



F1000097298B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

97298

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 11 1996

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 07K 14/47, 1/22

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	883477
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	22.07.88
(24) Alkupäivä - Löpdag	22.07.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	24.01.89
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.08.96
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
23.07.87 US 077366 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Washington University, 724 S. Euclid Avenue, St. Louis, MO 63110, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Broze, Jr., George John, 15 Westpoint Lane, St. Louis, MO 63131, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä kudofaktorin inhibiittorin eristämiseksi
Förfarande för isolering av ett vävnadsfaktorinhibitor

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, 1987, pp 1886-1890

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Esitetään puhdistettu kudofaktorin inhibiittori, jolla on seuraavat ominaisuudet:

A. se esiintyy kahdessa muodossa, TFI₁ kulkee noin 37-40000 daltonin ja TFI₂ noin 25-26000 daltonin kohdalle natriumdodekyylisulfaatti-polyakrylamidigelelektroforesilla määritettynä,

B. sen osittainen N-pään aminohapposekvenssi on seuraava:

1	15
X-X-Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-His-Thr-Ile-Ile-Thr-Asp-Thr-Glu-	
16	27

Leu-Pro-Pro-Leu-Lys-Leu-Met-His-Ser-Phe-(Phe)-Ala

jossa X-X:ää ei ole määritetty, ja

C. sillä on inhibitorista aktiivisuutta Faktori X_a:lle.

En renad vävnadsfaktorinhibitor beskrivs med följande egenskaper:

A. den uppträder i två former, TFI₁ migrerande vid ca 37-40000 dalton och TFI₂ migrerande vid ca 25-26000 dalton bestämd genom natriumdodekyylisulfat-polyakrylamidgelelektrofores;

B. den har en partiell N-terminal aminosyrasekvens som följer:

1	15
X-X-Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-His-Thr-Ile-Thr-Asp-Thr-Glu-	
16	27

Leu-Pro-Pro-Leu-Lys-Leu-Met-His-Ser-Phe-(Phe)-Ala,

vari X-X ej har bestämts, och

C. den uppvisar inhibitorisk aktivitet för faktor X_a.

Menetelmä kudوسفaktorin inhibiittorin eristämiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää hyytymisinhibiittorin nimeltä kudوسفaktorin inhibiittori (TFI) eristysmenetelmää.

Nisäkkäiden veressä tapahtuva hyytymiskaskadi muodostuu kahdesta erillisestä systeemistä - niinkutsutuista sisäisestä ja ulkoisesta systeemistä. Jälkimmäinen systeemi aktivoituu veren altistuessa kudoksen tromboplastiinille (Faktori III), jota tästälähin kutsutaan kudوسفaktoriksi (TF). Kudوسفaktori on lipoproteiini, jota löytyy monien solutyypin plasmamembraanilta ja jota on erittäin paljon aivoissa ja keuhkoissa. Tullessaan yhteyteen TF:n kanssa, plasman Faktori VII tai sen aktivoitu muoto Faktori VII_a muodostaa kalsiumista riippuvaisen kompleksin TF:n kanssa ja sitten proteolyttisesti aktivoi Faktori X:n Faktori X_a:ksi ja Faktori IX:n Faktori IX_a:ksi.

Aikaisemmat TF:n aloittaman hyytymisen säätelyä koskevat tutkimukset näyttivät, että TF:n inkuboiminen (raaoissa kudoksen tromboplastiinipreparaateissa) seerumin kanssa inhiboi sen aktiivisuutta *in vitro* ja esti sen tappavaa vaikutusta, kun se infusoitiin hiireen. Laajat koeket [Hjort, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 9, Suppl. 27, 76-97 (1957)] vahvistivat ja laajensivat tämän alueen aiempia töitä ja johtivat päätelmään, että seerumin inhiboiva osa tunnisti Faktori VII-TF kompleksin. Yhdenmukaisia tämän hypoteesin kanssa ovat tosiseikat, että plasmassa tapahtuva TF:n inhibitio tarvitsee Ca²⁺:n läsnä-oloa (joka on myös tarpeellinen Faktori VII/VII_a:n sitoutumiselle TF:ään) ja että inhibitio voidaan estää ja/tai kumota sitomalla divalentit kationit EDTA:lla. Tämän keksijän ja muiden tekemät uudemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että ei ainoastaan Faktori VII_a:ta vaan myös katalyyttisesti aktiivista Faktori X_a:ta ja yhtä lisäfaktoraa tarvitaan TF:n inhibition aikaansaamiseksi plasmassa tai seerumissa.

Katso Broze ja Miletich, Blood 69, 150-155 (1987), ja Sanders et al., Ibid., 66, 204-212 (1985). Tätä lisäfaktorina, jota tässä kutsutaan kudوسفакторin inhibiittoriksi (TFI), on läsnä bariumilla absorboidussa plasmassa ja se näyttää
 5 olevan assosioituneena lipoproteiinien kanssa, koska TFI:n funktionaalinen aktiivisuus kulkee lipoproteiinifraktion kanssa, joka kulkee tiheyteen 1,21 g/cm³, kun seerumia sentrifugoidaan. Brozen ja Miletichin, supra, mukaan HepG2-solut (ihmisen hepatoomasolulinja) erittävät inhiboivaa
 10 osaa, joka on ominaisuuksiltaan samanlainen kuin plasmassa oleva TFI.

Esitetään kudوسفакторin inhibiittori (TFI), jolla on seuraavat ominaisuudet:

A. se esiintyy kahdessa muodossa, TFI₁ kulkee noin
 15 37-40000 daltonin kohdalle ja TFI₂ noin 25-26000 daltonin kohdalle natriumdodekyylisulfaatti-polyakrylamidigeeli-elektroforeesilla (SDS-PAGE) määritettynä,

B. sen osittainen N-pään aminohapposekvenssi on seuraavanlainen:

20 1 15
 X-X-Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-His-Thr-Ile-Ile-Thr-Asp-Thr-Glu-
 16 27
 Leu-Pro-Pro-Leu-Lys-Leu-Met-His-Ser-Phe-(Phe)-Ala

jossa X-X:ää ei ole määritetty, ja

25 C. sillä on inhibitorista aktiivisuutta Faktori X₁-lle.

Tämä TFI on eristetty erittäin puhtaina muotoina, joina se ei esiintynyt soluissa ja alkuperäisissä kudoslähteissä, joista se on saatu. Se tarkoittaa, että se on
 30 valmistettu puhdistettuina muotoina, jotka ovat oleellisesti vapaita muista proteiineista ja vapaita muista solukomponenteista ja kudosaineksestä.

Esitetyllä TFI:llä on biologista aktiivisuutta, joka antaa olettaa, että se on tärkeä lääketieteelle hyytymiskaskadin tutkimuksessa. Erikoisesti tämä TFI on
 35

osoittanut terapeuttista kelpoisuutta käytettäväksi hyytymisinhibiittorina ja veritulppien vastaisena aineena.

Tätä TFI:tä eritetään ravintoviljelyalustassa kasvavista HepG2-soluista ja sitten se voidaan eristää säädetystä alustasta. Eristys suoritetaan mieluummin kolmivaiheisella menetelmällä seuraavasti:

A. CdCl₂-saostus,

B. uudelleen liuotetun saostuman Faktori X₁ Affi-Gel 15 affiniteettikromatografia, ja

C. TFI-aktiivisuutta omaavien affiniteettikromatografiafraktioiden Superose 12 geelisuodatus.

Vaihtoehtoisessa eristysmenetelmässä Faktori X₁ inaktivoidaan vaiheessa B sitomalla di-isopropyylifosfaattiin (iPr₂P), vaiheessa C käytetään geelisuodatusmateriaalina Sephadex G-75:ttä ja neljäs vaihe D suoritetaan seuraavasti:

D. TFI-aktiivisuutta omaavien geelisuodatusfraktioiden Mono-Q ioninvaihtokromatografia.

Edellämainituissa menetelmissä HepG2 on hyvintunnettu ja laajasti käytetty ihmisen hepatoomasolulinja, jonka muodostaminen ja ominaisuudet on kuvattu US-patentissa 4393133. Tämän solulinjan näytteitä on myös saatavissa American Type Culture Collection'in pysyvästä kokoelmasta, Rockville, Maryland, koodinumerolla ATCC HB 8065.

HepG2-soluja voidaan kasvattaa noin 37 °C:ssa tavanomaisessa ravintoviljelyalustassa TFI:n ekspressoimiseksi. Suositeltava alusta on Earle'n modifioitu perusalusta (EMEM), jota on kaupallisesti saatavana. Muita sopivia kaupallisesti saatavia alustoja on kuvannut, esimerkiksi, Helen J. Morton, *In Vitro* 6 (2), 89-108 (1970). Nämä ravintoviljelyalustat sisältävät aminohappoja, mineraaleja, hiilihydraatteja, vitamiineja ja niitä on usein vahvistettu nisäkkään seerumilla, esim. härän sikiön seerumilla tai vasikan seerumilla, ja erilaisilla kasvutekijöillä. Tässä käytettynä HepG2-soluja kasvatetaan ensin mieluummin see-

rumia sisältävässä alustassa ja sitten ne siirretään serumivapaaseen alustaan, johon on lisätty kasvua stimuloivia määriä transferriniä, seleeniä, insuliinia, maksasolun kasvutekijää ja laktalbumiinihydrolysaattia.

5 Ylläolevassa vaiheessa A muodostunut CdCl_2 -saostuma laimennetaan suositeltavasti samalla tilavuudella puskuriliuosta ennen vaiheen B affiniteettikromatografiapylväeseen laittoa. Puskuriliuoksen tulisi sisältää biologisesti hyväksyttävän puskurimateriaalin vesiliuoksen, jonka pH on
10 säädetty noin 7,5:een. 0,05 M Tris-HCl:n käyttö on valaiseva esimerkki. Oleellisesti samanlaista puskuria voidaan sitten käyttää affiniteettikromatografiapylvään tasapainottamiseen.

Vaiheessa B käytetty Affi-Gel[®] 15 on kaupallisesti
15 saatavissa, aktivoitu affiniteettikantaja on valmistettu derivatoidun ristiinsidotun agarosigeelin N-hydroksisukkinimidiesterinä.

Geelisuodatusvaiheessa C käytetyt Superose[®] 12 ja Sephadex[®] G-75 ovat kaupallisesti saatavissa, pallomaiset
20 geelit on valmistettu ristiinsitomalla dekstraani epiklorohydriinin kanssa. Suositeltavalla superhienolla laadulla on halkaisija kokoluokkaa noin 20-50 μm .

Ennen laittoa geelisuodatuspylväeseen, vaiheen B TFI-aktiiviteettia omaavat affiniteettikromatografiafraktiot
25 suositeltavasti konsentroidaan esimerkiksi ultrasuodatuksella, jotta työskentelyliuoksen tilavuutta saadaan pienennettyä, ja pylväs voidaan tasapainottaa 1 M NaSCN:-llä, joka on puskuroitu pH:hon noin 7,5.

