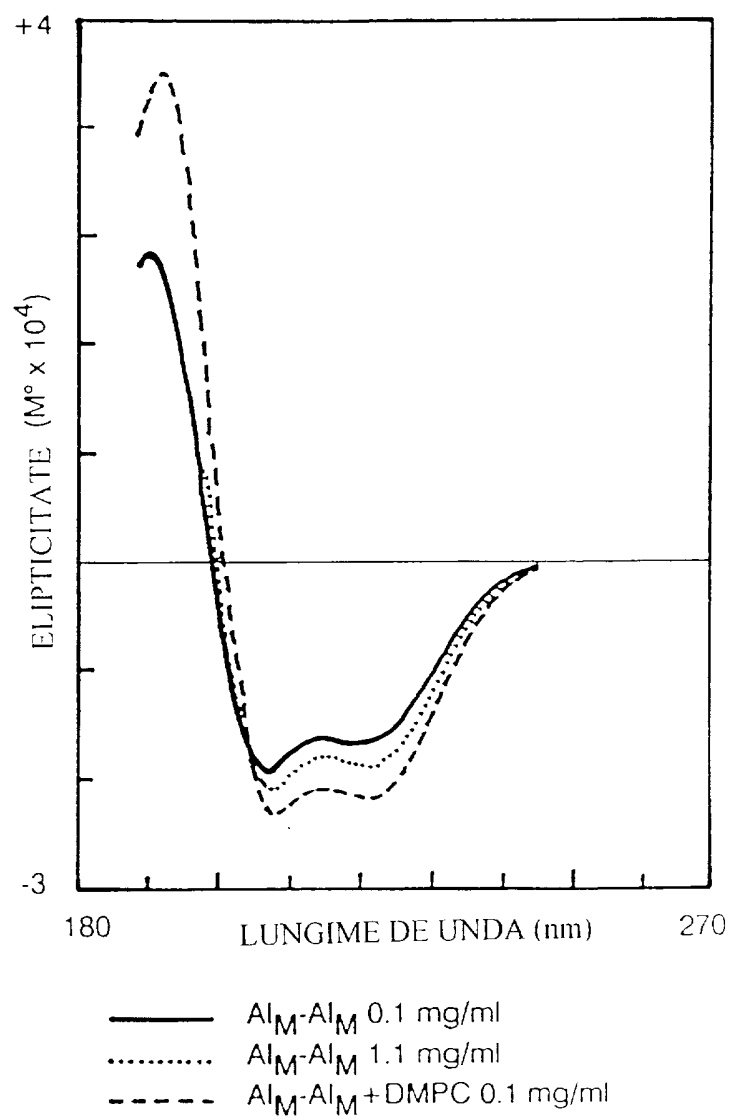


Fig. 12

(51) Int.Cl.⁷ C 07 K 15/16;
A 61 K 37/02;
A 61 K 35/16;

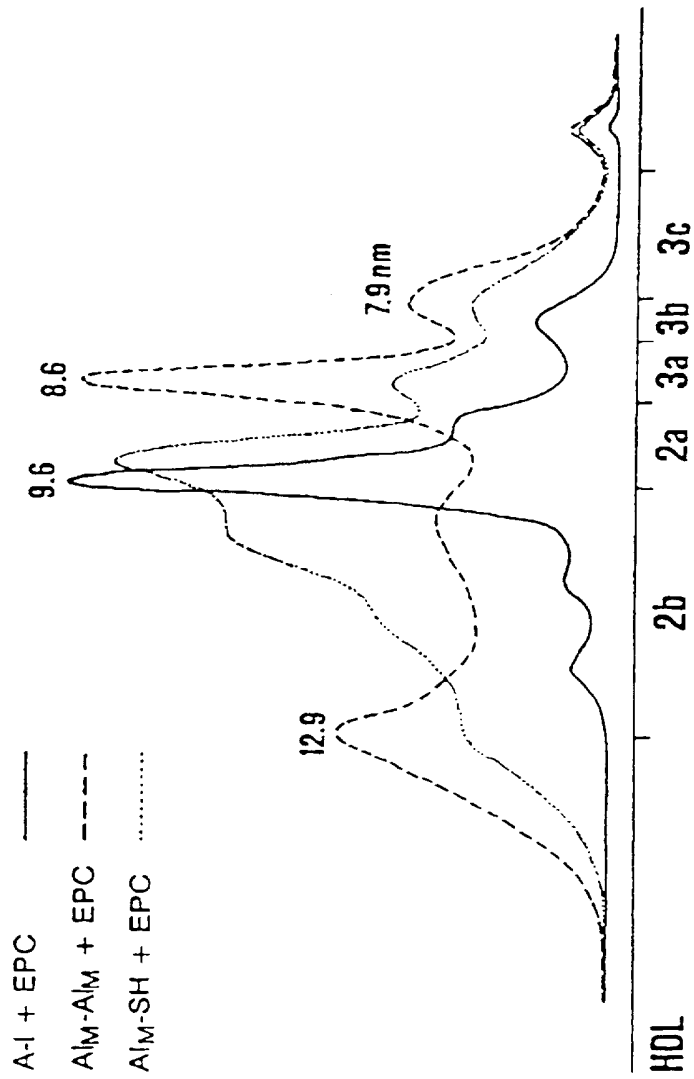


Fig. 13

