



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU  
UTLAGGNINGSSKRIFT

81365

C (11) 81365  
1984.05.09

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 07K 7/10, 7/06, 7/08

|                                                                                             |          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| (21) Patentihakemus - Patentansökning                                                       | 841649   |
| (22) Hakemispäivä - Ansökningsdag                                                           | 26.04.84 |
| (24) Alkupäivä - Löpdag                                                                     | 26.04.84 |
| (41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig                                                   | 10.11.84 |
| (44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -<br>Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad | 29.06.90 |
| (32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet                                                        |          |

09.05.83 US 492751 P

12.04.84 US 598136 P

(71) Hakija - Sökande

1. Todaro, George Joseph, 1940 15th Avenue East Seattle, Wash., USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Todaro, George Joseph, 1940 15th Avenue East Seattle, Wash., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä biologisesti aktiivisten polypeptidien valmistamiseksi**  
**Förfarande för framställning av biologiskt aktiva polypeptider**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 80 (1983) p. 4684-4688

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on uusia biologisesti aktiivisia polypeptidejä, mukaanlukien uusi luokka muuntokasvutekijä (TGF)polypeptidejä, joilla on solukasvua edistäviä ominaisuuksia, sekä myös menetelmä TGF-polypeptidien eristämiseksi sekä ihmis- että hiiri-solulinjoista homogeenisessä muodossa. Esitetään myös antigeenisia oligopeptidejä, jotka on johdettu TGF-polypeptideistä, sekä niistä syntyneitä vasta-aineita, joilla on käyttöä pahanlaatuisten havaitsemisessa ja hoidossa, sekä oligopeptidejä, joilla on kyky sitoutua solukasvutekijä-reseptoreiden kanssa ja siten häiritä tiettyjen solulinjojen muuntumista syöpäiseen tilaan. Kuvaataan myös yhdistelmiä ja menetelmiä, jotka perustuvat esitettyihin peptideihin, syövän ja muiden proliferatiivisten sairauksien havaitsemiseksi ja hoitamiseksi sekä solukasvuun liittyvää hoitoa, esim. haavan parantamiseksi ja haavauman hoitamiseksi.

Uppfinningen avser nya biologiskt aktiva polypeptider inklusive en ny klass av omvandlingsväxtfaktor (TGF) polypeptider som uppvisar cellväxt befrämjande egenskaper och ett förfarande för isolering av TGF-polypeptiderna från både människo- och muscellinjer i homogen form. Det framförs även antigena oligopeptider som härletts från TGF-polypeptiderna och antikroppar som uppstått därifrån och som har användning vid upptäckt och behandling av maligniteter och oligopeptider som är i stånd att bindas med cellväxtfaktor-reseptorer och så hindra omvandlingen av vissa cellinjer till ett Kräftartat tillstånd. Det beskrivs även kompositioner och metoder på basis av de framförda peptiderna för upptäckt och behandling av cancer och andra proliferativa sjukdomar och för cellväxt åtföljande behandling, t.ex. botning av sår och sårterapi.

Menetelmä biologisesti aktiivisten polypeptidien valmistamiseksi

5       Keksintö koskee menetelmää biologisesti aktiivisten polypeptidien ja näistä polypeptideistä johdettujen antigeenisten oligopeptidien valmistamiseksi luonnossa esiintyvistä tai synteettisistä lähteistä. Näillä peptideillä on yleinen polypeptidirakenne, joka määrittelee proteiineja, joilla on solukasvua edistävä aktiivisuus, ja ne  
10       ovat uusia muuntokasvutekijä (TGF) -polypeptidejä, joilla on ominaisuus palautuvasti antaa muunnettu fenotyyppi normaalisoluille in vitro ja jotka siten näyttävät olevan pahanlaatuisen fenotyypin välittömiä efektoreita, tai erityisesti TGF-polypeptideistä johdettuja antigeenisia oligopeptidejä. Nämä polypeptidit voivat myös olla oligopeptidejä, joilla on kyky sitoutua solun kasvutekijäreseptoreihin ja siten voimakkaasti häiritä tiettyjen solulinjojen muuttumista syöpätilaan.

      Keksinnön eräänä toteutusmuotona on erityisesti menetelmä TGF-polypeptidien valmistamiseksi eristämällä ne  
20       homogeenisessa muodossa sekä muunnetuista ihmisen että hiiren solulinjoista ja kehon nesteistä.

      Keksinnön mukaisesti valmistettuja polypeptidejä voidaan käyttää syövän ja muiden proliferatiivisten tautien havaitsemiseen ja hoitoon, solukasvuun liittyvään  
25       hoitoon, esimerkiksi haavan parantamiseen ja haavauman hoitoon, sekä luukatoon liittyvien sairauksien, kuten osteoporoosin ja hyperkalsemian hoitoon ja toteamiseen.

      Joukko polypeptidihormoni- ja hormoninkaltaisia kasvutekijöitä on löydetty kudospöytästä ja niiden yhteys  
30       normaalin solukasvun tai mitoosin säätelyyn on vahvistettu. Nämä mitogeeniset polypeptidikasvutekijät käsittävät insuliinin, insuliinin kaltaiset kasvutekijät, verihiutaleperäisen kasvutekijän, hermokasvutekijän, fibroblastikasvutekijän ja orvaskesikasvutekijän (EGF). Ainakin joil-  
35

lakin näistä tunnetuista kasvutekijöistä on vaikutus muunnettujen solujen kasvuun, mutta in vitro -testien perusteella näyttää siltä, että muunnetut solut tarvitsevat vähemmän näitä tunnettuja kasvutekijöitä optimaalista kasvua ja monistumista varten kuin normaalit solut. Erityisesti on osoitettu soluviljelykokeilla, että ulkosyntyisten kasvutekijöiden, kuten insuliinin ja EGF:n, lisääminen voi saada normaalit solut jäljittelemään tiettyjä soluominaisuuksien muutoksia, jotka ovat analogisia muuntamisen kanssa. Ne eivät kuitenkaan pysty tuottamaan kaikkia muutoksia, jotka liittyvät muunnettuun fenotyyppiin, ks. esim. Sporn et al., The New Eng. J. of Med. 15 (1981) 878 - 880.

Polypeptidikasvutekijöiden uusia tyyppejä, jotka on nimetty muuntokasvutekijöiksi eli TGF:iksi, on äskettäin löydetty tietyistä ihmis- ja eläinsyöpä- ja sarkoomasoluista, joilla on enemmän ominaisuuksia, jotka ilmeisesti ovat olennaisia fenotyyppimuunnoksille (Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 3494 - 3498 ja Todaro et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5258 - 5262). TGF-polypeptideille luokkana ovat ominaisia muutokset, joita ne aiheuttavat, kun niitä käytetään muuntamattomiin normaaleihin indikaattorisoluihin, jotka kasvavat viljelmässä. Nämä muutokset käsittävät a) solukasvun tiheydestä riippuvan kasvun estymisen puutteen yksisolukerrosviljelyssä, b) solujen liikakasvun yksisolukerrosviljelyssä, c) muutoksen solun muodossa, mistä on tuloksena, että indikaattorisolut omaksuvat kasvainfenotyypin, ja d) kiinnitysriippumattomuuden saavuttamisen, mistä on tuloksena kyky kasvaa pehmytagarissa. Solujen kiinnittymisestä riippumattoman kasvun ominaisuus viljelyssä on erityisen voimakkaasti vastaavuussuhteessa neoplastisen kasvun kanssa in vivo. Ainakin tietyt TGF-polypeptidit ovat jonkin verran samanlaisia kuin EGF siinä, että ne sekä ovat kuunuut- ta ja happoa kestäviä, pelkistimille ja proteaaseille

herkkiä peptidejä että ne näyttävät spesifisesti olevan vuorovaikutuksessa solumembraanin EGF-reseptorien kanssa ja tuottavan biologisia vaikutuksia niiden kautta, jolloin TGF kilpailee EGF:n kanssa sitoutumisesta solun EGF-reseptoriin. TGF on kuitenkin erotettavissa EGF:sta useissa tärkeissä suhteissa. Erityisesti EGF ei indusoi kiinnittymisestä riippumatonta solujen kasvua viljelyssä, eivätkä EGF:ää vastaan muodostetut vasta-aineet havaitse TGF:ää radioimmuunianalyysi- eikä immuunisaostuskokeissa. Lisäksi EGF:llä on ainoastaan vähäinen vaikutus viljeltyjen solujen fenotyyppiin, kun taas TGF tuottaa korostuneemman fenotyypin muutoksen viljellyissä soluissa ja antaa niille kyvyn käyttäytyä kuten muunnetut solut. Mikä mielenkiintoisinta, TGF:n aiheuttama muuntuminen ei ole pysyvä vaan palautuva TGF:n poissaollessa, eikä ole olemassa mitään todistusta siitä, että TGF toimii itse täydellisenä syöpää synnyttävänä aineena (Todaro et al., J. of Supramolecular Structure and Cell Biochem. 15 (1981) 287 - 301).

Siten TGF-polypeptidit muodostavat proteiinien ainitlaatuisen luokan, joka voidaan erottaa muista kasvutekijöistä, kuten EGF:stä, sekä biologisten ominaisuuksien että kemiallisen rakenteen kannalta. Näillä TGF:illä on vuorostaan joukko erilaisia ominaisuuksia, jotka ovat arvokkaita tai mahdollisesti arvokkaita terveystieteiden alueella, kuten voimakkaat mutta palautuvat solukasvu- tai mitogeeniset ominaisuudet, joita voidaan käyttää solun korjaamisessa, kuten esimerkiksi haavan parantamisessa tai haavauman hoidossa. Lisäksi TGF-polypeptidin tuottaminen tai lisääntynyt tuottaminen on ominaista, ellei olennaista, tiettyjen solulinjojen morfologiselle muuntamiselle sekä ihmis- että hiirikudoksessa ja/tai -nesteissä; siten TGF-polypeptidit tai niiden antigeeniset fragmentit ovat arvokkaita normaalisolujen erottamisessa kasvainsoluista ja niitä vastaan syntyneillä vasta-aineilla on käyttöä pahanlaatuisuuksien diagnoosissa. Lisäksi oivallus, että

tietyt TGF-polypeptidit ovat spesifisesti vuorovaikutuksessa solumembraanin EGF-reseptoreiden kanssa ja tuottavat biologiset vaikutuksensa niiden kautta, antaa mahdollisuuden, kun TGF-polypeptidin perusrakenne on määritetty, saattaa rakenne vastaavuussuhteeseen EGF:n rakenteen kanssa oligopeptidien kehittämiseksi, joilla on kemialliset ominaisuudet, jotka sallivat sitoutumisen EGF-reseptoreihin ilman solun samanaikaista fenotyypin muuntumista. Oligopeptideillä, joilla on tämä ominainen EGF-reseptoriin sitoutumiskyky, on käyttöä hoidettaessa pahanlaatuisuuksia, koska oligopeptidi häiritsee tai kilpailee TGF:n kanssa käytettävissä olevista reseptorikohdista ja siten keskeyttää solun muunnettujen ominaisuuksien ilmentämisen.