Vaihtoehtoisessa eristysmenetelmässä geelisuodatus-
30 vaiheen C jälkeen TFI-aktiiviteettia omaavat fraktiot suositeltavasti saostetaan asetonilla ja saostuma liuotetaan sitten uudelleen Mono-Q pylväeseen laittoa varten. Jälkimmäinen pylväs voidaan tasapainottaa 6 M urealla, joka on puskuroitu pH:hon noin 8,3.

Vaiheessa D käytetty Mono-Q on kaupallisesti saatavissa, se on vahva anioninvaihtoresiini, joka perustuu pallomaisessa muodossa olevaan hydrofiiliseen polymeeriin, jonka halkaisija on noin 10 μm , jolla on kvaternaarisia aminovarattuja ryhmiä.

Esillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä kudofaktorin inhibiittorin eristämiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa esitetään. Sopivia solulähteitä TFI:n saamiseksi ovat SK-HEP-1-solut (ATCC HTB 52) ja Chang Liver-solut (ATCC CCL 13).

Keksintö tulee paremmin ymmärrettäväksi seuraavien suositeltavien suoritustapojen ja mukanaseuraavien piirrosten kuvausten myötä, joissa piirroksissa lyhyesti:

Kuvio 1 on graafinen esitys, joka näyttää HepG2-soluista eristetyn konsentroidun TFI-preparaatin $i\text{Pr}_2\text{P}$ -ihmisen Faktori X_6 Affi-Gel affiniteettikromatografian jälkeisen eluutioprofiilin eräässä suoritustavassa.

Kuvio 2 on graafinen esitys, joka näyttää kuvion 1 TFI-aktiivisista fraktioista muodostetun konsentroidun näytteen Sephadex G-75 geelisuodatuksen jälkeisen eluutioprofiilin.

Kuvio 3 on graafinen esitys, joka näyttää kuvion 2 TFI-aktiivisista fraktioista muodostetun konsentroidun näytteen Mono-Q ioninvaihtokromatografian jälkeisen eluutioprofiilin.

Kuvio 4 näyttää kuvion 3 puhdistetun TFI-näytteen SDS-PAGE:n.

Kuvio 5 on graafinen esitys, joka näyttää vertailun kuvion 3 puhdistetun TFI:n ja normaalin ihmisen seerumin välillä TFI-kokeessa.

Kuvio 6 on graafinen esitys, joka näyttää kuvion 3 puhdistetun TFI:n inhibitorisen vaikutuksen Faktori X_6 :han verrattuna sen vaikutuksen puutokseen trombiinilla.

Kuvio 7 on graafinen esitys, joka näyttää kuvion 3 puhdistetun TFI:n aiheuttaman nopean TF-aktiviteetin inhibition Faktori VII $_6$:n, Faktori X_6 :n ja Ca^{++} :n läsnäollessa.

Kuvio 8 on graafinen esitys, joka näyttää HepG2-soluista eristetyn konsentroidun TFI-preparaatin härän Faktori X_a Affi-Gel affiniteettikromatografian jälkeisen eluutioprofiilin toisessa suoritustavassa.

5 Kuvio 9 on graafinen esitys, joka näyttää kuvion 8 TFI-aktiivisten fraktioiden muodostaman konsentroidun näytteen Superose 12 geelisuodatuksen jälkeisen eluutioprofiilin.

10 Kuvio 10 näyttää kuvion 9 pelkistyneen, puhdistetun TFI-näytteen SDS-PAGE:n.

Kuvio 11 näyttää kuvion 9 pelkistymättömän, puhdistetun TFI-näytteen SDS-PAGE:n.

15 Kuvio 12(A) näyttää keksinnön mukaisesti Chang Liver-soluista (kaista 2) ja SK-HEP-1-soluista (kaistat 3 ja 4), sekä HepG2-soluista (kaistat 5 ja 6) immunoaffiniteettikromatografialla eristetyn TFI:n SDS-PAGE:n kaistalla 1 näytettyjen molekyylipainostandardimarkkereiden kanssa.

20 Kuvio 12(B) näyttää kuvion 12(A) elektroforeettisesti erotettujen proteiinien Western-blottauksen nitroselluloosapaperille kaistoilta 2, 3, 4 ja 6 vastaavassa järjestyksessä kaistoilla 1, 2, 3 ja 4 ja ¹²⁵I-X_a-värjäyksen jälkeisen autoradiografian.

25 Keksinnön spesifisten suositeltavien suoritustapojen tarkempaa yksityiskohtaista kuvausta varten suoritettiin seuraavat esimerkkeinä käytetyt laboratoriotyöt. Esimerkissä 1 TFI eristettiin nelivaiheisella menetelmällä ja esimerkissä 2 kolmivaiheisella menetelmällä HepG2-solujen säädetyistä alustasta, kuten tässä on aiemmin määritelty. 30 Esimerkit 1 ja 2 ovat vertailuesimerkkejä. Esimerkissä 3 TFI eristettiin keksinnön mukaisesti useista solulähteistä immunoaffiniteettikromatografialla.

Esimerkki 1 (Vertailuesimerkki)

35 Materiaalit. Affi-Gel 15 ja matalan molekyylipainon omaavat standardit polyakrylamidielektroforeesiin hankit-

tiin Bio-Rad Laboratories'lta. Na¹²⁵I (kantaja-vapaa) hankittiin New England Nuclear'lta, ja Iodo-Gen hankittiin Pierce Chemical Co.:lta. Sephadex G-75 superhieno laatu ja Mono-Q pylväs saatiin Pharmacia Inc.:lta. Earle'n modifioitu perusalusta (EMEM) ja härän sikiön ja vasikan seerumit saatiin KC Biological Inc.:lta (Lenexa, KS) ja maksasolun kasvutekijä saatiin Miles Laboratories'lta. Härän seerumialbumiini, fenyyylimetyylisulfonyylifluoridi, diisopropyylifluorofosfaatti (iPr₂P-F), akrylamidi, metyleeni-bis(akrylamidi), kanin aivojen kefaliini, transferriini, seleeni, insuliini, laktalbumiinihydrolysaatti, HEPES (N-2-hydroksietyyli-piperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappo), MOPS (3-(N-morfolino)propanisulfonihappo) ja Trizma-emäs [Tris(hydroksimetyyli)aminoetaani] hankittiin Sigma Chemical Co.:lta. Kaikki muut kemikaalit olivat reagenssilaatua tai parempaa ja hankittiin Fisher Scientific Co.:lta tai Sigma'lta. Ihmisen plasma, josta puuttui Faktori X, hankittiin George King Biomedical'lta (Overland Park, KS). Terveiden verenluovuttajien seeruminäytteet saatiin Amerikan Punaiselta Ristiltä (St. Louis, MO). HepG2-solut hankittiin American Type Culture Collection'lta.

Proteiinit. Valmistettiin raakapreparaatti TF:stä ja pestiin voimakkaasti EDTA:lla [Broze ja Miletich, Blood 69, 150-155 (1987); Broze ja Majerus, J. Biol. Chem. 225, 1242-1247 (1980)]. Faktori X hyytymisproteiini Russell'in kyykkäärmeen myrkystä (XCP), antitrombiini IIIa, Faktori VII, ja ihmisen Faktori X puhdistettiin kuten ovat kuvanneet Broze ja Miletich, supra; Broze et al., J. Biol. Chem. 260, 10917 (1985); Peterson ja Blackburn, J. Biol. Chem. 260, 610-615 (1985); ja Miletich, Broze ja Majerus, Methods Enzymol. 80, 221-228 (1981). Faktori X₂ tuotettiin puhdistetusta Faktori X:stä inkuboimalla liuottamattoman X hyytymisproteiinin kanssa ja inaktivoitiin iPr₂P-F:llä [Broze ja Miletich, supra; Bajaj et al., Prep. Biochem. 11, 397-412 (1981)]. iPr₂P-Faktori X₂ kiinnitettiin Affi-

Gel 15:een niin, että loppukonsentraatioksi tuli noin 2 mg/ml pakattua geeliä käyt-täen valmistajan julkaisemia ohjeita (MOPS-puskuri, pH 7,5).

Koe. Allaolevaa kolmivaiheista koetta käytettiin TF:n inhibitiioon puhdistuksen aikana (Broze ja Miletich, supra). Ensimmäisessä vaiheessa 10 µl Faktori VII_a:ta (1 µg/ml), 10 µl Faktori X:ää (10 µg/ml), 10 µl CaCl₂:ia (40 mM), 10 µl antitrombiini IIIa (650 µg/ml), 50 µl testat-tavaa näytettä laimennettuina TBSA-puskuriin (0,1 M NaCl/ 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, joka sisältää härän seerumialbu-miinia 1 mg/ml) ja 10 µl raakaa, EDTA-pestyä TF:ää (10 % vol/vol) inkuboitiin huoneenlämmössä. 30 minuutin kuluttua 10 µl:aa näytettä laimennettiin 100-kertaisesti TBSA-pus-kuriin, jossa oli 5 mM CaCl₂:ia. Viisikymmentä mikrolitraa tätä laimennettua näytettä, 50 µl Faktori VII_a:ta (1 µg/ml), 50 µl CaCl₂ (25 mM) ja 50 µl Faktori X:ää (10 µg/ml) inkuboitiin sitten 37 °C:ssa. Minuutin kuluttua lisättiin 50 µl seosta, joka sisälsi 10 osaa Faktori X puutteellista plasmaa ja yhden osan kanin aivojen kefaliinin kantarea-genssia (valmistettu, kuten ovat kuvanneet Bell ja Altone, Nature 174, 880 (1954) ja saatettu käyttövalmiiksi valmis-tajan julkaisemien ohjeiden mukaisesti, Sigma) ja hyytymän muodostumiseen kulunut aika mitattiin fibrometrillä (Bal-timore Biological Laboratory, Cockeysville, MD).

Seokset, joissa TBSA:ta mieluummin kuin näytettä inkuboitiin ensimmäisessä vaiheessa, toimivat kontrolleina. Kokeessa raa'an TF:n konsentraatio valittiin niin, että kontrollin hyytymisajaksi tuli 35-40 sekuntia. Kokeeseen sisällytettiin antitrombiini IIIa:aa, jotta saatiin vähennettyä ensimmäisen vaiheen inkubaation aikana muodos-tuneen Faktori X_a:n vaikutusta kokeen kolmannen vaiheen hyytymisaikaan. Suhteellinen TFI aktiivisuus laskettiin standardisuoralta, joka valmistettiin piirtämällä (log-log paperille) kontrolliarvon yli menneet hyytymisajan piden-nykset sekunteina normaalin yhdistetyn seerumin (50 luo-

vuttajaa) loppukonsentraation funktiona kokeen ensimmäisessä vaiheessa. Tämä standardisuora oli lineaarinen seerumikonsentraatioissa 1-10 % (vol/ vol). Yksi yksikkö TFI aktiivisuutta määritettiin määräksi, jonka 1 ml normaalia yhdistettyä seerumia sisälsi. Tulokset kromatografiafraktiokokeista on ilmoitettu hyytymisaikoina eikä niitä ole muutettu yksiköiksi/ml.