Tämän keksinnön mukaisesti on kehitetty menetelmä TGF-polypeptidien valmistamiseksi riittäviä määriä ja riittävän puhtaina sallimaan täydellisen rakenteen määrittämisen, ja tuloksena tästä määrittämisestä ja muista havainnoista, mukaan lukien olennaisen homologian löytäminen ihmisen ja hiiren TGF:ien välillä, on löydetty peruspeptidirakenne, jolla on laaja käyttö solumitoosin ja solukasvuun liittyvällä alueella. Lisäksi menetelmällä saadaan homogeenisiä TGF-polypeptidejä, joilla on käyttöä sekä solukasvun alueella että syövän ja muiden proliferatiivisten sairauksien toteamisessa. TGF-polypeptidejä ja -oligopeptidejä ja niitä vastaan muodostettuja vasta-aineita voidaan käyttää luukatoon liittyvien sairauksien, kuten osteoporoosin, hyperkalsemian ja luuresorption, toteamiseen ja hoitoon. Edelleen peruspeptidirakenteesta ja määritetyistä TGF-polypeptidirakenteista saadaan antigeenisia oligopeptidejä ja oligopeptidejä, joilla on kyky sitoutua solukasvutekijäreseptoreihin.

Marquardt ja Todaro, J. of Bio. Chem. 257(9) (1982) 5220 - 5225 (julkaistu 10.5.1982), kuvaavat pienimolekyyllipainoisen ihmis-TGF:n eristämisen seerumittomasta väliaineesta, jota oli käsitelty ihmisen metastaatilla me-

lanoomakasvainlinjalla, käyttäen sarjaa menetelmävaiheita, jotka käsittävät uuttamisen 1 M etikkahappoon ja peräkkäisen puhdistuksen käänteisfaasikorkeapainenestekromatografialla eluoiden ensin asetonitriililiuottimella ja sen jälkeen 1-propanolilla, jolloin saadaan puhdistettu TGF, jolla on luonteenomainen TGF-biologinen aktiivisuus, esimerkiksi kiinnittymisestä riippumattoman solukasvun induointi. Twardzik et al., Science 216 (1982) 894 - 897

(julkaistu 21.5. 1982), esittävät saman puhdistusmetodologian käytön TGF:n puhdistamiseksi viruksella muunnetusta rottasolusta. Myös puhdistettujen aineiden biologinen aktiivisuus soluviljelyssä osoitetaan. Pike et al., J. of Bio. Chem. 257 (24) (1982) 14 628 - 14 631 (julkaistu 25.12.1982), esittävät, että sekä osittain puhdistetulla rotan että ihmisen TGF:llä on kyky aktivoida proteiinikinaasia ihmisen kasvainsolumembraaneissa ja siten stimuloida synteettisen tyrosiinia sisältävän peptidin fosforylointia. Ainoat muut tähän asti selostetut molekyylit, joilla on tämä aktiivisuus, ovat EGF, insuliini ja verihiutaleperäinen kasvutekijä, joista kaikilla uskotaan olevan tärkeitä fysiologisia funktioita ihmisessä ja eläimessä. Muita kiinnostavia kirjallisuusviitteitä on esitetty edellä mainituissa artikkeleissa.

Nyt on havaittu, että tietty perusproteiinirakenne määrittelee uuden luokan biologisesti aktiivisia molekyylejä. Tämän runkopolypeptidin, joka antaa biologisen aktiivisuuden erityisesti solukasvun edistämisen alueella, löytyminen perustuu havaintoon, että on olemassa selvä vastaavuussuhde tiettyjen, useita disulfidisidoksia sisältävien polypeptidien, TGF:t mukaan lukien, kolmiulotteisen rakenteen ja polypeptidistä aiheutuvan biologisen aktiivisuuden välillä.

Siten tämä keksintö koskee menetelmää biologisesti aktiivisten polypeptidien valmistamiseksi, joilla on kaava

10 jossa R on Asp tai Lys, R' on Phe tai Tyr, R'' on Ser tai Phe, R''' on Phe tai Tyr, R<sup>1</sup> on Asp tai Glu ja R<sup>2</sup> on Ala tai Val, tai näiden polypeptidien aminohapposekvenssin 1 - 13, 34 - 43, 34 - 50 tai 39 - 50 käsittävien oligopeptidifragmenttien valmistamiseksi, jossa menetelmässä:

b) muodostetaan synteettisesti kaksisäikeinen DNA-sekvenssi, joka koodaa polypeptidirakenteen aminohapposekvenssiä, kaksisäikeinen DNA liitetään kloonaukseen tai -vektorin sopivaan kohtaan yhdistelmä-DNA-molekyylin muodostamiseksi ja transformoidaan sopiva isäntä mainitulla yhdistelmä-DNA-molekyylillä polypeptidin ilmentymisen aikaansaamiseksi. tai

25 c) eristetään homogeeninen muuntokasvutekijä-  
polypeptidi vesipitoisesta väliaineesta, joka sisältää  
tämän muuntokasvutekijäpolypeptidin epäpuhtaassa muodossa,  
menetelmällä, joka käsittää seuraavat vaiheet:

(1) dialysoidaan vesipitoinen väliaine, joka sisältää muuntokasvutekijän epäpuhtaassa muodossa, vesipitoista etikkahappoa vastaan antamaan liuotinfraasi, joka sisältää muuntokasvutekijäpolypeptidiä ja joka faasi väkevöidään ja valinnaisesti selkeytetään,

35 (2) muodostetaan vaiheen 1) väkevöity liuotinfraasi uudelleen vesipitoisella etikkahapolla ja saatetaan uudelleenmuodostettu liuos geelisuodatuskromatografiaan viemällä uudelleenmuodostettua liuosta geelisuodatuskromatogra-

fiapylvääseen, jota on tasapainotettu vesipitoisella etikkahapolla, ja eluoidaan vesipitoisella etikkahapolla eluaatin valittujen fraktioiden saamiseksi, jotka sisältävät muuntokasvutekijäpolypeptidiä puhtaampana, ja valitut fraktiot yhdistetään ja väkevöidään, jolloin saadaan osittain puhdistettu, muuntokasvutekijäpolypeptidiä sisältävä tuote,

(3) saatetaan vaiheen (2) osittain puhdistettu, muuntokasvutekijäpolypeptidiä sisältävä tuote peräkkäiseen käänteisfaasikorkeapainenestekromatografiaan viemällä tuote, uudelleenmuodostamisen jälkeen vesipitoiseen trifluorietikkahappoon, yhden tai useamman hiilivetyssidottujen piihappomatriisipylväiden läpi, jotka on tasapainotettu vesipitoisella trifluorietikkahapolla, korkeapainenestekromatografian olosuhteissa, jolloin pylvään alkueluointi suoritetaan käyttäen lineaarista asetonitriiligradianttia vesipitoisessa trifluorietikkahapossa ja sen jälkeen pylväseluointi, joka suoritetaan ensimmäisestä korkeapainenestekromatografiavaiheesta saaduille, yhdistetyille, muuntokasvutekijäpolypeptidiä sisältäville fraktioille, toteutetaan käyttäen lineaarista l-propanoligradianttia vesipitoisessa etikkahapossa, jolloin l-propanolin gradienttia nostetaan riittävän pieninä l-propanolin väkevyyksinä antamaan muuntokasvutekijäpolypeptidi yhteinä ainoana selvänä huippuna homogeenisenä polypeptidinä.

Keksinnön edullisen toteutusmuodon mukaisesti valmistetaan edellä olevan kaavan mukaisia polypeptidejä, joissa R on Asp, R' on Phe, R'' on Tyr, R<sup>1</sup> on Asp ja R<sup>2</sup> on Ala.

Peptidisekvenssi, joka luonnehtii esitetyn kaavan mukaista perusproteiinirakennetta, sisältää kuusi kysteiinitähdettä sijoittuneina ratkaiseviin asemiin polypeptidirungossa. Arvellaan, että kysteiinitähteiden sijainti sallii polypeptidin laskostua erityisellä tavalla pariutuneiden kysteiinien välille muodostuneiden disulfidisiltojen

johdosta ja siten tuottaa kolmiulotteisen rakenteen, joka edistää osaltaan saadun proteiinin biologista aktiivisuutta. On olemassa jonkin verran todistusaineistoa, joka viittaa erityiseen disulfidi-siltajärjestykseen, jossa  
5 (numeroimalla edellä olevassa kaavassa Cys-tähteet 1:stä 6:een vasemmalta oikealle) Cys-1 on sitoutunut Cys-3:een, Cys-2 on sitoutunut Cys-4:ään ja Cys-5 on sitoutunut Cys-6:een disulfididisidoksin perusproteiinirakenteen biologisesti aktiivisissa muodoissa.

10 Tämä uusi polypeptidiluokka on johdettu havainnosta, että tietyt TGF:t, jotka on saatu erilaisista nisäkkäslajeista (sekä hiiristä että ihmisistä), ovat olennaisesti homologisia peptidisekvenssin aminohapporakenteen suhteen (yli 90 %:n sekvensseistä ollessa samoja) ja niillä on  
15 myös pääasiallisesti samat biologiset ominaisuudet. Eri-tyisesti edellä olevan kaavan mukaiset polypeptidit aiheuttavat solukasvun tiheydestä riippuvan estymisen puutetta yksikerrosviljelyssä, liikakasvua yksikerrosviljelyssä, luonteenomaisen muutoksen solun morfologiassa ja  
20 kiinnittymisestä riippumattoman kasvun saamisen, kun niitä käytetään muuntamattomiin, normaaleihin indikaattorisoluihin, jotka on kasvatettu viljelmässä. Sen lisäksi että ne ovat äärimmäisen voimakkaita solukasvun edistäjiä ja solumuunnoksen aiheuttajia, edellä esitetyn kaavan mukaiset  
25 TGF-polypeptidit kilpailevat EGF:n kanssa sitoutumisesta solun EGF-reseptoriin ja niillä on kyky aktivoida entsyymi, proteiinikinaasi, ihmisen kasvainsolumembraaneissa.

Kuten seuraavassa yksityiskohtaisemmin esitetään, keksinnön mukaisesti edellä mainitun kaavan mukaisia TGF-  
30 polypeptidejä saadaan sopivasti erilaisista muunnetuista ihmis- ja hiirisolulinjoista, tietyistä sikiön solulinjoista ja kasvainta kantavien nisäkkäiden kehon nesteistä käyttäen myöhemmin kuvattavaa eristysmenetelmää tai tavanomaista synteettistä tai rekombinanttimenetelmää polypeptidien syntetisoimiseksi. Tyypillisesti mainitun kaavan  
35

mukaisten TGF-polypeptidien ja niiden oligomeerien molekyylipaino on alueella n. 5000 - 35 000. Tässä suhteessa edullisia ovat TGF-polypeptidit, joiden molekyylipaino on n. 5000 - 8000.