NaDodSO₄/PAGE suoritettiin 15 % geeleissä (4 % kon-
sentrointigeeli) Laemmlin menetelmällä, Nature (London)
10 227, 680-685 (1970). Pelkistettyjä näytteitä kuumennettiin
100 °C:een 5 minuuttia 10 % 2-merkaptotaetanolin läsnäollessa
ennen elektroforeesia. TFI eristettiin NaDodSO₄/PAGE:n jäl-
keen leikkaamalla kaista geelistä, antamalla sen liota 30
minuuttia 0,1 M NaCl/0,05 M Tris-HCl-liuoksessa, pH 7,5,
15 leikkaamalla se 2 mm:n paloihin ja inkuboimalla kutakin
palaa yön yli 100 µl:ssa 1 M NaSCN/0,05 M Tris-HCl, pH
7,5/0,025 % Lubrol PX-liuoksessa (biologinen nonioninen
detergentti, joka koostuu rasva-alkoholin etyleenioksi-
tiivisteestä), joka sisälsi härän seerumialbumiinia 0,5
20 mg/ml. Sitten uutetun materiaalin 1:50 laimennos TBSA:ssa
testattiin kuten on kuvattu yllä TF:n inhibitiota varten.
Western-blottaus suoritettiin, kuten ovat kuvanneet Broze,
Hickman ja Miletich, J. Clin. Invest. 76, 937-946 (1985),
käyttäen koettimena ¹²⁵I-leimattua Faktori X_a:ta. Puhdiste-
25 tun TFI:n (110 pmol) aminohappokoostumus määritettiin 6 M
HCl:ssa 110 °C:ssa suoritettuna 24 tunnin hydrolyysin jälkeen
Beckman 6300 autoanalysointorissa pylvään jälkeisellä nin-
hydriini-derivatisaatiolla.

Soluviljely. HepG2-soluja viljeltiin muovisissa tai
30 lasisissa pyörivissä pulloissa (850 cm²). Alkunuorennuksen
jälkeen soluja kasvatettiin EMEM:ssä, jossa oli vähemmän
tärkeitä aminohappoja ja penisilliiniä (10³ yksikköä/ml),
streptomysiiniä (100 µg/ml), amfoterisiiniä (250 ng/ml),
natriumpyruvaattia (100 mM), L-glutamiinia (200 mM) ja 5 %
35 härän sikiön seerumia ja 5 % naudan seerumia vaihtaen ra-

vintoalusta kahdesti viikossa. 2 viikon kuluttua seerumia sisältävä ravintoalusta poistettiin ja solut pestiin varovaisesti EMEM:llä ja sen jälkeen viljeltiin seerumivapaassa ravintoalustassa, joka koostui samoista yllämainituista aineista ja lisäksi mukana oli transferriniä (5 µg/ml), seleeniä (5 ng/ml), insuliinia (5 µg/ml), maksasolun kasvutekijää (20 pg/ml), laktalbumiinihydrolysaattia (5 mg/ml) ja HEPES:iä (25 mM). Säädetty ravintoalusta poistettiin ja korvattiin tuoreella seerumivapaalla ravintoalustalla kahdesti viikossa. HepG2-soluja voidaan ylläpitää näissä olosuhteissa >3 kuukautta.

N-pään aminohapposekvenssin määrittäminen. Puhdistetun TFI:n NH₂-pään proteiinisekvenssin määrittämiseen käytettiin automatisoitua Edmanin degradaatiokemiala. Degradaatioissa käytettiin Applied Biosystems Inc.:n malli 470A kaasufasisekvenaattoria (Foster City, CA), Hunkapiller et al., Methods Enzymol. 91, 399-413 (1983). Vastaavat PTH-amino-happojohdannaiset tunnistettiin RP-HPLC-analyysillä online-tavalla käyttäen Applied Biosystems Inc.:n Model 120A PTH Analyzer'ia, johon oli sovitettu Brownlee 2.1 mm I.D. PTH-C₁₈ pylväs. Näytteeseen käytettiin elektroblottaustekniikkaa suoraan SDS-PAGE:sta eristettyjen rintamien sekvensoimiseksi. Käytetyt menetelmät olivat, kuten ovat kuvanneet Aebersold et al., J. Biol. Chem. 261, 4229-4238 (1986). Näitä sekvensointimenetelmiä käyttäen kahta ensimmäistä N-pään aminohappoa ei saatu selville, mutta aminohapot 3-27 määritettiin seuraaviksi:

	1	15
	X-X-Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-His-Thr-Ile-Ile-Thr-Asp-Thr-Glu-	
30		27
	Leu-Pro-Pro-Leu-Lys-Leu-Met-His-Ser-Phe-(Phe)-Ala	

TFI:n puhdistus. Jollei muuten mainittu, puhdistusmenetelmä suoritettiin huoneenlämmössä. Puhdistusmenetelmästä on tehty yhteenveto allaolevan taulukon 1 oleellisesti nelivaiheisessa kaaviossa.

Taulukko 1. TFI:n puhdistus

Vaihe	Proteiinia mg*	Aktiivisuus, yksikköä	Spesifinen aktiivisuus yksikköä/mg	Saanto, Puhdistus, % kertainen	I
Seerumivapaa alusta	23.400 (2840)+	4400	0,88 (1,55)±	100	1
CdCl ₂ -saostus, elutio ja dia- lyysi	480	4090	8,52	93	45(5.50)±
iPr ₂ P-Faktori X _a - Affi-Gel	7,0	1240	180	28	957 (116)±
Sephadex G-75	0,83	870	1050	20	5.590 (677)±
Mono-Q	0,06	590	9800	13	52.100(6320)±

*Laskettu olettaen, että vaimennuskerroin 280 nm:ssä on $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 10$

+Alustaa on voimakkaasti dialysoitu TS-puskuria vastaan.

+Arvot perustuvat M_r 10000 cut-off-arvolla dialysoituun alustaan.

Yksityiskohtainen puhdistusmenetelmä oli seuraavanlainen.

A. Kadmiumkloridisaostus

HepG2-solujen seerumivapaata säädettyä alustaa (4
5 litraa) sentrifugoitiin fenyyylimetyylisulfonyylifluoridin
(loppukonsentraatio 0,1 M) ja NaN_3 (loppukonsentraatio 0,05
% wt/vol) lisäyksen jälkeen 2500 x g 30 minuuttia partik-
keleista muodostuvan roskan poistamiseksi. Sitten lisät-
tiin CdCl_2 :ta (1,0 M) niin, että loppukonsentraatioksi tuli
10 5 mM ja seosta sekoitettiin 15 minuuttia. Saostuma, joka
sisälsi TFI-aktiivisuuden, kerättiin sentrifugoimalla
(2500 x g 30 minuuttia) ja supernatantti kaadettiin pois.
Nappi liuotettiin 40 ml:aan 0,5 M EDTA/5 mM $i\text{Pr}_2\text{P-F}$ -liuos-
ta, pH 9,5, ja sitten dialysoitiin voimakkaasti TS-pusku-
15 ria (0,1 M NaCl/ 0,05 M Tris-HCl/0,1 mM fenyyლისulfonyyli-
fluoridi/0,5 mM EDTA/0,02 % NaN_3 , pH 7,5) vastaan.

B. $i\text{Pr}_2$ -Faktori X_a Affi-Gel 15 kromatografia

Dialysoitu preparaatti kirkastettiin sentrifugoimalla
(10000 x g 15 minuuttia) ja laitettiin TS-puskurissa
20 tasapainotettuun $i\text{Pr}_2\text{P}$ -Faktori X_a -Affi-Gel 15 pylvääseen.
Geeliä pestiin aloituspuskurilla ja sitoutunut materiaali
eluoitiin 2 M NaSCN/0,05 M Tris-HCl, pH 7,5/0,05 % Lubrol
PX/0,02 % NaN_3 /0,1 mM fenyyylimetyylisulfonyylifluoridi-
liuoksella (kuvio 1). TFI-aktiivisuutta omaavat fraktiot
25 yhdistettiin ja konsentroitiin noin 1 ml:aan käyttäen YM5
hydrofiilistä ultrasuodatusmembraania (Amicon).

C. Geelisuodatus ja asetonidelipidaatio

Konsentroidu näyte laitettiin Sephadex G-75 super-
hienoa laatua sisältävään 1 M NaSCN/0,05 M Tris-HCl, pH
30 7,5/ 0,05 % Lubrol PX/0,02 % NaN_3 /0,1 mM fenyyylimetyylisul-
fonyylifluoridiliuoksella tasapainotettuun pylvääseen (ku-
vio 2). TFI-aktiivisuutta omaavat fraktiot yhdistettiin ja
sekoitettiin 8 tilavuuden kanssa asetonia. 30 minuutin
kuluttua kerättiin saostuma sentrifugoimalla (10000 x g,
35 20 minuuttia 10 °C:ssa).

D. Mono-Q ioninvaihtokromatografia

Asetonisaostuma liuotettiin 1,0 ml:aan 6 M urea/
 0,02 M Tris-HCl/0,05 % Lubrol PX-liuosta, pH 8,3, ja lai-
 tettiin samassa puskurissa tasapainotettuun Mono-Q pylvää-
 5 seen. Pylväs eluoitiin 30 ml:n lineaarisella gradientilla,
 joka alkoi aloituspuskurilla ja päättyi 6 M urea/0,5 M
 Tris-HCl/0,05 % Lubrol PX-liuokseen, pH 8,3 (kuvio 3).
 TFI-aktiivisuutta sisältävät fraktiot yhdistettiin kuvion
 3 osoittamalla tavalla, konsentroitiin noin 1 ml:aan (YM5,
 10 Amicon), dialysoitiin 1 M NaSCN/0,05 M Tris-HCl/0,05 %
 Lubrol PX-liuosta, pH 7,5, vastaan ja säilytettiin 4 °C:-
 ssa.

TFI:n ominaisuudet. Puhdistetun TFI:n NaDodSO₄/PAGE
 osoitti vahvan rintaman kohdilla M_r 38000 (pelkistymätön)
 15 tai 39000 (pelkistynyt) (kuvio 4). Puhdistetun preparaatin
 pelkistymättömän näytteen NaDodSO₄/PAGE:n jälkeen suoritet-
 tu geelipalojen uutto osoitti, että inhibiitioaktiivisuus
 kulki yhdessä Coomassie-värjätyin rintaman kanssa. Kuten
 odotettua, ¹²⁵I-leimattu Faktori X_a tunnisti tämän saman
 20 rintaman immunoblottauksessa (tuloksia ei nähtävillä).
 Puhdistetun TFI:n aminohappokoostumus näytetään allaole-
 vassa taulukossa 2. Puhdistettu TFI näytti olevan saman-
 lainen seerumissa läsnäolevan inhibiittorin kanssa siinä,
 että se tarvitsi Faktori VII_a:ta, Faktori X:ää ja Ca²⁺:ia
 25 aktiivisuuden ilmentymiseen (Broze ja Miletich, supra)
 (taulukko 3, alla), ja puhdistetun TFI:n laimennokset
 tuottivat normaalin ihmisen seerumin standardisuoran kans-
 sa yhdensuuntaisen suoran (kuvio 5).