5           Keksinnön mukaisesti valmistettuja TGF-polypeptidejä voidaan käyttää pahanlaatuisuuksien havaitsemisessa niissäköillä, koska TGF-polypeptidien tuotanto ja/tai nousseet tuotantotasot ovat luonteenomaisia tiettyjen ihmis- ja hiirisolulinjojen morfologiselle muunnokselle. Tässä  
10           suhteessa myös vasta-aineilla TGF-polypeptideille on käyttöä pahanlaatuisuuden diagnoosissa, koska niitä voidaan käyttää havaitsemaan kasvainsoluissa tai kehon nesteissä läsnäolevan TGF-polypeptidin äärimmäisen alhaiset tasot. Samalla kun koko TGF-polypeptidimolekyyliä voidaan käyttää  
15           vasta-aineiden muodostamiseen (sekä polyklonaalisten että monoklonaalisten), on myös mahdollista ja edullista kustannusten ja teknisen ponnistelun kannalta määrittää TGF-polypeptidisekvenssin eri alueita, jotka todennäköisesti ovat determinanttikohtia, ja käyttää näitä vähintään noin  
20           8 aminohapon, tyypillisesti vähintään noin 10 eikä enemmän kuin noin 20 aminohapon oligopeptidejä määrittelemään hapteeni, jota voidaan käyttää vasta-aineen muodostumisen indusointiin. Oligopeptidi sidotaan sopivaan immunogeeniin ja viedään selkärankaan haluttujen vasta-aineiden toteutukseksi. Esimerkkejä antigeenisistä oligopeptideistä, jotka ovat käyttökelpoisia muodostettaessa tällaisia vasta-aineita, luetellaan seuraavassa.

A) Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Lys-Cys-Pro-Asp-Ser-His-Thr

30           B) Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys

C) Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys-Glu-His-Ala-Asp-Leu-Leu-Ala ja

D) Val-Gly-Val-Arg-Cys-Glu-His-Ala-Asp-Leu-Leu-Ala.

35           Keksinnön mukaisesti edellä esitetyn kaavan mukaisia polypeptidejä ja oligopeptidejä sekä edellä esitettyjä peptidisekvenssejä voidaan valmistaa käyttäen synteettisiä

menetelmiä, menetelmiä, joissa peptidi eristetään luonnossa esiintyvistä lähteistä, esim. solulinjoista ja kehon nesteistä, sekä menetelmiä, joissa käytetään hybridi-DNA-teknologiaa. Niinpä polypeptideille ja oligopeptideille  
5 käytetään sopivasti tavanomaista kiinteäfaasipeptidisynteesiä. Tässä yleisessä synteesimenetelmässä peptidien valmistamiseksi, joka menetelmä on kuvattu esimerkiksi Ganfield et al.'n US-patentissa 4 341 761, käytetään tunnettuja sivuketjusuojaryhmiä ja tavanomaisia polystyreeni-  
10 hartsimatriiseja, esimerkiksi kloorimetyloituja hartseja, hydroksimetyylihartseja tai bentshydryyliamiinihartseja, aminohappokytkenän toteuttamiseksi. Polypeptideille voidaan sopivasti käyttää myös alempana kuvattua menetelmää homogeenisten TGF:ien eristämiseksi luonnon lähteistä halutun peptidin puhtaiden muotojen saamiseksi. Tässä suhteessa erityisen sopivia TGF-polypeptidien lähteitä ovat  
15 seerumiton väliaine, jota on käsitelty retroviruksella muunnetuilla Fischer'in rotan sikiön fibroblasteilla, erityisesti fibroblasteilla, jotka on muunnettu Snyder-Theilen kissan sarkoomaviruksella, Moloneyn hiiren sarkoomaviruksella muunnetuilla hiiren 3T3-soluilla ja ihmisen metastaatteisilla melanoomasolulinjoilla A2058 ja A375. Lähteitä ja menetelmiä sopivia hiirisolulinjoja varten ovat  
20 kuvanneet DeLarco et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 3685 - 3690, ja Ozanne et al., J. Cell. Physiol. 105 (1980) 163 - 180. Lähteitä ja menetelmiä ihmisen solulinjoja varten ovat samalla tavalla kuvanneet Todaro et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5258 - 5262 sekä Giard et al., J. Natl. Cancer Inst. 51 (1973) 1417 - 1423. Seuraavassa selostettua eristämismenetelmää voidaan myös käyttää  
30 TGF-polypeptidien saamiseksi erilaisista kehon nesteistä, kuten ihmisten tai hiirten, joilla on pahanlaatuisuuksia, virtsasta, seerumista, plasmasta, kokoverestä tai aivoselkäydinnesteestä, tai muunnetuista soluista, jotka tuottavat TGF-polypeptidejä. Tässä suhteessa sopiva TGF-polypep-

35

tidien lähde on virtsa tai muut kehon nesteet hiiristä, joihin on siirretty kasvainsoluja (ihmisen melanooma- tai muunnettua rotan soluja), joiden tiedetään tuottavan TGF-polypeptidejä. Kaikissa tapauksissa TGF-polypeptidin identifiointia ja puhtautta voidaan tarkkailla radioreseptorimääritysmenetelmällä, joka perustuu ristiin reaktiivisuuden EGF:n kanssa reseptoriin sitoutumisesta (ks. koe-esimerkit seuraavassa). Menetelmissä, joissa käytetään yhdistelmä- tai hybridi-DNA-teknologiaa, voidaan oligopeptidejä tai polypeptidien segmenttejä, jotka sisältävät korkeintaan esimerkiksi 20 aminohappoa, käyttää kodonisekvenssin johtamiseksi yksisäikeisiä nukleotidi (DNA) -koettimia varten. Nämä nukleotidikoettimet voidaan sitten syntetisoida käyttäen tunnettuja synteessimenetelmiä ja käyttää koettimena lähetti-RNA:n (mRNA) saamiseksi, joka koodaa kasvutekijätyyppisiä polypeptidejä sekä normaaleissa että muunnetuissa soluissa tai kehon nesteissä, jotka sisältävät näitä peptidejä. Kun lähetti-RNA on saatu, voidaan käyttää tavanomaisia menetelmiä mRNA:n käänteiskopioimiseksi cDNA:ksi ja sen jälkeen kloonata cDNA sopivassa vektorissa halutun polypeptidin ilmentymisen aikaansaamiseksi.

Keksinnön mukainen menetelmä antaa käyttöön ainutlaatuisen tehokkaan keinon TGF-polypeptidien saamiseksi homogeenisessa muodossa erilaista vesipitoisista nesteistä, jotka sisältävät TGF-polypeptidien vähemmän puhtaita muotoja, esimerkiksi seerumittomista väliaineista, jotka on käsitelty TGF-polypeptidejä tuottavilla muunnetuilla solulinjoilla, tai nisäkkäiden, joilla on pahanlaatuisuuksia, kehon nesteistä, esimerkiksi virtsasta, tai muunnetuista soluista, jotka tuottavat TGF-polypeptidejä. Tämän eristys- tai puhdistusmenetelmän tärkeitä puolia ovat alkuvuutto eli dialyysivaihe, jossa käytetään vesipitoista etikkahappoa, sitä seuraava TGF:ää sisältävän happoon liukenevan aktiivisuuden geelisuodatuskromatografia ja lopuk-

si käänteisfaasikorkeapainenestekromatografia käyttäen peräkkäin asetonitriiliä ja 1-propanolia vesipitoisen tri-fluorietikkahapon läsnäollessa.

Eräässä edullisessa sovellutusmuodossa keksinnön  
5 mukaista menetelmää voidaan käyttää edullisesti homogeenisten TGF:ien eristämiseksi seerumittomista väliaineista, joita on käsitelty muunnetuilla, TGF:ää tuottavilla solulinjoilla. Tällöin käsitelty väliaine selkeytetään edullisesti esimerkiksi sentrifugoimalla ja väkevöidään ennen  
10 dialyysyä ja TGF:ää sisältävä dialyysistä saatu liuotinfraasi selkeytetään sopivasti esimerkiksi sentrifugoimalla sekä väkevöidään myös ennen geelisuodatuskromatografiaa. Kaikissa tapauksissa dialyysi suoritetaan sopivasti käyttäen vesipitoista etikkahappoliuotinta, jonka etikkahappopitoisuus on 0,01 - 1 M, jolloin 0,1 M etikkahappo on  
15 edullinen. Geelisuodatuskromatografia voidaan toteuttaa käyttäen joukkoa erilaisia geelejä, joita tavanomaisesti käytetään proteiinien tai polypeptidien erottamiseen molekyylikokoon perustuen. Sopivia geelejä ovat dekstraanigeelit, agarosigeelit ja polyakryyliamidigeelit. Tässä suhteessa edullisia ovat polyakryyliamidigeelisuodatushartsit (Bio-Gel<sup>R</sup>-hartsit), kuten Bio-Gel P-10, Bio-Gel P-30 ja Bio-Gel P-60, joista Bio-Gel P-10 on erityisen edullinen. Vesipitoisen etikkahapon, jota käytetään pylvään tasapainottamiseen ja TGF:ää sisältävien fraktioiden eluointiin,  
25 etikkahappopitoisuus on sopivasti 0,2 -2,0 M, jolloin 1,0 M etikkahappo on edullinen. TGF:ää sisältävät fraktiot, jotka eluoituvat pylväästä, voidaan tunnistaa määrittämällä niiden EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuus ja kasvua edistävä aktiivisuus pehmytagarissa (ks. koe-esimerkit seuraavassa). Geelisuodatuskromatografiasta saadut fraktiot, jotka sisältävät TGF-polypeptidejä puhtaudeltaan parantuneina, yhdistetään ja väkevöidään, esimerkiksi kylmäkuivaamalla, valmistavana vaiheena lisäpuhdistusta var-  
35 ten käänteisfaasikorkeapainenestekromatografialla (HPLC).