Puhdistetun TFI:n inkubaatio (250 ng/ml) Faktori
 30 X_a:n (25 ng/ml) kanssa johti X_a:n hyytymisaktiivisuuden
 häviämiseen toiminnallisessa biotestissä (kuvio 6). Tämä
 TFI:n inhibitorinen vaikutus ei ollut yleinen, kaikkia
 seriiniproteaaseja vastaan suunnattu ominaisuus, koska
 trombiiniin inkubaatio TFI:n kanssa ei vaikuttanut miten-
 35 kään (kuvio 6).

Faktori VII_a:n, Faktori X_a:n ja Ca²⁺:n läsnäollessa TFI aiheutti erittäin nopean TF-aktiivisuuden inhibition, jonka havaittava t_{1/2} oli 20 sekuntia (kuvio 7). Heparinin (0,5 yksikköä/ml) sisällyttäminen mukaan seoksiin kiihdytti inhibition alkunopeutta 3-kertaisesti (t_{1/2} = 6 sekuntia). Antitrombiini IIIa:n (65 µg/ml) sisällyttäminen reaktioon ei vaikuttanut TFI:n aiheuttamaan havaittavan TF-aktiivisuuden inhibition.

Taulukko 2. TFI:n aminohappokoostumus

Aminohappo	Lyhennys	Moolia per 38000g proteiinia
Asparagiinihappo	Asp	40
Treoniini	Thr	20
Seriini	Ser	19
Glutamiinihappo	Glu	44
Proliini	Pro	15
Glysiini	Gly	33
Alaniini	Ala	19
Kysteiini	Cys	13*
Valiini	Val	12
Metioniini	Met	+
Isoleusiini	Ile	15
Leusiini	Leu	27
Tyrosiini	Tyr	10
Fenylalaniini	Phe	20
Histidiini	His	5
Lysiini	Lys	26
Arginiini	Arg	18
Tryptofaani	Trp	ND

ND, ei määritetty.

*Kysteiiniarvo on 24 tunnin hydrolyysistä; performaattihappohapetusta ei suoritettu.

+Metioniini hapetettiin hydrolyysin aikana; yhtään ei havaittu.

Taulukko 3. Faktori VII:n, Faktori X:n ja Ca²⁺:n tarve puhdistetun TFI:n aktiivisuuden ilmentymiselle

Poisto ensimmäisestä vaiheesta*	Hyytymisaika,+ sekunteja
Ei mitään	95,3
Faktori X	40,2
Faktori VII _a	41,3
Ca ²⁺ (5 mM EDTA)	40,8
Kontrolli	37,7

*Katso ylläoleva TFI-kokeen kuvaus.

+Tulokset ovat keskiarvot kahdesta kokeesta. TFI:n loppukonsentraatio oli 10 ng/ml kokeen ensimmäisessä vaiheessa.

Ylläolevasta HepG2-säädetyistä alustasta eristetyin TFI:n funktionaaliset ominaisuudet kuvattiin seuraavanlaisesti.

Hyytymiskokeet: TFI:n aiheuttama Faktori X_a :n inhibitio. Reaktioseoksia, jotka sisälsivät puhdistettua TFI:tä (250 ng/ml), Faktori X_a :ta (25 ng/ml) ja joko EDTA:ta (1 mM) tai $CaCl_2$:ia (5 mM) ja kanin aivojen kefaliniin varastoliuoksen 1:40 laimennosta (valmistettu Sigman julkaisemien ohjeiden mukaisesti) TBSA:ssa (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 mg/ml härän seerumialbumiinia), inkuboitiin huoneenlämmössä. Lisättiin eri aikoina 100 μ l:n osanäytteitä fibrometrin kuppiin, joka jo sisälsi 50 μ l $CaCl_2$:ia (25 mM) ja 50 μ l kanin aivojen kefaliniin (varastoliuoksen 1:10 laimennosta) 37 °C:ssa. Sitten välittömästi lisättiin 50 μ l Faktori X:ää sisältämätöntä plasmaa ja hyytymän muodostumiseen kulunut aika mitattiin fibrometrillä (BBL, Cockeysville, MD). Faktori X_a -aktiivisuus määritettiin vertaamalla hyytymisaikoja standardisuoraan, joka oli valmistettu käyttäen samoihin inkubaatioseoksiin valmistettuja X_a :n laimennoksia, joista TFI puuttui.

TFI:n aiheuttama trombiinin inhibitio: TFI:tä (400 ng/ml) ja trombiinia (0,5 yksikköä/ml, 180 ng/ml) sisältäviä reaktioseoksia inkuboitiin huoneenlämmössä TBSA:ssa. Eri aikoina lisättiin 100 μ l:n osanäytteitä 100 μ l:aan 37 °C:ssa lämmitettyä 0,15 M NaCl, 6,6 gm/l PEG-6000, 10 mM imidatsoli, 10 mM $CaCl_2$ -liuosta, pH 7,4. Sitten lisättiin välittömästi 50 μ l fibrinogeeniä (2 mg/ml) ja hyytymän muodostumiseen kulunut aika mitattiin fibrometrillä. Suhteellinen trombiiniaktiivisuus määritettiin käyttäen trombiinilaimennoksien avulla valmistettua standardisuoraa.

TFI:n aiheuttama TF:n inhibitio: 100 μ l seosta, joka sisälsi Faktori VII_a:ta (200 ng/ml), Faktori X_a :ta (200 ng/ml), $CaCl_2$:ia (8 mM) ja TF:ää (2 % v/v), jota oli inkuboitu huoneenlämmössä 1 minuutti, lisättiin 100 μ l:aan TFI:tä (600 ng/ml) sisältävää TBSA:ta, jossa joko oli tai

ei ollut antitrombiini IIIa:ta (130 µg/ml) ja hepariinia (1 yksikkö/ml). Sen jälkeen poistettiin spesifioiduissa aikapisteissä 10 µl:n näyte ja laimennettiin 100-kertaisesti TBSA:han, jossa oli 5 mM CaCl₂:ia. Käytännöllisyyden vuoksi aiemmista aikapisteistä valmistetut laimennetut näytteet jätettiin odottamaan kunnes lopullinen 1 minuutin näyte oli saatu ja sitten kaikki testattiin jäljelläolevan TF-aktiivisuuden suhteen käyttäen kaksivaiheista koetta. 50 µl Faktori VIIa:ta (1 µg/ml), 50 µl CaCl₂:ia (25 mM), 50 µl laimennettua näytettä ja 50 µl Faktori X:ää (10 µg/ml) inkuboitiin 37 °C:ssa. 1 minuutin kuluttua lisättiin 50 µl seosta, joka sisälsi 10 osaa Faktori X:ää sisältämätöntä plasmaa ja 1 osan kanin aivojen kefaliinin varastoreagenssia (valmistettu Sigman kuvauksen mukaisesti) ja hyytymän muodostumiseen kulunut aika mitattiin fibrometrillä. Koska tämä TF-koee sisältää näytteen laimentamisen alkuperäisestä inkubaatioseoksesta ja 1-2 minuutin lisäinkubaation, saatuja inhibitionopeuksia pidetään tässä "ilmeisinä" nopeuksina.

Ylläolevien puhdistetun TFI:n eristykseen ja funktionaaliseen testaukseen johtaneiden laboratoriotyötulosten lisäksi esitetään esimerkkeinä seuraavat yksityiskohdalliset piirrosten kuvaukset kuvista 1-7.

Kuvio 1. Tämä kuva esittää iPr₂P-Faktori X_a-Affi-Gel affiniteettikromatografian. CdCl₂-saostuksen ja uuton jälkeen dialysoitu TFI-preparaatti (noin 100 ml) laitettiin 1,5 x 40 cm:n iPr₂P-Faktori X_a-Affi-Gel 15 pylvääseen, joka oli tasapainotettu 0,1 M NaCl/0,05 M Tris-HCl, pH 7,5/0,5 mM EDTA/ 0,02 % NaN₃/0,1 mM fenyyylimetyylisulfonyylifluoridi-liuoksessa. Aloituspuskuripesun jälkeen TFI eluointiin 2 M NaSCN/0,05 M Tris-HCl, pH 7,5/0,05 % Lubrol PX/0,1 mM fenyyylimetyylisulfonyylifluoridi-liuoksella. Virtausnopeus oli 3 ml/tunti ja fraktion koko oli 4 ml. Näytteet laimennettiin 500-kertaisesti TFI-kokeeseen. Fraktiot 66-70 yhdistettiin.

Kuvio 2. Tämä kuva esittää ultrasuodatuksen Sephadex G-75 superhienolla laadulla. iPr_2P -Faktori X_s -Affi-Gel kromatografiasta saatu konsentroitunut näyte (noin 1 ml) laitettiin Sephadex G-75 superhienoa laatua sisältävään 1 x 120 cm:n kokoiseen pylvääseen. Virtausnopeus oli 1,5 ml/tunti ja fraktion koko oli 1 ml. Näytteet laimennettiin 2000-kertaisesti TFI-kokeeseen. Fraktiot 34-41 yhdistettiin.

Kuvio 3. Tämä kuva esittää Mono-Q ioninvaihtokromatografian. Asetonisaostuksen jälkeen TFI liuotettiin 6 M urea/0,02 M Tris-HCl, pH 8,3/0,05 % Lubrol PX-liuokseen ja laitettiin samassa puskurissa tasapainotettuun 1 ml:n Mono-Q pylvääseen. Aloituspuskuripesun jälkeen pylväs eluotettiin 30 ml:n gradientilla, joka alkoi aloituspuskurista ja päättyi lopetuspuskuriin (6 M urea/0,5 M Tris-HCl, pH 8,3/0,05 % Lubrol PX). Virtausnopeus oli 20 ml/tunti ja fraktion koko oli 1 ml. Näytteet laimennettiin 2000-kertaisesti TFI-kokeeseen. Vaakasuora viiva osoittaa fraktiot, jotka yhdistettiin.

Kuvio 4. Tämä kuva esittää puhdistetun TFI:n NaDodSO₄/PAGE:n. Puhdistettu TFI (3,75 µg per kaista) ajettiin NaDodSO₄/PAGE:ssa joko pelkistymättömänä (2 kaistaa) tai pelkistyksen jälkeen 10 % 2-merkaptetaanolilla (1 kaista). (Ylempi) Yksi pelkistymätöntä TFI:tä sisältävä kaista leikattiin geelistä ja pilkottiin ja TFI-aktiivisuus uutettiin koetta varten. (Alempi) Coomassie blue-värijäys pelkistetystä (R) ja pelkistymättömästä (U) TFI:stä. Aloituskohta on vasemmalla.

Kuvio 5. Tämä kuva esittää puhdistetun TFI:n ja normaalin ihmisen seerumin vertailun TFI-kokeessa. Puhdistetun TFI:n laimennokset testattiin TFI:n funktionaalisessa kokeessa ja verrattiin normaalia ihmisen seerumia käyttäen valmistettuun standardisuoraan. y-akselilla on hyytymisen pidentyminen kontrolliarvon yli (39 sekuntia) ja x-akselilla on TFI:n (●, ng/ml) tai normaalin ihmisen see-

rumin (0 % vol/vol) loppukonsentraatio kokeen ensimmäisessä vaiheessa.

Kuvio 6. Tämä kuva esittää TFI:n vaikutuksen Faktori X_a :han ja trombiiniin. Puhdistettua TFI:tä ja joko X_a :ta tai trombiinia sisältävät reaktioseokset valmistettiin, kuten yllä on kuvattu. Spesifioituina aikoina poistettiin näytteitä ja testattiin jäljelläolevan entsyymiaktiivisuuden suhteen biotestillä. -- , trombiini; o--o, X_a ; O--O, X_a fosfolipidien ja Ca^{++} kanssa. Kontrolliseoksissa, joissa ei ollut TFI:tä, ei tapahtunut X_a :n tai trombiinin aktiviteetin häviämistä (ei näytetty).

Kuvio 7. Tämä kuva esittää TFI:n aiheuttaman kudoshäviön (TF) inhibition. Seokset, jotka sisälsivät VII_a:ta (100 ng/ml), X_a :ta (100 ng/ml), Ca^{++} :ia (4 mM), TF:ää (1 % v/v), TFI:tä (300 ng/ml) antitrombiini III:n (65 µg/ml) ja hepariinin (0,5 yksikköä/ml) läsnäollessa tai ilman niitä, valmistettiin huoneenlämmössä. Spesifioituina aikoina poistettiin näytteitä, laimennettiin ja testattiin jäljelläolevan TF-aktiivisuuden suhteen. o--o, ilman antitrombiini IIIa:ta tai hepariinia; -- , hepariinin kanssa, mutta ilman antitrombiini IIIa:ta; -- , antitrombiini IIIa:n kanssa, mutta ilman hepariinia; -- , antitrombiini IIIa:n ja hepariinin kanssa; avoimet merkit yläosan vaakasuoralla linjalla (100 % aktiivisuus) edustavat vastaavia inkubaatioseoksia ilman TFI:tä.

Esimerkki 2 (Vertailuesimerkki)

TFI:n eristys HepG2-solujen säädetyistä alustasta suoritettiin kuten ylläolevassa esimerkissä 1 seuraavin muutoksin:

1. Eristys suoritettiin oleellisesti kolmivaiheisella menetelmällä tässä aiemmin määritellyn nelivaiheisen menetelmän sijasta.

2. $CdCl_2$ -saostusvaiheessa A käytettiin erilaista puskurisysteemiä (katso alla) ja dialyysi jätettiin pois.

3. Faktori X_1 Affi-Gel 15 affiniteettikromatografia-
vaiheessa B käytettiin härän Faktori X_1 :ta ilman sitomista
iPr₂P:hen iPr₂P:hen sidotun ihmisen Faktori X_1 :n sijasta.

4. Geelisuodatusvaiheessa C käytettiin Superose 12
5 geeliä Sephadex G-75 geelin sijasta.

Näiden muutosten yksityiskohtaiset olosuhteet oli-
vat seuraavanlaiset:

CdCl₂-saostus

Seerumivapaa HepG2-solujen säädetty alusta (4 lit-
10 raa) sentrifugoitiin 2500 x g 30 minuuttia partikkeleista
muodostuvan roskan poistamiseksi. CdCl₂:ta (1,0 M) lisät-
tiin sitten niin, että loppukonsentraatioksi tuli 10 mM ja
seosta sekoitettiin 30 minuuttia. Saostuma, joka sisälsi
TFI-aktiivisuuden, kerättiin sentrifugoimalla (10000 x g
15 20 minuuttia) ja supernatantti kaadettiin pois. Nappi
liuotettiin 80 ml:aan 0,5 M EDTA, 100 KI yksikköä/ml apro-
toniini (Sigma)-liuokseen, pH 9,5, ja liukenematon mate-
riaali poistettiin sentrifugaatiolla (10000 x g 20 minuut-
tia).

20 Härän Faktori X:n puhdistus

Härän Faktori X puhdistettiin härän plasman barium-
sulfaattieluaatista (Sigma Chemical Co., St. Louis). 40
yksikköä (kukin 1 litrasta plasmaa) eluaattia liuotettiin
uudelleen 1,6 litraan H₂O:ta ja pH säädettiin 6,0:aan HCl:-
25 lla. Lisättiin kuivaa bentsamidiinia niin, että loppukon-
sentraatioksi tuli 1 mM ja seosta sentrifugoitiin 10000 x
g ja 4 °C:ssa liukenemattoman materiaalin poistamiseksi.
Sitten näyte laitettiin (100 ml/tunti) 5 x 95 cm:n kokoi-
seen DEAE-Sepharose pylvääseen, joka oli tasapainotettu
30 0,02 M natriumsitraatti, 1 mM bentsamidiini, 0,02 % NaN₃-
liuoksessa, pH 6,0, 4 °C:ssa. Kun pylvästä oli pesty 2 lit-
ralla aloituspuskuria, se eluotettiin 15 litran gradientil-
la, joka alkoi aloituspuskurista ja päättyi 0,8 M NaCl,
0,02 M natriumsitraatti, 1 mM bentsamidiini, 0,02 % NaN₃-
35 liuokseen, pH 6,0. Härän Faktori X_1 :tä ja X_2 :tä, jotka

eluoituivat proteiini C:n jälkeen, mutta ennen proteiini Z:aa, sisältävät fraktiot yhdistettiin, konsentroititiin noin 40 ml:aan (PM10, Amicon, Lexington, MA) ja dialysoitiin 0,1 M MOPS-puskuriin, pH 7,5. Saanto oli 68 mg puhdistettua Faktori X:ää. Faktori X_a tuotettiin aktiivoimalla Faktori X liukenemattomalla XCP:llä (Faktori X hyytymisproteiini Russell'in kyykkäärmeen myrkystä).

Härän Faktori X_a Affi-Gel affiniteettikromatografia

Näyte laimennettiin samalla tilavuudella 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 % Lubrol PX-liuosta ja laitettiin virtausnopeudella 4 ml/tunti 2 ml:n Sepharose 4 B agarosipylvääseen, joka oli kytketty sarjaan 3 ml:n kokoisen, 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % Lubrol PX-liuoksella tasapainoteun härän Faktori X_a-Affi-Gel pylvään kanssa. Pylväät pestiin 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % Lubrol-liuoksella (20 ml) ja sitten 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 2 % Lubrol PX-liuoksella (20 ml). Sitten ensimmäisenä ollut Sepharose 4 B pylväs poistettiin systeemistä ja härän Faktori X_a-Affi-Gel pylvästä pestiin lisää 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 2 % beta-oktylglukosidi-liuoksella (20 ml) ja eluointiin 0,5 M bentsamidiini, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 2 % beta-oktylglukosidi-liuoksella. TFI-kokeella määritetyt TFI:tä sisältävät fraktiot yhdistettiin (kuva 8, fraktiot 62-66) ja konsentroititiin noin 0,4 ml:aan käyttäen YM5 membraania (Amicon Corp., Danvers, Mass.). A₂₈₀ suuri määrä eluoiduissa fraktioissa johtuu bentsamidiinista.

Superose 12 geelisuodatus

Konsentroitunut näyte (noin 0,4 ml) laitettiin kahteen 25 ml:n 1 M NaSCN, 2 % beta-oktylglukosidi, 0,02 M MOPS-liuoksessa, pH 7,0, tasapainotettuun Superose 12 pylvääseen, jotka oli kytketty sarjaan. Pylväät eluointiin aloituspuskurilla virtausnopeudella 0,3 ml/minuutti. TFI-aktiivisuutta sisältävät fraktiot 27-31 tunnistettiin ja yhdistettiin (kuva 9).

TFI:n luonnehtiminen

Puhdistetun pelkistetyn TFI-materiaalin SDS-PAGE-natriumdodekyylisulfaattipolyakrylamidigeelielektroforeesi osoitti diffuusin rintaman, jonka näennäinen molekyylipaino oli 39000 daltonia, kun se värjättiin hopeanitraatilla. Geelipalojen eluutio osoitti, että funktionaalinen TFI-aktiivisuus kulki yhdessä proteiimirintaman kanssa (kuva 10).

Western-blot ja värjäys $^{125}\text{I-X}_2$:lla

Puhdistettu materiaali sitoutuu Faktori X_2 :han. Superose 12 kromatografiasta saaduille yhdistetyille TFI-fraktioille tehtiin SDS-PAGE ja siirrettiin elektroforeettisesti nitroselluloosalle. Seuraava nitroselluloosan inkubointi $^{125}\text{I-X}_2$:lla osoitti, että puhdistettu proteiini sitoutuu Faktori X_2 :han (kuva 11).

Ylläolevan puhdistetun TFI:n eristykseen johtaneen esimerkin 2 laboratoriotyötulosten lisäksi esitetään esimerkkeinä seuraavat yksityiskohtaiset piirrosten kuvaukset kuvista 8-11.

Kuvio 8. Tämä kuva esittää härän Faktori X_2 -Affi-Gel affiniteettikromatografian. Fraktiot 1-60 olivat tilavuudeltaan 4 ml ja 60-70 olivat 1 ml tilavuudeltaan. Absorbanssi (A_{280}) kuvataan merkillä ●--●, 1000-kertaisesti laimennettujen näytteiden TFI-aktiivisuus kuvataan merkillä o--o.

Kuvio 9. Tämä kuva esittää Superose 12 geelisuodatuksen. TFI-aktiivisuuden omaavat fraktiot 27-31 yhdistettiin ja säilytettiin 4 °C:ssa. Absorbanssi (A_{280}) kuvataan yhtenäisenä linjana --, 1000-kertaisesti laimennettujen näytteiden TFI-aktiivisuus kuvataan merkillä o--o.

Kuvio 10. Tämä kuva esittää puhdistetun, pelkistetyn TFI:n SDS-PAGE:n. Puhdistettu TFI (2 µg) ajettiin NaDodSO₄/PAGE:ssa 10 % 2-merkaptetaanolipelkistykseen jälkeen ja hopeavärjättiin. Molekyylipainomarkkerit näkyvät kilodaltoneina vasemmassa kaistassa. Oikeassa kaistassa

näkyä pelkistetyn TFI:n diffuusi rintama, jonka näennäinen molekyylipaino on 39000 daltonia.

5 Kuvio 11. Tämä kuva esittää pelkistymättömän, puhdistetun TFI:n SDS-PAGE:n ylempänä täplänä, jossa puhdistettu TFI (2 µg) ajettiin NaDodSO₄/PAGE:ssa ja hopeavärjättiin. Alempi ¹²⁵I-X₁ täplä osoittaa pelkistymättömän TFI:n (1 µg), joka on siirretty elektroforeettisesti nitroselloosalle, värjätty ¹²⁵I-X₁:lla ja jolle on suoritettu autoradiografia. Ylempi osa kuvasta osoittaa TFI-aktiivisuuden
10 uutetuista geelipaloista, jotka on saatu ajettaessa 1 µg TFI:tä SDS PAGE:ssa.