Puhdistusprosessin loppuvaihe käsittää peräkkäiset HPLC:t eluoiden asetonitriilillä ja 1-propanolilla vesipitoisen trifluorietikkahapon läsnäollessa. Nämä peräkkäiset HPLC-ajot voidaan toteuttaa käyttäen yhtä tai useampia HPLC-pylväitä, mutta on edullista toteuttaa peräkkäiset HPLC-vaiheet käyttäen yhtä ainoata HPLC-pylvästä. Käytetty pylvään täyte on sopivasti huokoista piihappomatriisia, johon on sidottu pitkäketjuinen hiilivety, esimerkiksi 16-22 hiiliatomia sisältävä hiilivety. Edullisia täytteitä ovat µBondapak-hiilivetyypylväät, erityisesti µBondapak C<sub>18</sub>-pylväs (partikkelikoko 10 µm, 0,39 x 30 cm, Waters Associates). Menetelmä toteutetaan tyypillisesti paineen alaisena, edullisesti paineessa väliltä n.  $3,45 \times 10^5$  -  $3,45 \times 10^7$  Pa (50-5000 psi). Ennen pylvääseen viemistä väkevöidyt, TGF:ää sisältävät fraktiot muodostetaan uudelleen 1 - 10-%:iseen trifluorietikkahappoon ja säädetään pH-arvoon 2 - 5, edullisesti 3 - 5, lisäämällä trifluorietikkahappoa. Pylväs tasapainotetaan sopivasti 0,01 - 0,1-%:isella vesipitoisella trifluorietikkahapolla, edullisesti 0,05-%:isella vesipitoisella trifluorietikkahapolla, ennen näytteen ruiskuttamista. Ensimmäinen eluointi suoritetaan asetonitriilillä 0,01 - 0,1-%:isessä, edullisesti 0,05-%:isessä trifluorietikkahapossa käyttäen lineaarista asetonitriiligradienttia (asetonitriiliväkevyys kasvaa lineaarisesti gradientilla n. 0,1 %/min - n. 1 %/min). Eluointi suoritetaan ajanjaksona 0,2:sta 3 tuntiin virtausnopeudella n. 0,2 - 2 ml/min ja lämpötilassa n. 10 - 50 °C, edullisesti n. 40 °C:ssa. Yhdistetyt fraktiot, jotka sisältävät TGF-aktiivisuuden määritettynä EGF:n kanssa kilpailulla ja pehmytagaranalyysillä, väkevöidään esimerkiksi kylmäkuivaamalla ennen toista HPLC-vaihetta käyttäen 1-propanoliliuotinta. Peräkkäisen HPLC:n toista vaihetta varten yhdistetyt ja väkevöidyt fraktiot ensimmäisestä HPLC-eluoinnista muodostetaan uudelleen 0,01 - 0,1-%:iseen trifluorietikkahappoon ja kromatografoidaan uudelleen sa-

massa pylväässä tai toisessa pylväässä, joka on tasapainotettu trifluorietikkahapolla samalla tavalla, jota käytettiin ensimmäistä pylvästä varten. Tämä toinen eluointi suoritetaan 1-propanolilla, 0,01 - 0,1-%:ssa, edullisesti 0,035-%:ssa trifluorietikkahapossa, käyttäen lineaarista 1-propanoligradienttia. Optimituloksia varten on tärkeätä käyttää tässä vaiheessa matalaa lineaarista 1-propanoligradienttia. Erityisesti 1-propanolipitoisuutta tulisi lisätä lineaarisesti gradientilla, joka ei ylitä 0,1 %/min ja edullisesti lineaarinen 1-propanoligradientti tulisi pitää välillä 0,01 %/min ja 0,05 %/min eluoinnin aikana. Tämä toinen eluointi suoritetaan sopivasti aikana yhdestä viiteen tuntiin virtausnopeudella n. 0,5 - 5 ml/min ja lämpötilassa alueella 10 -60 °C, edullisesti n. 40 °C:ssa. Säättämällä lineaarista 1-propanolipitoisuusgradienttia edellä annetuilla matalilla tasoilla on mahdollista eluoida TGF-polypeptidit hyvin määriteltynä TGF-aktiivisuuden huippuina homogeenisina polypeptideinä.

Tällä eristysmenetelmällä on mahdollista ottaa talteen n. jopa 70 % alku-TGF-aktiivisuudesta epäpuhtaassa lähtöaineesta, jolloin saavutetaan yli 200 000 -kertaisia puhdistumiaasteita. Eristämismenetelmällä saatujen homogeenisten TGF-polypeptidien molekyylipainot ovat tyypillisesti alueella n. 5 000 - 35 000 ja ne ovat riittävän puhtaita sallimaan peptidisekvenointi. Edullisia homogeenisiä TGF-polypeptidejä, joita saadaan tällä menetelmällä, ovat TGF:t, joiden näennäiset molekyylipainot ovat 7 400, 20 000 ja 30 000 - 35 000. Näillä homogeenisillä TGF-polypeptideillä on luonteenomaisia TGF-polypeptidien biologisia ominaisuuksia, kun niitä käytetään viljelmässä kasviin muuntamattomiin, normaaleihin indikaattorisoluihin, mukaan lukien kiinnittymisriippumattomuuden saavuttaminen, mistä on tuloksena kyky kasvaa pehmytagarissa. Näitä homogeenisiä TGF-polypeptidejä voidaan käyttää nostattamaan vasta-aineita, joilla on arvoa syövän ja muiden prolifera-

tiivisten tautien havaitsemisessa. Tässä suhteessa ei ole olennaista, että jokainen TGF:n muodoista puhdistetaan homogeenisyyteen vasta-aineiden tuottamiseksi eri TGF-peptideille.

5           Keksinnön mukaisesti valmistettuja polypeptidejä ja oligopeptidejä voidaan käyttää syövän ja muiden proliferaatiivisten sairauksien hoitoon sekä hoitoihin, joissa solukasvun edistäminen on eduksi, esim. haavan parantamiseen ja haavauman hoitoon. Niitä voidaan käyttää farmaseuttisina koostumuksina, jotka sisältävät tehokkaan määrän kyseistä poly- ja/tai oligopeptidiä sekoitettuna farmaseuttisesti hyväksyttäviin kantajiin. Erityisesti farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät aktiivisena aineosana keksinnön mukaisesti valmistettuja poly- tai oligopeptidejä, voidaan yleensä formuloida sopivan kiinteän tai nestemäisen kantajan kanssa kulloinkin käytettävää antotapaa vastaavasti. Esimerkiksi parenteraaliset formulaatiot ovat tavallisesti injektoitavia nesteitä, joissa käytetään kantajina farmaseuttisesti ja fysiologisesti hyväksyttäviä nesteitä, kuten fysiologista suolaliuosta, tasapainotettuja liuoksia jne. Oraalisesti käytettävät formulaatiot puolestaan voivat olla kiinteitä, esim. tabletteja tai kapseleita, tai nestemäisiä liuoksia tai suspensioita.

25           Keksinnön mukaisesti valmistettuja poly- ja/tai oligopeptidejä voidaan antaa ihmisille eri tavoin, kuten suun kautta, laskimonsisäisesti, lihaksensisäisesti, vatsaontelonsisäisesti, nenänsisäisesti, ihonsisäisesti ja ihonalaisesti. Käytettävän antotavan ja annosalueen valitsee hoitava lääkäri ottaen huomioon potilaan yksityiskohdat, tarvittavan hoidon luonteen ja/tai kyseessä olevan sairauden tilan. Esimerkiksi haavoista vaurioitunutta kudosta hoidetaan tavallisesti päivittäisellä tai kahdesti päivässä annettavalla annoksella muutamasta päivästä muutama viikkoon; kun taas kasvain- tai syöpähoito käsittää 35 päivittäisen tai useita päivittäisiä annoksia kuukausien

5 tai vuosien ajan. Hoito keksinnön mukaisesti valmistetuilla poly- ja/tai oligopeptideillä voidaan yhdistää muiden hoitojen kanssa ja siihen voi liittyä hoito muilla kemoterapeuttisilla tai kemiallisesti estävillä aineilla hoidon antamiseksi proliferatiivisia sairauksia tai kasvaimia vastaan tai muissa tiloissa, joihin ne ovat tehokkaita.

#### Esimerkki I

10 Ihmisen pienimolekyyllipainoisten muuntokasvutekijöiden (hTGF:t) tuottaminen, puhdistaminen ja karakterisointi

##### A. Kokeellisia menetelmiä

##### hTGF:ien lähde

15 hTGF:t puhdistettiin seerumittomasta väliaineesta, jota oli käsitelty ihmisen metastaattisella melanooma linjalla A2058 (Todaro et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5258 - 5262), joka oli peräisin aivometastaasista 43 vuoden ikäiseltä mieheltä. Soluja kasvatettiin 90 %:n yhteenkasvuun kiertopulloissa, jotka sisälsivät Dulbecco'n modifioitua Eagle'n väliainetta (Grand Island Biological Co., 430-2100), jota oli täydennetty 10 %:lla vasikan seerumia (Colorado Serum Co.) 37 °C:ssa. Soluja pestiin 1 tunti 50 ml:lla seerumitonta Waymouth'in väliainetta (Grand Island Biological Co., MD 705/1). Tämä ja toinen 24 tuntia myöhemmin kerätty supernatantti hylättiin. Myöhem-

20 mät supernatantit otettiin talteen joka toinen päivä tai joka kolmas päivä kahden viikon ajan.

25 Väliaine kerättiin talteen dekantoimalla, varastoitettiin korkeintaan 24 h 4 °C:ssa proteaasi-inhibiittori-fenyylimetaanisulfonyylifluoridin (1 µg/ml) läsnäollessa ja

30 selkeytettiin jatkuvavirtaussentrifugoinnilla kierrosnopeudella 32 000 rpm 4 °C:ssa. Käytettiin virtausnopeuksia 5 l/h CF-32-jatkuvavirtausroottorissa (Beckman) L5-50 -mallisessa ultrasentrifugissa (Beckman). Suurnopeuksisen

sentrifugoinnin jälkeen saatua supernatanttia nimitetään A2058-käsitellyksi väliaineeksi.

5 A2058-käsitelty väliaine väkevöitiin välittömästi onttokuitu-dialysoimis/väkevöimislaitteessa (Model DC10, H10P5-20-tyyppinen patruuna, Amicon Corp.) 10 °C:ssa. Konsentraatti valutettiin, kun tilavuus oli pienentynyt 150-kertaisesti. Patruuna pestiin 1 000 ml:lla Waymouth'in väliainetta. Ultrasuodos hylättiin.

hTGF:ien puhdistaminen

10 Dialyysi ja sentrifugointi

Yhdistettyä retentaattia ja patruunan pesunestettä A2058-käsitellyn väliaineen ultrasuodatuksen jälkeen dialysoitiin 60 tuntia 0,1 M etikkahappoa vastaan Spectrapor 3 -dialyysiletkussa (Spectrum Medical Industries). Retentaattia sentrifugoitiin 100 000 x g:ssa 1 tunti 4 °C:ssa. Pelletti hylättiin. Supernatantti väkevöitiin kylmäkuivamalla ja liuotettiin 0,5 ml:aan 1 M etikkahappoa litraa alkuperäistä A2058-käsiteltyä väliainetta kohti.

Kromatografia Bio-Gel P-10 -geelillä

20 Väkevöinnin, dialyysin ja sentrifugoinnin jälkeen supernatantti, joka sisälsi hTGF-aktiivisuuden, puhdistettiin edelleen geelisuodatuskromatografialla Bio-Gel P-10 -pylväässä (2,5 x 8,5 cm, patsaan tilavuus 420 ml, 200-400 mesh, Bio-Rad Laboratories). Pylväs tasapainotettiin 1 M etikkahapolla 22 °C:ssa. Pylvääseen vietiin proteiininäytteet (65 - 115 mg) 1 M etikkahapossa (5 ml). Muuttumattoman virtausnopeuden varmistamiseksi nesteen ulosvirtaus pylväästä asetettiin 12 ml/h:ksi peristalttisella pumpulla. Kerättiin 4,8 ml:n fraktioita. Pienet määrät fraktioita kylmäkuivattiin myöhempiä EGF:n kanssa kilpailevan aktiivisuuden ja kasvua edistävän aktiivisuuden määrityksiä varten pehmytagarissa. Fraktiot, jotka edustivat tietyn huipun pääosia, yhdistettiin ja väkevöitiin kylmäkuivamalla.