Esimerkki 3

TFI:n eristys useista solulähteistä, nimittäin Chang Liver-soluista, SK-HEP-1-soluista ja HepG2-soluista
15 suoritettiin immunoaffiniteettikromatografialla käyttäen immunogeeninä keinotekoista peptidiä, jolla on tässä aiemmin kuvatun kypsän TFI:n aminohapposekvenssi 3-25, seuraavasti:

Immunisointi

20 TFI-peptidi, joka sisältää kypsän TFI:n aminohapposekvenssiä 3-25 vastaavan sekvenssin, syntetisoitiin käyttäen Biosystem'in kiinteäfaasipeptidisynteesiä. TFI-peptidi (5 mg) konjugoitiin 10 mg:aan Keyhole lympet-kotilon hemosyaniinia glutaraldehydillä. Kaksi Uuden Seelannin
25 valkoista kania kumpikin immunisoitiin ihonalaisella injektioilla käyttäen homogenaattia, joka sisälsi 1 ml Freundin täydellistä adjuvanttia ja 1 ml konjugaattia (200 µg TFI-peptidiä). Kuukautta myöhemmin kummallekin kanille tehtiin uusi immunisaatio homogenaatilla, joka sisälsi 1
30 ml Freundin epätäydellistä adjuvanttia ja 1 ml konjugaattia (100 µg TFI-peptidiä). Antiseerumia kerättiin joka viikko siitä lähtien. Uusi injektio annettiin kuukausittain kunnes kaneista päästettiin veri pois 3 kuukauden kuluttua.

Anti-TFI-peptidi-Ig:n eristys

Synteettinen TFI-peptidi (3 mg) kiinnitettiin 0,8 g:aan CNBr-aktivoitua Sepharose[®] 4 B:tä käyttäen valmistajan julkaisemia ohjeita (Pharmacia). Spesifisen vasta-ai-
5 neen eristämiseksi yhdistetty antiseerumi (15 ml) sekoitettiin saman tilavuuden kanssa liuosta (PNBT), joka sisälsi PBS:ää, 0,4 M NaCl:ia, 0,1 M bentsamidiinia ja 1 % Triton[®] X-100:aa ja suoritettiin kromatografia TFI-peptidi Sepharose 4 B pylväässä huoneenlämmössä. Pylväs pestiin 30
10 ml:lla PNBT-liuosta ja sitten samalla liuoksella ilman Triton X-100:aa. Kiinnittynyt vasta-aine eluoiitiin 0,1 M glysiini/HCl-liuoksella, pH 2,2, neutraloitiin välittömästi lisäämällä 1/10 osa tilavuutta 1 M Tris-OH:ta ja dialysoitiin voimakkaasti suolaliuosta vastaan. 15 ml:sta antiseerumia eristettiin noin 6,5 mg anti-TFI-peptidi Ig:ia.
15

Soluviljely

Chang Liver-, SK hepatooma- ja HepG2-soluja kasvatettiin konfluenteiksi Dulbecco'n modifioidussa Eagle'n alustassa (DMEM), johon oli lisätty 10 % härän sikiön seerumia, 50 yksikköä/ml penisilliiniä ja 50 µg/ml streptomysiiniä 175 cm² pulloissa. Viisi pulloa kutakin solulinjaa trypsinoitiin ja käytettiin yhden 10-kammioisen solukasvattimen (Nunc) nuorennukseen. Kun oli saavutettu konfluenssi (noin 1 viikko), solut pestiin PBS:llä kaksi kertaa ja inkuboitiin seerumivapaassa alustassa. Seerumivapaa alusta koostui DMEM:stä, johon oli lisätty 0,5 % laktalbumiinihydrolysaattia, 50 yksikköä/ml aprotiniinia, ennakoon valmistettua ITS-seosta (insuliini-transferrini-seleeni, Collaborative Research'in tuote), 20 ng/ml maksasolun kasvutekijää (glysylyli-histidyyli-lysiini) ja 100
25 ng/ml forboli-12-myristaatti-13-asettaattia. Seerumivapaa alusta vaihdettiin tuoreeseen alustaan joka 3:s päivä. Soluja voidaan ylläpitää näissä olosuhteissa >2 kuukautta. Yhdistetyt säädetyt alustat tehtiin 0,02 %:ksi NaN₃:n suhteen ja 0,01 %:ksi Triton X-100:n suhteen ja säilytettiin
30 4 °C:ssa. Jotkin alustat konsentroitiin 20-100-kertaisesti

ultrasuodatuksella käyttäen Amicon'in YM30 spiraalimembraanisysteemiä.

TFI:n immunoaffiniteettipuhdistus

Eristetty anti-TFI-peptidi-Ig (20 mg) kiinnitettiin
5 2 g:aan CNBr-aktivoitua Sepharose 4 B:tä valmistajan julkaisemien ohjeiden mukaisesti. Geelin tilavuus oli 7 ml. TFI:n eristämiseksi Chang Liver-, SK hepatooma- tai HepG2-solujen säädetylle alustalle (konsentroimattomalle tai konsentroidulle) suoritettiin kromatografia anti-TFI-peptidi-Ig Sepharose 4 B pylvässä nopeudella 2 ml/minuutti
10 kylmähuoneessa kunnes oli havaittavissa merkittävää TFI-aktiivisuutta läpivirranneessa nesteessä. Pylväs pestiin sitten 70 ml:lla PNBT-liuosta ja 70 ml:lla samaa liuosta ilman Triton X-100. Kiinnittynyt TFI eluoiitiin 0,1 M glysiini/HCl-liuoksella, pH 2,2 ja konsentroidiin noin 0,6
15 ml:aan vakuumidialyysillä 0,1 M glysiini/HCl-liuosta, pH 2,2, vastaan.

Tulokset

Käyttäen immunoaffiniteettikromatografiaa anti-TFI-peptidi-Ig Sepharose 4 B pylvässä TFI eristettiin useista
20 maksasoluista johdetuista solulinjoista, Chang Liver-, SK hepatooma- ja HepG2-soluista. Kuva 12A esittää anti-TFI-peptidi-Ig Sepharose pylvästä eluoitujen proteiinien SDS-PAGE:n. Eri preparaateissa voidaan havaita hiukan erilaiset proteiiniprofiilit. Joissain preparaateissa 40 kD:n
25 proteiini on ainoa yleinen proteiini (kaistat 4 ja 5); toisissa on useita proteiinirintamia ja 38 kD:n proteiinin rintama on hallitseva 40 kD:n proteiinin sijasta. Jotta saataisiin selville, mitkä proteiinit ovat TFI:n sukulaisia, suoritettiin $^{125}\text{I-X}_a$ sitoutumiskoe. Eristetyt TFI-näytteet ajettiin elektroforeesissa 12 % SDS-polyakrylamidi-
30 geelissä ja proteiinit siirrettiin sitten elektroforeettisesti nitroselluloosapaperille ja seulottiin $^{125}\text{I-X}_a$ sitoutumisaktiiviteetin suhteen. Havaittiin, että kolme yleisintä rintamaa, joiden näennäiset molekyylipainot olivat
35 40, 38 ja 25 kD, omasivat $^{125}\text{I-X}_a$ sitomisaktiivisuuden, kun

taas muut rintamat eivät omanneet (kuva 12B). SK hepatooma-solujen 38 kD:n rintaman sekvenssianalyysi osoittaa, että se omaa saman aminopään sekvenssin kuin 40 kD:n TFI, joka oli eristetty HepG2-soluista ylläolevassa esimerkissä

5 1. Perustuen immunoaffiniteettiin, aminohapposekvensointiin ja $^{125}\text{I-X}_a$ sitoutumiskokeisiin vaikuttaa siltä, että 40, 38 ja 25 kD:n inhibiittorit voivat olla peräisin samasta molekyylistä.

TFI:n eristykseen useista solulinjoista immunoaffiniteettikromatografialla johtaneen ylläolevan laboratoriotyön tulosten lisäksi esitetään esimerkkeinä seuraavat yksityiskohtaiset piirrosten kuvaukset kuvista 12(A) ja 12(B).

Kuvio 12. Tämä kuva esittää immunoaffiniteetillä eristetyt TFI:n SDS-PAGE:n ja $^{125}\text{I-X}_a$ sitomisaktiivisuuden seulonnan. (A) SDS-PAGE. Elektroforeesi suoritettiin 12 % polyakrylamidigeelissä. Kaista 1, molekyylipainomarkkerit; kaista 2, Chang Liver TFI; kaista 3, SK hepatooma TFI (preparaatti 1); kaista 4, SK hepatooma TFI (preparaatti 2); kaista 5, HepG2 TFI (preparaatti 1); kaista 6, HepG2 (preparaatti 2). (B) $^{125}\text{I-X}_a$ sitomisaktiivisuuden seulonta. Näytteet ajettiin 12 % polyakrylamidigeelielektroforeesissa. Proteiinit siirrettiin elektroforeettisesti nitroselluloosapaperille käyttäen Bio-Rad Trans-Blot[®]-laitetta ja -menetelmää. Siirron jälkeen nitroselluloosapaperia ensin heiluteltiin varovaisesti PBB-liuoksessa (PBS, joka sisältää 5 mg/ml BSA:ta ja 2,5 mg/ml härän gammaglobuliinia) ja sitten PBB-liuoksessa, joka sisälsi 400 ng/ml $^{125}\text{I-X}_a$:ta, kumpikin ravistelu suoritettiin huoneenlämmössä 1 tunti.

15 20 25 30

Sitten nitroselluloosapaperi kuivattiin ja suoritettiin autoradiografia 3 vuorokautta käyttäen Kodak XAR-5 filmiä. Kaista 1, Chang Liver TFI; kaista 2, SK hepatooma TFI (preparaatti 1); kaista 3, SK hepatooma TFI (preparaatti 2); ja kaista 4, HepG2 TFI (preparaatti 2).

Useat muut esimerkit ovat ilmeisiä alan tuntevalle henkilölle esillä olevan hakemuksen luettuaan, niiden esimerkkien kuitenkin poikkeamatta esillä olevan keksinnön luonteesta ja piiristä.

Patenttivaatimus

Menetelmä kudوسفакторin inhibiittorin (TFI) eristämiseksi, t u n n e t t u siitä, että SK-HEP-1-solujen tai Chang-maksasolujen säädetty alusta saatetaan immunoaffiniteettipuhdistukseen, jossa vasta-aineena käytetään anti-TFI-peptidi-immunoglobuliinia, joka on saatu käyttämällä immunogeeninä TFI-peptidiä, jolla on aminohapposekvenssi:

10 Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-His-Thr-Ile-Ile-Thr-Asp-Thr-
 Glu-Leu-Pro-Pro-Leu-Lys-Leu-Met-His-Ser-Phe

ja vasta-aineeseen sitoutunut kudوسفакторin inhibiittori otetaan talteen.

15

Patentkrav

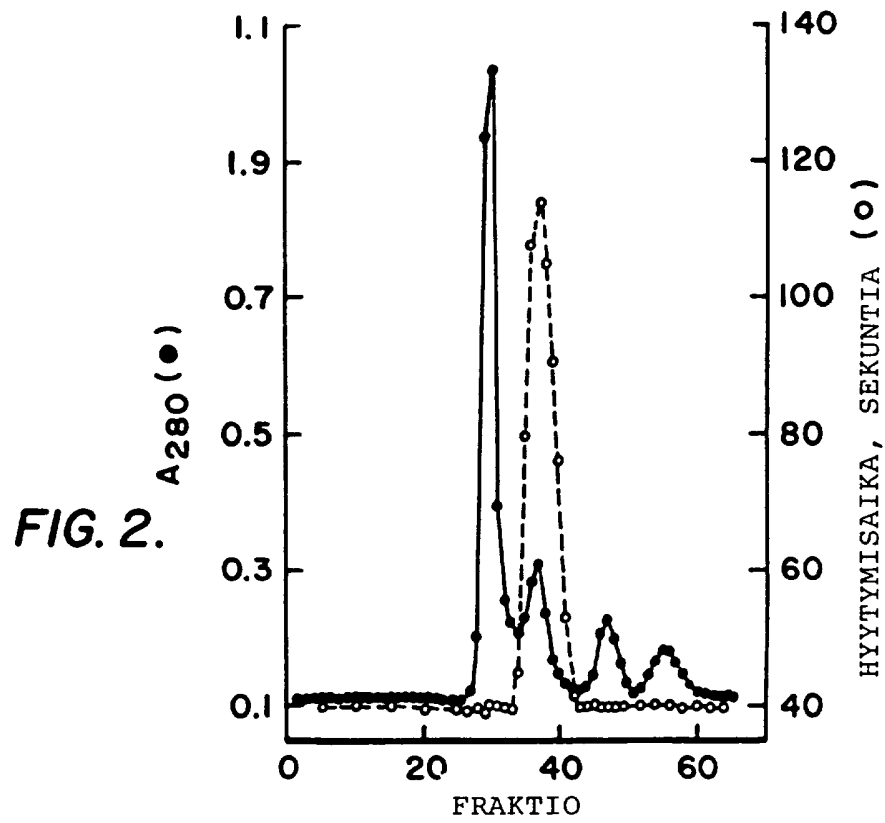
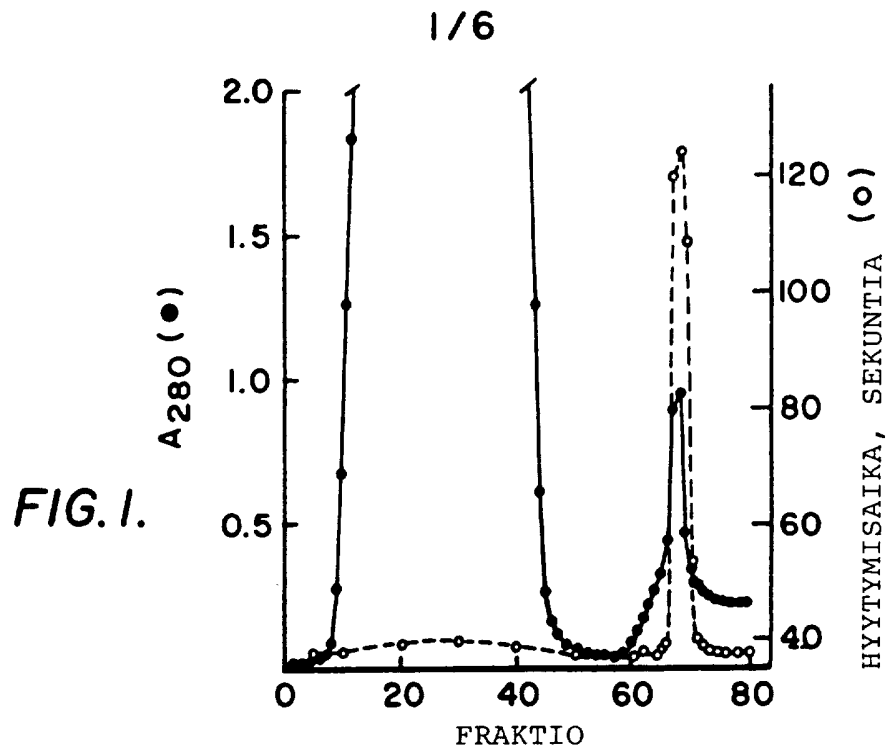
20 Förfarande för isolering av en vävnadsfaktorinhibitor (TFI), k ä n n e t e c k n a t därav, att ett konditionerat medium från SK-HEP-1-celler eller Chang-leverceller underställs immunoaffinitetsrening, där man som antikropp använder anti-TFI-peptid-immunoglobulin, som erhållits genom att som immunogen använda en TFI-peptid med aminosyrasekvensen

25

 Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-His-Thr-Ile-Ile-Thr-Asp-Thr-
 Glu-Leu-Pro-Pro-Leu-Lys-Leu-Met-His-Ser-Phe

och den till antikroppen bundna vävnadsfaktorinhibitorn tas tillvara.

30



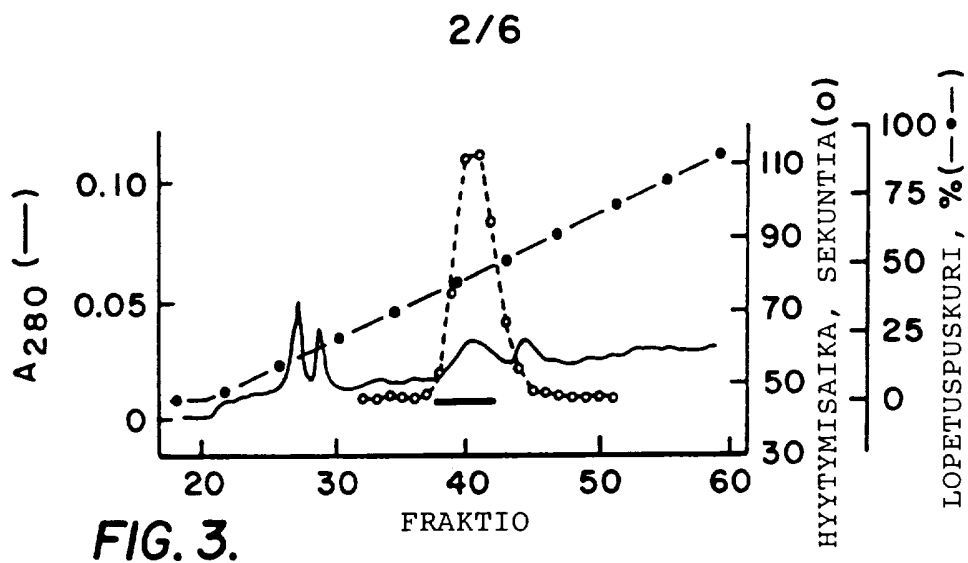


FIG. 3.

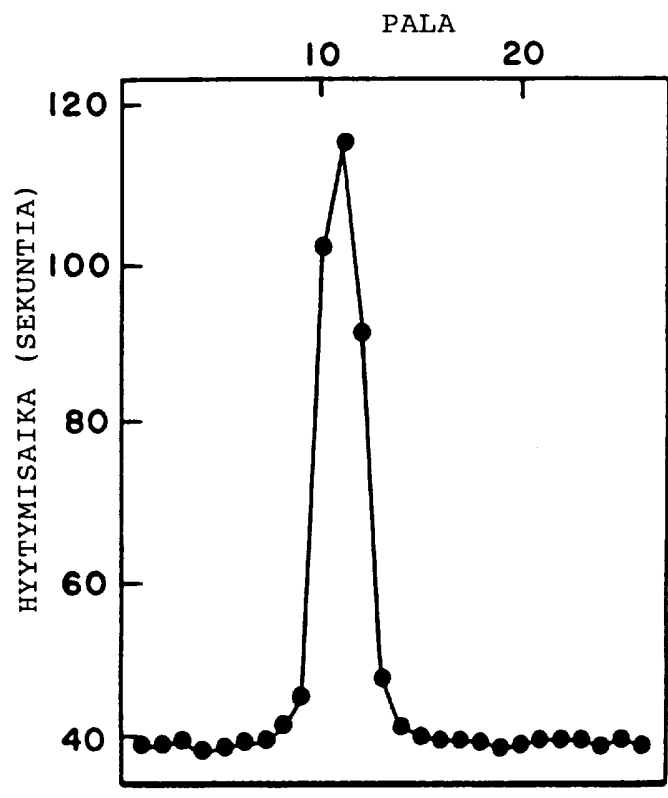
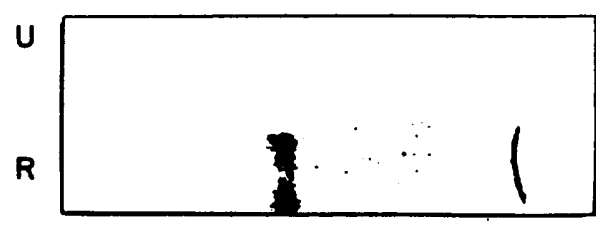


FIG. 4.



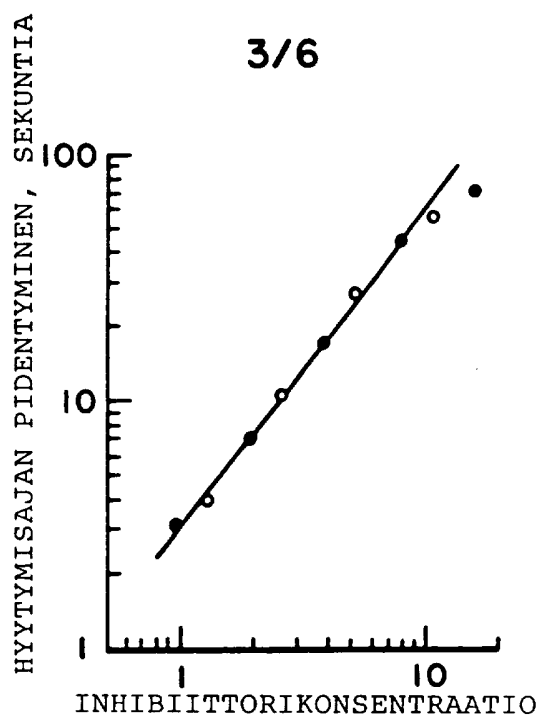


FIG. 5.

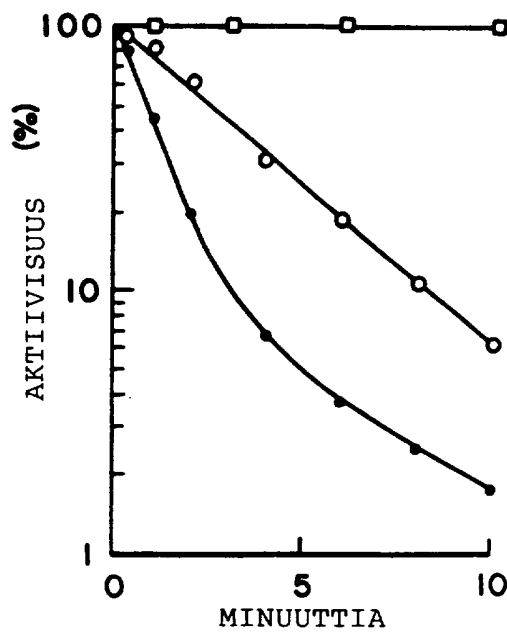


FIG. 6.