### Käänteisfaasikorkeapainenestekromatografia

hTGF:n lopullinen puhdistaminen tapahtui käänteisfaasi-HPLC:lla käyttäen yleistä menetelmää, jonka ovat selostaneet Marquardt et al., J. of Biol. Chem. 256 (1981) 6859 - 6865. Kaikki erottamiset suoritettiin  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>-kolonnilla (partikkelikoko 10  $\mu$ m, 0,39 x 30 cm, Waters Associates) virtausnopeudella 1 ml/min 40 °C:ssa. Kylmäkuivatut näytteet muodostettiin uudelleen 0,05-%:iseen (v/v) trifluorietikkahappoon vedessä, säädettiin pH-arvoon 2 10-%:isella (v/v) trifluorietikkahapolla ja vietiin näyteinjektorin avulla pylvääseen, joka oli tasapainotettu 0,05-%:isella trifluorietikkahapolla. Pylväs eluoitiin sitten lineaarisella asetonitriili-gradientilla 0,045-%:isessä trifluorietikkahapossa. Pylväästä ulosvirtaava neste kerättiin 1,5 ml:n fraktioina. Pienet määrät fraktioita kylmäkuivattiin EGF:n kanssa kilpailu- ja kasvun stimulointi-määrityksiä varten. Yhdistetyt fraktiot, jotka sisälsivät pääosan hTGF-aktiivisuudesta, väkevöitiin kylmäkuivaamalla.

Yhdistetyt, hTGF:ää sisältävät erät liuotettiin 0,05-%:iseen trifluorietikkahappoon ja kromatografoitiin uudelleen samassa pylväässä, joka oli sitä ennen tasapainotettu 0,05-%:isella trifluorietikkahapolla vedessä. Sitteen pylväs eluoitiin lineaarisella 1-propanoli-gradientilla 0,035-%:isessä trifluorietikkahapossa. Pylväästä ulosvirtaava neste kerättiin 1,5 ml:n fraktioina. Pienet määrät fraktioita kylmäkuivattiin EGF:n kanssa kilpailu- ja kasvun stimulointi -määrityksiä varten.

### SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi

Natriumdodekyylisulfaatti (SDS) -polyakryyliamidigeelielektroforeesi suoritettiin, kuten Laemmli on selostanut, Nature (Lond) 227 (1980) 680 - 685. Valmistettiin 15 - 30-%:inen akryyliamidigradienttilevy (140 x 120 x 0,75 mm), jossa oli 4 %:inen konsentrintigeeli. Geelejä ajettiin ajojännitteellä 30 V käyttäen elektrodipuskuria,

joka sisälsi Tris:ä (0,05 M), glysiiniä (0,38 M) ja SDS (0,1 %, w/v), kunnes merkkiväriaine (bromifenolisininen) oli kulkenut pois geelin päästä. Elektroforeesin jälkeen geelejä kiinnitettiin kahden tunnin ajan 50-%:isessa metanolissa, joka sisälsi 10 % etikkahappoa, pestiin yli yön 5-%:isessa metanolissa, joka sisälsi 7 % etikkahappoa, ja värjättiin hopealla (Oakley et al., Anal. Biochem. 105 (1980) 361 - 363).

#### Proteiinimääritys

Kokonaisproteiini määritettiin käyttäen naudan seerumialbumiinia standardina. Ennen proteiinimääritystä lähtöaine dialysoitiin fosfaattipuskuroitua fysiologista suolaliuosta vastaan värireaktioita häiritsevien viljelyväliaineen aineosien poistamiseksi tai kylmäkuivattiin, jos näytteet oli liuotettu haihtuviin happoihin. Proteiini määritettiin myös aminohappoanalyysillä. Kylmäkuivattuja näytteitä hydrolysoitiin 110 °C:ssa 24 tuntia tyhjenetyissä Pyrex-putkissa käyttäen 0,1 ml 6 M HCl:a, joka sisälsi 0,1 % nestemäistä fenolia, ja analysoitiin Durrum D-500 -analysaattorilla, joka oli varustettu PDP 8/A -tietokoneintegraattorilla käyttäen, o-faaliyhappoaldehydiä primaaristen amiinien fluorogeenista havaitsemista varten (Bensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 619 - 622).

#### Radioreseptorimääritys

Puhdistettu EGF leimattiin Na<sup>125</sup>I:lla kloramiini-T-menetelmän muunnoksella, kuten ovat selostaneet DeLarco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 4001 - 4005. <sup>125</sup>I-EGF-sitoutumisanalyysi suoritettiin käyttäen formaliinilla kiinnitettyjen A431-ihmissyöpäsolujen lähes yhteneviä yksisolukerroksia, kuten aikaisemmin on selostettu (DeLarco et al., J. of Biol. Chem. 255 (1980) 3685 - 3690). Kiinnitetyt solut pestiin kahdesti 0,5 ml:lla sidepuskuria (Dulbecco'n modifioitu Eagle'n väliaine, joka sisälsi 1 mg/ml naudan seerumin albumiinia ja 50 mM 2-[bis(2-hydrok-

sietyyli)amino]etaanisulfonihappoa, pH 6,8). Kilpailut aloitettiin lisäämällä 0,2 ml sidepuskuria, joka sisälsi 0,4 ng  $^{125}\text{I}$ -EGF:ää mahdollisen inhibiittorin kanssa tai ilman sitä. Yhden tunnin inkuboinnin jälkeen 22 °C:ssa spesifisesti sitoutunut  $^{125}\text{I}$ -EGF määritettiin. TGF-sisältö ilmaistiin sen  $^{125}\text{I}$ -EGF:n sitoutumista EGF-reseptoriin inhibointiasteen avulla. Yksi EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuusyksikkö määritellään määräksi proteiinia, joka estää  $^{125}\text{I}$ -EGF-sitoutumisen reseptoriinsa 50-%:isesti.

#### 10 Kasvumäärittäminen pehmytagarissa

Pesäkekasvumäärittäminen pehmytagarissa käyttäen normaalin rotan munuaisfibroblasteja, kloonin 49F, suoritettiin kuten Todaro et al. ovat esittäneet, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5258 - 5262. Testattavat kylmäkuivatut näytteet muodostettiin uudelleen 0,5 ml:aan Dulbecco'n modifioitua Eagle'n väliainetta, jota oli täydennetty 10 %:lla vasikan seerumia. Lisättiin 1,5 ml 0,5-%:ista (w/v) agariala (Difco) täydennetyssä väliaineessa ja 0,5 ml täydennettyä väliainetta, joka sisälsi  $2,3 \times 10^4$  solua. 2,3 ml syntynyttä seosta pipetoitiin 2 ml:n pohjakerrokselle (0,5 % agariala täydennetyssä väliaineessa) 60 mm:n petri-maljoissa (Falcon). Soluja inkuboitiin 37 °C:ssa kosteute-  
tussa, 5 %  $\text{CO}_2$  ja 95 % ilmaa sisältävässä atmosfäärissä. Määrittäminen luettiin kiinnittämättömänä ja värjäämättömänä 5.  
päivänä ja 10 - 14. päivinä.

#### 25 B. Tulokset

##### hTGF:ien lähde, väkevöinti ja alkufraktiointi

hTGF:t eristettiin ihmisen erittäin muunnetun meta-  
staattisen melanoomasolulinjan, A2058, seerumittomasta  
30 käsitelystä väliaineesta. hTGF:ien kvantitatiivinen mää-  
rittäminen perustui kahteen sen ominaisuuteen: kykyyn indusoida  
normaalien rotan munuaisfibroblastien kiinnittymisestä  
riippumaton kasvu pehmytagarissa ja kyvystä kilpailla  $^{125}\text{I}$ -  
EGF:n kanssa EGF-reseptorikohdista ihmisen syöpäsoluissa  
35 A431. Yhteenveto vaiheista, jotka johtavat hTGF:ien eris-  
tämiseen ja sen talteenottoon, on esitetty taulukossa I.

# Taulukko I

hTGF:ien puhdistaminen ihmisen melanooma-solujen, A2058, käsitellystä väliaineesta

| Puhdistusvaihe                              | Talteen-<br>otettu<br>proteiini <sup>a</sup> | Talteen-<br>otettu EGF:n<br>kanssa kilpaili-<br>va aktiivisuus | Suhteel-<br>linen<br>spesifinen<br>aktiivisuus | Puhdis-<br>tusaste | Saanto         |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------|----------------|
|                                             | mg                                           | yksikköä <sup>b</sup>                                          | yksikköä/mg                                    | -kertainen         | %              |
| 1. A2058-käsitelty väliaine                 | 1,020                                        | 4,525                                                          | 4,4                                            | 1                  | 100            |
| 2. Happoliukoinen superna-<br>tantti        | 837                                          | 4,299                                                          | 5,1                                            | 1                  | 95             |
| 3. Bio-Gel P-10                             |                                              |                                                                |                                                |                    |                |
| Yhdistetty P-10-A                           | 29,7                                         | 2,077                                                          | 70                                             | 16 (1)             | 45,9 (100)     |
| Yhdistetty P-10-B                           | 14,5                                         | 2,033                                                          | 140                                            | 32 (1)             | 44,9 (100)     |
| 4. Bondapak C <sub>18</sub> (asetonitriili) | 0,202                                        | 1,628                                                          | 8,059                                          | 1,832 (57)         | 36,0 (80,1)    |
| 5. Bondapak C <sub>18</sub> (1-propanoli)   | 0,0015                                       | 1,476                                                          | 984,000                                        | 223,636 (6,988)    | 32,6<br>(72,6) |

<sup>a</sup>Kokonais-proteiini määritettiin käyttäen standardina naudan seerumin albumiinia. Vaiheen 5 hTGF:ien kvantitatiivinen määrittäminen perustui aminohappoanalyyysiin. Rinnakkaisnäytteen abso-  
luuttisen spesifisen aktiivisuuden havaittiin olevan  $1-1,5 \times 10^6$  yksikköä/mg.

<sup>b</sup>Yksi EGF:n kanssa kilpailuva aktiivisuusyksikkö määritellään määräksi proteiinia, joka estää <sup>125</sup>I-EGF:n sitoutumisen reseptoriinsa 50-%:sesti.

Seerumiproteiinien poistamiseksi A2058-soluja pes-  
tiin perusteellisesti Waymouth'in väliaineella ennen nii-  
den viljelemistä seerumittomassa väliaineessa. Superna-  
tanttinesteet otettiin talteen joka toinen päivä kahden  
5 viikon ajan. Viljelyolosuhteet olivat sellaiset, että vil-  
jelyjakson lopussa yli 90 % soluista oli vielä elinvoi-  
maisia ja kiinnittyivät yksisoluisina kerroksina. Ensim-  
mäinen selkeytetty 136 l:n määrä A-2058-käsiteltyä väliai-  
netta, joka sisälsi 1,02 g kokonaisproteiinia ja 4525 yk-  
10 sikköä EGF:n kanssa kilpailevaa aktiivisuutta, väkevöitiin  
n. 900 ml:ksi käyttäen onttokuituväkevöimislaitetta, jonka  
patruunoiden molekyylipainoraja oli 5 000. Koko EGF:n  
kanssa kilpaileva aktiivisuus pidentyi ja saanto oli yli  
95 %.

15 Väkevöidyn, A2058-käsitellyn väliaineen dialyysi  
etikkahappoa vastaan ja senjälkeinen sentrifugointi tuot-  
tivat 95 %:n saannon alkuperäisestä EGF:n kanssa kilpaile-  
vasta kokonaisaktiivisuudesta. 18 % proteiinista oli hap-  
poon liukenematonta ja hylättiin. Happoliukoinen, osittain  
20 puhdistettu hTGF saatettiin geelisuodatuskromatografiaan  
käyttäen Bio-Gel P-10 -geeliä. Pylväs eluoitiin 1 M etik-  
kahapolla. Kontaminoivan proteiinin päämassa eluoitiin yh-  
dellä pylvään tilavuudella ja erottui hyvin EGF:n kanssa  
kilpailevasta aktiivisuudesta ja kasvua stimuloivasta ak-  
25 tiivisuudesta. Kahden aktiivisuushuipun havaittiin olevan  
hyvin erillään toisistaan. Fraktioiden, joilla oli sekä  
EGF:n kanssa kilpaileva että kasvua stimuloiva aktiivisuus  
(P-10-A ja P-10-B), näennäiset molekyylipainot olivat 10  
500 ja 6 800, vastaavasti. Fraktioita, joilla oli vain  
30 toinen näistä kahdesta aktiivisuudesta, ei havaittu.  
hTGF:ää sisältävät fraktiot yhdistettiin, kuten on esitet-  
ty, kylmäkuivattiin ja puhdistettiin edelleen. Suurempimo-  
lekyylipainoinen TGF eluoitui pylvästästä leveänä piikkinä  
(P-10-A) ja näytti liittyvän erikokoisiin polypeptideihin.  
35 P-10-A sisälsi 46 % alkuperäisestä EGF:n kanssa kilpaile-  
vasta aktiivisuudesta. Pienimolekyylipainoinen TGF eluoi-

tui pylväästä terävänä piikkinä (P-10-B) ja edusti 45 % alkuperäisestä EGF:n kanssa kilpailevasta kokonaisaktiivisuudesta. Pylvääseen viedyn EGF:n kanssa kilpailevan aktiivisuuden yhteinen saanto vaiheesta 1 geelisuodatus-

5 kromatografiavaiheen läpi oli 91 % (taulukko I). hTGF eluoitui kahtena erillisenä pääpiikkinä, jotka vaihtelivat kvantitatiivisesti valmistuksesta toiseen. A2058-käsitellyn väliaineen joissakin valmisteissa oleellisesti kaikki kasvua edistävä aktiivisuus oli hTGF:ien alueella.

10 hTGF:ien puhdistaminen

hTGF:t puhdistettiin edelleen käänteisfaasi-HPLC:llä. Väkevöidyn, A2058-käsitellyn väliaineen happoliukoisen, EGF:n kanssa kilpailevan aktiivisuuden geelisuodatuskromatografian jälkeen Bio-Gel P-10 -geeliä käyttäen yhdistetty P-10-B-erä muodostettiin uudelleen 0,05

15 -%:iseen trifluorietikkahappoon vedessä ja kromatografoitiin sitten  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> -kolonnilla. Yksittäisten fraktioiden EGF:n kanssa kilpaileva ja kasvua stimuloiva aktiivisuus pehmytagarissa määritettiin. hTGF:t erotettiin

20 hyvin kontaminoivan proteiinin päämassasta, joka eluoitui orgaanisen liuottimen suuremmilla väkevyyksillä. hTGF:t sisältävät fraktiot yhdistettiin, kylmäkuivattiin ja otettiin uudelleen kromatografoitaviksi. Saatiin hTGF:ien 57-kertainen puhdistuminen geelisuodatuskromatografian jälkeen.

25 80 % alkuperäisestä EGF:n kanssa kilpailevasta aktiivisuudesta P-10-B-erässä otettiin talteen (taulukko I).

hTGF:t sisältävien fraktioiden uudelleenkromatografointi  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> -kantajalle valittiin lopulliseksi puhdistusvaiheeksi, koska näillä pylväillä havaittiin ai-

30 noastaan suhteellisen pieniä EGF:n kanssa kilpailevan aktiivisuuden häviöitä. hTGF:ien selvän erottumisen epäpuhtauksista saavuttamiseksi oli tarpeen käyttää loivaa lineaarista 1-propanoli-gradienttia 0,035-%:isessa trifluorietikkahapossa. Kontaminoivan peptidiaiineksen päämassa

35 erottui hyvin määritellystä aktiivisuuspiikistä. EGF:n kanssa kilpaileva ja kasvua stimuloiva aktiivisuus puhdis-

tuivat rinnakkain ja niillä oli selvästi erottuvat absorboivuuspiikit 13-%:isessa 1-propanolissa. Fraktiot, jotka sisälsivät hTGF:t, yhdistettiin ja analysoitiin edelleen. hTGF:ien puhdistuminen oli n. 7 000-kertainen geelisuodatuskromatografian jälkeen saannon ollessa 33 % alkuperäisestä EGF:n kanssa kilpailevasta kokonaisaktiivisuudesta. hTGF:ien kokonaissaanto vaiheesta 3 lopullisen käänteisfaasi-HPLC-vaiheen läpi oli 73 % ja saanto vaihetta kohti oli 80 - 100 % (taulukko I).

10        hTGF:ien karakterisointi

          Lopullisen hTGF-valmisteen puhtaus määritettiin analyyttisellä SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Geeli värjättiin hopealla. Havaittiin yksi pääpolypeptidinauha, jonka näennäinen  $M_p$  oli 7 400. Sama kuviomalli saatiin, kun näytteistä ajettiin elektroforeesi pelkistämättömissä olosuhteissa, mikä osoittaa, että TGF on yksiketjuinen molekyyli.

          hTGF:ien reseptoriaktiivisuutta verrattiin EGF:ään radioreseptorimäärityksellä. hTGF:ien kvantitatiivinen määritys perustui rinnakkaisnäytteen aminohappoanalyysiin. Sekä hTGF:t että EGF kilpailivat  $^{125}\text{I}$ -EGF:n kanssa ihmisen A431-syöpäsolujen EGF-reseptoripaikoista. hTGF:ien spesifisen EGF:n kanssa kilpailevan aktiivisuuden havaittiin olevan  $1 - 1,5 \times 10^6$  yksikköä/mg; hTGF:iä tai EGF:ää tarvittiin 1,1 ng estämään EGF:n sitoutuminen 50-%:isesti.

          hTGF:t mahdollistivat normaalien kiinnittymisestä riippuvaisten rotan munuaissolujen, kloonin 49F, kasvamisen pehmytagarissa. hTRF:ien puolimaksimaalinen vaste pehmytagarissa saavutettiin yhdellä EGF:n kanssa kilpailevala yksiköllä tai 1,1 ng:lla hTGF:iä, kun taas EGF ei stimuloi näiden solujen kasvua pehmytagarissa edes testattuna jopa 10  $\mu\text{g}$ :lla.

Esimerkki II

Ihmisen (hTGF), rotan (rTGF) ja hiiren (mTGF) muun-  
tokasvutekijöiden tuotanto suuressa mittakaavassa, puhdis-  
taminen ja aminohapposekvenointi

5        A. Kokeelliset menetelmätTGF:n lähde

rTGF, mTGF ja hTGF puhdistettiin seerumittomasta  
väliaineesta, joka oli käsitelty Fisher'in rotan sikiöfib-  
roblasteilla, FRE CL10, FRE 3A:n alakloonilla (Sacks et  
10 al., Virology 97 (1979) 231 - 240), joka oli muunnettu ei-  
tuottavaksi Snyder-Theilen'in kissan sarkoomaviruksella  
(Snyder et al., Nature (Lond) 221 (1969) 1074 - 1075),  
Moloney'n hiiren sarkoomaviruksella muunnetulla 3T3-solu-  
linjalla 3B11-IC (Bassin et al., Int. J. Cancer 6 (1970)  
15 95 - 107) ja kahdella ihmisen metastaattisella melanooma-  
solulinjalla, A2058 (ks. esimerkki I) ja A375 (Girad et  
al., J. Natl. Cancer Inst. 51 (1973) 1417 - 1423), vastaa-  
vasti. Soluja kasvatettiin 2 l:n muovisissa kiertopul-  
loissa, jotka sisälsivät Dulbecco'n modifioitua Eagle'n  
20 väliainetta täydennettynä 10 %:lla vasikan seerumia, ja  
ylläpidettiin sen jälkeen seerumittomassa Waymouth'in vä-  
liaineessa, kuten DeLarco et al., Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA 75 (1978) 4001 - 4005, ovat selostaneet. Seerumiton  
käsitelty väliaine koottiin talteen joka 24. tunti 3 päi-  
25 vän ajan, selkeytettiin jatkuvavirtaussentrifugoinnilla ja  
supernatantti väkevöitiin (Marquardt et al., J. of Biol.  
Chem. 255 (1980) 9177 - 9181). Käsitellyn väliaineen kon-  
sentraatti oli lähtöaine TGF:ien puhdistusta varten.

TGF:ien puhdistaminen

30        TGF:t valmistettiin oleellisesti edellä esimerkissä  
I melanoomaperäisen hTGF:n puhdistamiselle selostetuin  
menetelmin. Käsitellyn väliaineen ultrasuodatuksen jälkei-  
nen retentaatti dialysoitiin 0,1 M etikkahappoa vastaan ja  
sentrifugoinnin jälkeen saatu supernatantti väkevöitiin  
35 kylmäkuivaamalla ja liuotettiin uudelleen 1 M etikkahap-  
poon myöhempää geelisuodatuskromatografiaa varten Bio-Gel

P-10 -pylväällä (2,5 x 85 cm, 200-400 mesh, Bio-Rad Laboratories). Pylväs tasapainotettiin 1 M etikkahapolla.

Fraktiot, jotka sisälsivät pääosan EGF:n kanssa kilpailevasta aktiivisuudesta ja joiden näennäinen molekyylipaino oli 7 000, yhdistettiin ja kylmäkuivattiin.

rTGF:n, mTGF:n ja hTGF:n lopullinen puhdistaminen tapahtui käänteisfaasi-HPLC:llä käyttäen esimerkissä I kuvattua kromatografiasysteemiä. Erotukset suoritettiin  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> -kolonnilla (partikkelikoko 10  $\mu$ m, 0,39 x 30 cm, Waters Associates). Liikkuva faasi oli 0,05 % trifluorietikkahappo ja liikkuvan faasin modifioija oli asetonitriili, joka sisälsi 0,045 % trifluorietikkahappoa. Asetonitriilin väkevyyttä nostettiin lineaarisesti (0,083 %/min) 2 tunnin aikana virtausnopeudella 1 ml/min 40

°C:ssa peptidien eluomiseksi. Yhdistetyt TGF:ää sisältävät erät kylmäkuivattiin ja muodostettiin uudelleen 0,05-%:iseen trifluorietikkahappoon ja kromatografoitiin uudelleen samassa pylväässä käyttäen liikkuvan faasin modifioijana 1-propanolia, joka sisälsi 0,035 % trifluorietikkahappoa. 1-propanolin väkevyyttä nostettiin lineaarisesti (0,05 %/min) 2 tunnin aikana virtausnopeudella 1 ml/min 40 °C:ssa. Fraktioiden yhdistetyt erät, jotka sisälsivät pääosan EGF:n kanssa kilpailevasta aktiivisuudesta, kylmäkuivattiin.