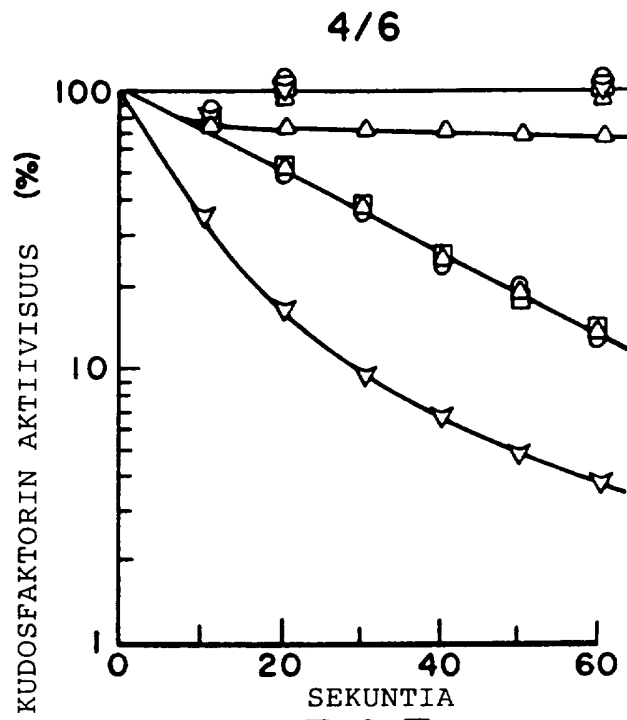


FIG. 7.

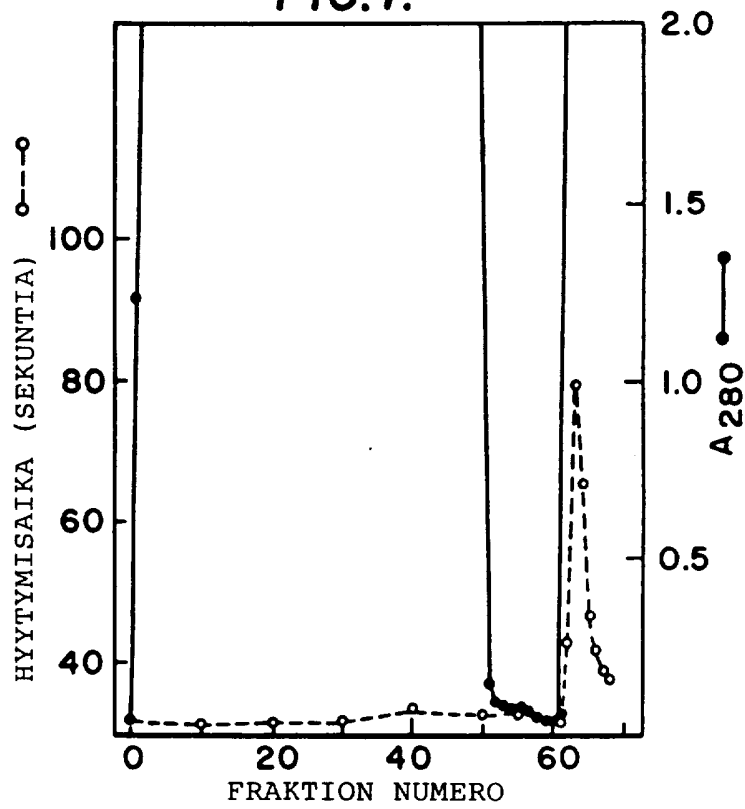
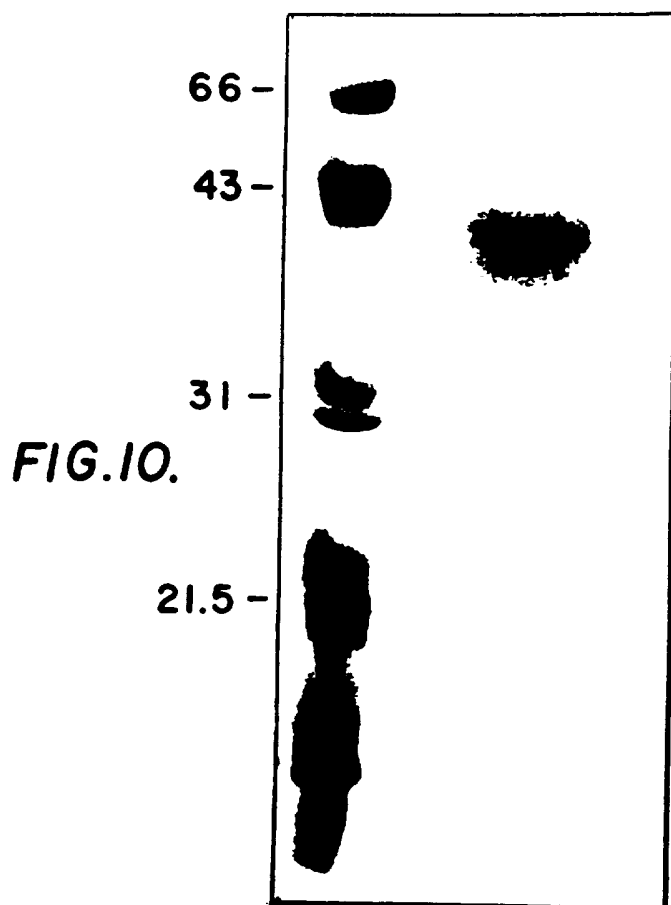
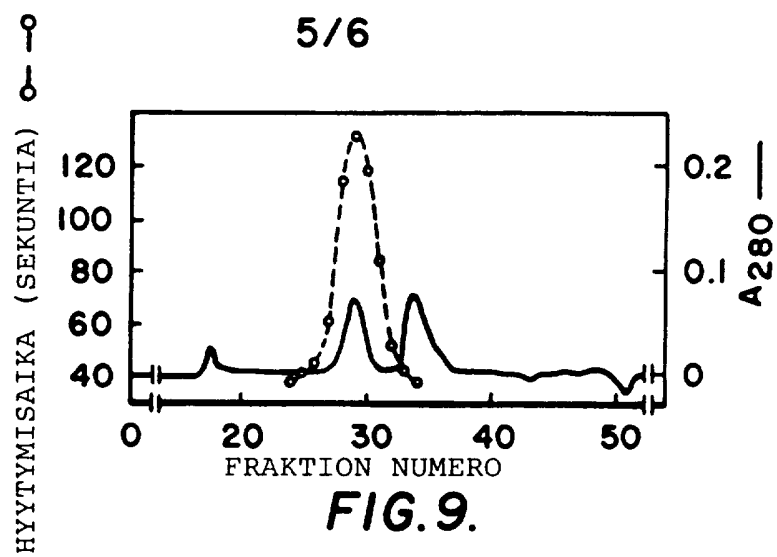


FIG. 8.



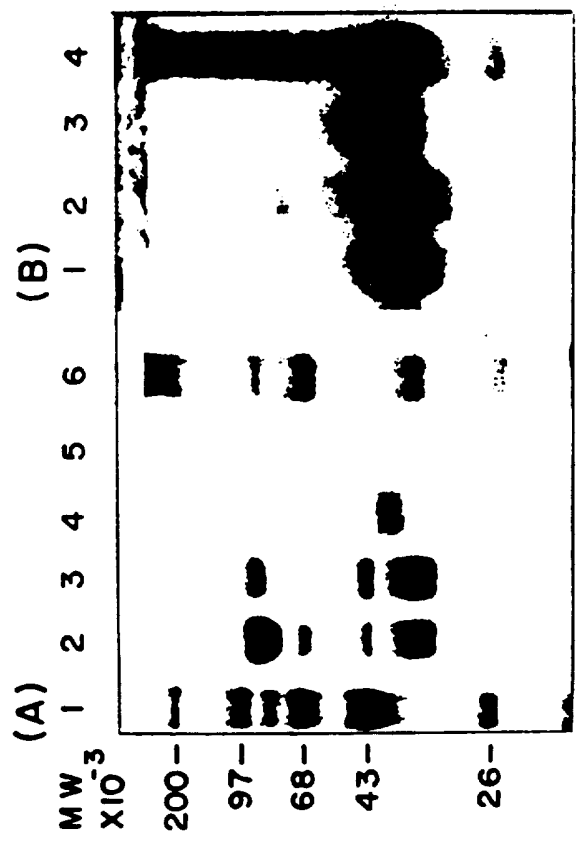


FIG. 12.

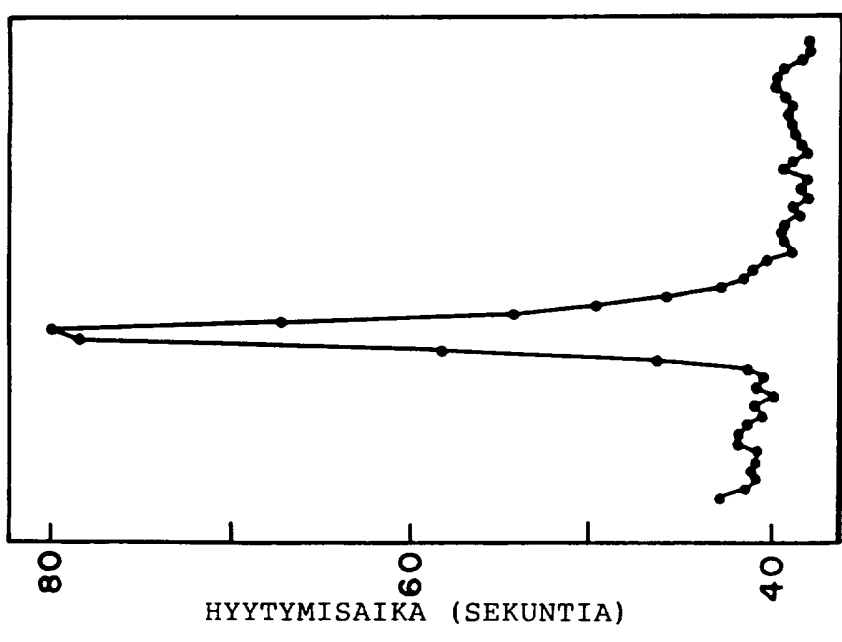
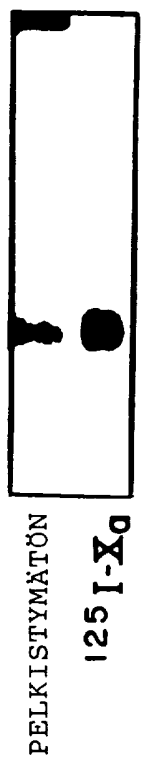


FIG. 11.



PELKISTYMATÖN
125 I-X α