#### TGF:n määrittäminen

TGF määritettiin kvantitatiivisesti radioreseptorimäärityksellä, joka perustuu reseptorin ristireaktiivisuuteen hiiren leuanalussylikirauhasen orvaskeden kasvutekijän (mEGF) kanssa. Puhdistettu mEGF leimattiin Na<sup>125</sup>I:lla kloramiini-T -menetelmän muunnoksella, kuten esimerkissä I selostettiin. <sup>125</sup>I-EGF:n sitomisanalyysi suoritettiin formaliinilla kiinnitetyillä ihmisen A431 -syöpäsoluilla, 8 x 10<sup>3</sup>, Micro Test II -levyillä (Falcon). TGF:n väkevyyttä ilmaistiin mEGF ng-ekvivalentteina/ml ja perustui TGF:n määrään, joka tarvitaan aikaansaamaan yhtä suuri <sup>125</sup>I-EGF:n

sitoutumisen A431-soluihin estyminen kuin tunnetulla määrällä leimaamatonta mEGF:ä.

#### TGF:n aminohapposekvenssin määrittäminen

Aminohapposekvenssianalyysiä varten rTGF (3 µg) pelkistettiin ditiotreitolilla (20 mM) 100 µl:ssa Tris-HCl-puskuria (0,4 M), joka sisälsi guanidiini-HCl:a (6 M) ja Na<sub>2</sub>-EDTA:ta (0,1 %), pH 8,5, kahden tunnin ajan 50 °C:ssa, ja S-karboksiamidometyloitiin sen jälkeen jodi-asetamidilla (45 mM) 30 minuutin ajan 22 °C:ssa. S-karboksiamidometyloidusta rTGF:sta poistettiin suolat µBondapak C<sub>18</sub> -kolonnilla. Peptidi eluointiin 0,045 % trifluorietikkahappoa sisältävän, vesipitoisen asetonitriilin gradientillä. Asetonitriilin väkevyyttä nostettiin lineaarisesti (1 %/min) 1 tunnin aikana virtausnopeudella 1 ml/min 40 °C:ssa.

S-karboksiamidometyloidun rTGF:n ja modifioimattomien mTGF:n ja hTGF:n automatisoidut sekvenssianalyysit (Edman et al., Eur. J. Biochem. 1 (1967) 80 - 91) suoritettiin kaasuneste-kiinteäfaasimikrosekvenaattorilla (Hewick et al., J. of Biol. Chem. 256 (1981) 7990 - 7997). Sekvenaattorifraktiot analysoitiin käänteisfaasi-HPLC:llä (Hunkapiller et al., Science 219 (1983) 650 - 659).

#### B. Tulokset

##### TGF:n puhdistus

Pienimolekyyllipainoisen rTGF:n, mTGF:n ja hTGF:n puhdistettuja valmisteita saatiin retroviruksella muunnettujen rotan ja hiiren fibroblastien ja kahden ihmisen melanoomasolulinjan käsitelystä väliaineesta, vastaavasti. Puhdistaminen tapahtui happoliukoisen EGF:n kanssa kilpailevan aktiivisuuden geelisuodatuskromatografiolla Bio-Gel P-10 -geelillä 1 M etikkahapossa, mitä seurasi käänteisfaasi-HPLC µBondapak C<sub>18</sub> -kantajalla käyttäen peräkkäin vesipitoisen asetonitriilin lineaarista gradienttia ja sen jälkeen 0,035 % trifluorietikkahappoa sisältävän 1-propanolin lineaarista gradienttia. rTGF:n, mTGF:n ja hTGF:n

lopullisen puhdistusvaiheen eluutiomallit osoittavat, että EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuus puhdistui rinnan selvästi erottuvan absorbanssiipiikin kanssa ja erottui tehokkaasti kontaminoivasta, UV-absorboivasta aineksesta. Proteiinin pääpiikki rTGF-, mTGF- ja hTGF-valmisteissa eluotui  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> -pylväästä standardiolosuhteissa ajassa 48 - 55 minuuttia.

Geelisuodatuskromatografia Bio-Gel P-10 -geelillä aikaansai pienimolekyyllipainoisten TGF:ien erottumisen suurempimolekyyllipainoisista TGF:istä ja vähensi  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> -pylvääseen lisättyä proteiinimäärää seuraavassa puhdistusvaiheessa. Pienimolekyyllipainoiset TGF:t edustivat 45 -80 % alkuperäisestä EGF:n kanssa kilpailevasta kokonaisaktiivisuudesta. TGF:ien käänteisfaasi-HPLC  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> -kantajalla seuraavassa kahdessa puhdistusvaiheessa oli hyvin tehokas kummankin antaessa tyypillisellä valmisteella saannon 80 - 100 % vaihetta kohti. Pienimolekyyllipainoisten TGF:ien lopullinen saanto oli n. 70 % laskettuna maksimaalisesta, puhdistuksen kuluessa havaitusta EGF:n kanssa kilpailevasta kokonaisaktiivisuudesta. Puhdistetun rTGF:n keskisaanto oli 90 ng/l, mTGF:n 50 ng/l ja hTGF:n 10 ng/l käsiteltyä väliainetta. Tämä laskelma perustuu spesifiseen aktiivisuuteen, joka on määritetty eristetyille TGF:ille olettaen, että EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuus mitattuna radioreseptorimääritysmenetelmällä heijastaa pelkästään pieni- ja suurimolekyyllipainoisten TGF:ien kokonaispitoisuuksia. Immunoreaktiivista mEGF ei havaittu käsitellyssä väliaineessa.

#### TGF:n puhtaus

rTGF:n, mTGF:n ja hTGF:n puhtaus saatuna kromatografisilla eluutioprofiileilla määritettiin EGF-radioreseptorimääritysmenetelmällä ja aminohapposekvenssianalyysillä. rTGF, mTGF ja hTGF kilpailivat <sup>125</sup>I-EGF:n kanssa EGF-reseptoripaikoista ihmisen A431-syöpäsoluilla ja olivat kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti lähes erottumatto-

mia mEGF:stä. Siten lopullisten TGF-valmisteiden uskottiin olevan erittäin puhtaita ja pääasiallisesti homogeenisiä. Yksi ainoa aminotermiinalinen sekvenssi määritettiin rTGF:lle, mTGF:lle ja hTGF:lle automatisoidulla Edman-hajoituksella. Mikä tahansa suojaamaton vähäinen peptidisekvenssi, jota on läsnä yli 5 %, olisi voitu havaita käytyillä menetelmillä. hTGF:n homogeenisyys vahvistettiin lisäksi analyttisellä natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Puhdistettu valmiste antoi yhden suuren polypeptidinauhan.

#### TGF:n aminohapposekvenointi

rTGF:n, mTGF:n ja hTGF:n täydellinen sekvenointi suoritettiin ja näiden kolmen polypeptidin aminohapposekvenssit on annettu seuraavassa. Esitetyistä sekvensseistä havaitaan, että rTGF ja mTGF ovat kemialliselta rakenteeltaan identtisiä ja lisäksi että oleellinen homologia on olemassa hiiren TGF:ien ja hTGF:ien välillä ja erilaisia aminohappotähteitä esiintyy ainoastaan harvoissa asemissa (7, 15, 23 ja 38) sekvensseissä.

#### (1) rTGF

Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Lys-Cys-Pro-Asp-Ser-His-  
 Thr-Gln-Tyr-Cys-Phe-His-Gly-Thr-Cys-Arg-Phe-Leu-  
 Val-Gln-Glu-Glu-Lys-Pro-Ala-Cys-Val-Cys-His-Ser-  
 Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys-Glu-His-Ala-Asp-Leu-  
 Leu-Ala

#### (2) mTGF

Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Lys-Cys-Pro-Asp-Ser-His-  
 Thr-Gln-Tyr-Cys-Phe-His-Gly-Thr-Cys-Arg-Phe-Leu-  
 Val-Gln-Glu-Glu-Lys-Pro-Ala-Cys-Val-Cys-His-Ser-  
 Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys-Glu-His-Ala-Asp-Leu-  
 Leu-Ala



tuja menetelmiä. Samanlaisia kokeita suoritettiin myös rotilla, joilla oli kemiallisesti karsinogeenilla indusoituja kasvaimia, ja niillä havaittiin olevan TGF:ää virtsassa edellä lueteltujen biologisten ja biokemiallisten ominaisuuksien perusteella, kun taas käsittelemättömillä rotilla ei ollut.

#### Esimerkki IV

##### Rotan TGF:n synteesi ja karakterisointi

Rotan TGF:n (rTGF), jolla oli esimerkissä II annettu kemiallinen kaava, kemiallinen synteesi suoritettiin käsin vaiheittaisella kiinteäfaasimenetelmällä Merrifield'in, J. Amer. Chem. Soc. 85 (1963) 2149 - 2156, selostamien yleisten periaatteiden mukaisesti. Differentiaalinen happolabiili suojaryhmä -strategiaa sovellettiin tähän synteisiin yhdessä N-aminopään tert.-butyylioksykarbonyylin ja sivuketjujen bentsyylialkoholijohdannaisten tavanomaisen yhdistämisen kanssa. Paremmiin happoa kestävä bentsyyliesterisidontaa, joka kiinnitti suojatut aminohapot polymeerikantajaan, käytettiin peptidihäviöiden minimoimiseksi toistuvien happokäsittelyjen aikana (Mitchell et al., J. Amer. Chem. Soc. 92 (1976) 7357 - 7362). Täydellinen suojauksen purkaminen ja peptidin poistaminen hartsista tapahtuivat Tam et al.'in, Tetrahedron Lett. 23 (1982) 4435 - 4438, Low-High HF -menetelmän mukaisesti, joka poikkesi tavanomaisesta HF -suojauksenpurkumenetelmästä ja poisti bentsyyli-suojaryhmät  $S_N2$ -mekanismilla laimeassa HF-liuoksessa vakavien sivureaktioiden minimoimiseksi, jotka aiheutuvat hiilikationeista, joita kehittyy tavanomaisessa  $S_N1$ -suojauksenpurkumenetelmässä. Lisäksi se on myös suunniteltu vähentämään monia kysteinyyli-sivureaktioita, jotka usein estävät monia disulfidisidoksia sisältävien proteiinien, synteessin.

HF-käsittelyn jälkeen ja ennen mitään puhdistamista raaka ja pelkistetty synteettinen rTGF hapetettiin ja regeneroitiin seka-disulfidi-menetelmällä pelkistetyn ja

hapetetun glutationin yhdistelmän läsnäollessa (Ahmed et al., J. Biol. Chem. 250 (1975) 8477 - 8482). Tällä vältettiin polymeeristen ainesten muodostuminen puhdistamisen aikana. Regeneroitu, puhdistamaton rTGF-I sisälsi 40-50 %  
5 EGF-radioreseptoria ja tyrosiinispesifisiä proteiinkinasiaktiivisuuksia verrattuna luonnon-rTGF-I:een. Raaka syntetettinen rTGF puhdistettiin homogeenisyyteen kolmessa vaiheessa: (1) geelisuodatuksella Bio-Gel P-10 -pylväällä; (2) ioninvaihtokromatografialla CM-Sephadex-pylväällä; ja  
10 (3) preparatiivisella korkeapainenestekromatografialla (HPLC) C-18-käänteisfaasikolonnilla. Kokonaissaanto laskettuna Ala:n lähtömäärästä hartsiin oli 31 %.

Pelkistävässä tai pelkistämättömissä olosuhteissa puhdistetun synteettisen rTGF:n havaittiin antavan yhden  
15 ainoan nauhan, jonka näennäinen molekyylipaino oli 7 000 SDS-PAGE-elektroforeesilla. Aminohappoanalyysi 6 mol/l HCl:lla ja entsymaattisella hydrolyysillä antoivat ehdotetun sekvenssin odotetun teoreettisen moolisuhteen. Vaapaata tiolia ei havaittu Ellman'in sulfhydryylin määritysmenetelmällä synteettisestä rTGF:stä, mutta tiolyttisesti  
20 pelkistettäessä saatiin kuuden kysteiinin odotettu teoreettinen arvo. Nämä havainnot tukevat sitä johtopäätöstä, että synteettinen rTGF on yksiketjuinen polypeptidi, joka sisältää kuusi kysteiiniä disulfidisidoksissa, mikä on  
25 sopusoinnussa luonnon rTGF:n odotettujen kemiallisten ominaisuuksien kanssa. Lisäksi synteettinen rTGF eluoitui yhdessä luonnon rTGF:n kanssa yhtenä ainoana symmetrisenä huippuna C-18-käänteisfaasi-HPLC:ssä.

Tämän esimerkin mukaista synteettistä rTGF:ää verrattiin luonnon rTHF:ään kolmessa analyysissä otaksutun  
30 muuntokasvutekijän biologisten ominaisuuksien suhteen. Mitogeenianalyysissä normaalien rotan munuaissolujen, joista seerumi oli poistettu, kasvun stimuloitumista rTGF:llä mitattiin yhdistämällä <sup>125</sup>I-jodideoksiuridiinia. Analyysissä  
35 pehmytagarilla naudan seerumin albumiinin ja toisen

TGF:n, TGF-beetan, läsnäollessa rTGF:n aiheuttamat morfologiset ja fenotyypin muutokset voitiin määrittää kvantitatiivisesti pesäkkeenmuodostuksella pehmytagariin. Jälkimmäisen muuntoanalyysin on osoitettu korreloivan hyvin kasvaimien syntymisen kanssa (Stoker et al., Int. J. Cancer 3 (1968) 683 - 693). Naudan sikiön seerumi tai TGF-beeta eivät yksinään indusoi NRK-solujen muuntumista viljelyssä. Samoin ei luonnollinen eikä synteettinen TGF saa aikaan tällaista vaikutusta TGF-beetan poissaollessa. Sekä synteettinen että luonnon rTGF antoivat samanlaiset annosvasteikäyrät sekä puolimaksimaaliset aktiivisuudet näissä kahdessa analyysissä.

Koska rTGF kilpailee mEGF:n kanssa EGF-reseptorien sitomisesta solukalvoilla, synteettistä rTGF:ää verrattiin luonnon rTGF:ään sitoutumisen suhteen ihmisen A431-syöpäsoluihin. Jälleen luonnon ja synteettisen rTGF:n vasteen ja aktiivisuuksien havaittiin oleva toisistaan erottumattomia. Väkevyyden, joka tarvitaan <sup>125</sup>I-EGF:n sitoutumisen estämiseen 50-%:isesti, havaittiin olevan 3,5 ja 4,1 nM luonnon ja vastaavasti synteettiselle rTGF:lle. Eräs seuraus TGF:n tai EGF:n sitoutumisesta EGF-membraanireseptoreihin on synteettisten peptidien tai endogeenisten substraattien tyrosiinitähteiden fosforyloitumisen stimuloituminen (Pike et al., J. Biol. Chem. 257 (1982) 14 628 - 14 631). Synteettisen rTGF:n havaittiin stimuloivan synteettisen angiotensinyyli-peptidisubstraatin fosforylointia puolimaksimaalisella aktiivisuudella 0,3 nM, joka aktiivisuus oli verrannollinen luonnon rTGF:llä saatuun arvoon, jonka Reynold et al., Nature 292 (1981) 259 - 261, ovat esittäneet.

#### Esimerkki V

#### Haavojen parantaminen TGF:ien avulla

Ihmisen EGF:ää (hEGF), rotan TGF:ää (rTGF), ihmisen TGF:n analogia, luonnon vacciniaviruskasvutekijää (VGF) ja yhdistelmä-VGF:ää käytettiin haavan parannuskokeessa, joka

tehtiin jäljempämä kuvattua menetelmää noudattaen, kunkin tekijän parantavien vaikutusten määrittämiseksi toisen asteen palovammaan. Rotan TGF syntetisoitiin edellä esimerkissä IV kuvatulla tavalla, ja sen kemiallinen kaava oli esimerkissä II esitetyn kaavan mukainen. Ihmisen TGF-analogilla, joka valmistettiin tavanomaisia rekombinaatiomenetelmiä käyttäen, oli seuraava aminohapposekvenssi:

5  
Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Asp-Cys-Pro-Asp-Ser-His-Thr--  
15 20 25  
10 Gln-Phe-Cys-Phe-His-Gly-Thr-Cys-Arg-Ser-Leu-Val-Gln--  
30 35  
Glu-Glu-Lys-Pro-Ala-Cys-Val-Cys-His-Ser-Gly-Phe-Val--  
40 45 50  
Gly-Val-Arg-Cys-Glu-His-Ala-Asp-Leu-Leu-Ala

Luonnon VGF puhdistettiin jäljempänä esimerkissä XII kuvattavalla tavalla. Myös yhdistelmä-VGF valmistettiin käyttämällä tavanomaista yhdistelmä-DNA-tekniikkaa. Luonnon VGF on 25 kilodaltonin (kD) proteiini, joka sisältää seuraavan aminohapposekvenssin.

20 Leu-Cys-Pro-Glu-Gly-Asp-Gly-Tyr-Cys-Leu-His-Gly-Asp-  
15 25  
Cys-Ile-His-Ala-Arg-Asp-Ile-Asp-Gly-Met-Thr-Cys-Arg-  
30 35  
Cys-Ser-His-Gly-Tyr-Thr-Gly-Ile-Arg-Cys-Gln-His-Val-  
40  
Val-Leu-Val

25

Jäljempänä esimerkissä XII kuvattavalla tavalla puhdistetun (ja yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetun) VGF-molekyylin koko aminohapposekvenssi on seuraava:

30

35

35

Taulukko II

|    |                       |                         |                                                      |                                                |                   |                   |
|----|-----------------------|-------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|    |                       |                         |                                                      | <u>Luonnon VGF <math>\mu\text{g/ml}</math></u> |                   |                   |
| 5  | Oikea puoli           | <u>Silvadene</u><br>15% | <u>Hoitamaton</u><br>0%                              | <u>0,1</u><br>70%                              | <u>0,1</u><br>65% |                   |
|    | Sika 1                |                         |                                                      |                                                |                   |                   |
|    | 9 vrk polton jälkeen  |                         |                                                      | <u>hEGF <math>\mu\text{g/ml}</math></u>        |                   |                   |
|    | Vasen puoli           | <u>Silvadene</u><br>75% | <u>Hoitamaton</u><br>55%                             | <u>0,1</u><br>60%                              | <u>0,1</u><br>70% | <u>0,1</u><br>30% |
| 10 |                       |                         |                                                      |                                                |                   |                   |
|    |                       |                         | <u>Yhdistelmä-VGF <math>\mu\text{g/ml}</math></u>    |                                                |                   |                   |
|    | Oikea puoli           | <u>Silvadene</u><br>50% | <u>Hoitamaton</u><br>0%                              | <u>0,1</u><br>95%                              | <u>0,5</u><br>95% | <u>1,0</u><br>60% |
|    | Sika 2                |                         |                                                      |                                                |                   |                   |
| 15 | 10 vrk polton jälkeen |                         |                                                      |                                                |                   |                   |
|    | Vasen puoli           | <u>Silvadene</u><br>50% | <u>Hoitamaton</u><br>0%                              | <u>0,1</u><br>60%                              | <u>0,5</u><br>75% | <u>1,0</u><br>40% |
|    |                       |                         |                                                      |                                                |                   |                   |
|    |                       |                         | <u>Rotan TGF <math>\mu\text{g/ml}</math></u>         |                                                |                   |                   |
| 20 | Oikea puoli           | <u>Silvadene</u><br>20% | <u>Hoitamaton</u><br>15%                             | <u>0,1</u><br>90%                              | <u>0,5</u><br>65% | <u>1,0</u><br>90% |
|    | Sika 3                |                         |                                                      |                                                |                   |                   |
|    | 9 vrk polton jälkeen  |                         | <u>Ihmis-TGF-analogi <math>\mu\text{g/ml}</math></u> |                                                |                   |                   |
|    | Vasen puoli           | <u>Silvadene</u><br>25% | <u>Hoitamaton</u><br>5%                              | <u>0,1</u><br>90%                              | <u>0,5</u><br>85% | <u>1,0</u><br>65% |

25

Kuten taulukosta II ilmenee, TGF:t olivat hyvin tehokkaita haavan parantamisessa verrattuina hoitomatto-miin vertailunäytteisiin ja jopa pelkkään Silvadeneen.

Esimerkki VI

30

Haavojen parantaminen

35

Tehtiin toinen koe, jonka tarkoituksena oli mitata edellä kuvatun ihmis-TGF-analogin vaikutusta toisen asteen palovammojen paranemiseen. Koeolosuhteet olivat edellä kuvattujen kaltaiset. Menetelmiin tehtiin kuitenkin seuraavat muutokset. Yksi Yorkshire-porsas nukutettiin Ketami-

nella ja kukin 12:sta palovammasta tehtiin käyttämällä messinkikappaletta 11 s/poltto. Kun kukin rakkula oli poistettu, haavoja hoidettiin kerran vuorokaudessa yhdellä seuraavista aineista:

- 5           a) 1 µg/ml TGF:ää Silvadenessa;  
             b) 0,1 µg/ml TGF:ää Silvadenessa;  
             c) ei mitään;  
             d) pelkkä Silvadene;  
             e) 1 µg/ml hEGF:ää Silvadenessa; ja  
 10          f) 0,1 µg/ml hEGF:ää Silvadenessa.

Rupi poistettiin 7 vrk:n kuluttua. Vamman prosentuaalinen paraneminen, joka laskettiin planimetriatulok-  
 sista, esitetään alla olevassa taulukossa. TGF oli hyvin  
 tehokas vamman parantajana.

15

Taulukko III

| <u>Hoito</u>       | <u>Parantuneen vamman prosenttiosuus</u>  |
|--------------------|-------------------------------------------|
|                    | <u>Palovamma A</u> <u>Palovamma B</u>     |
| TGF 1 µg/ml        | 9                                      26 |
| 20   TGF 0,1 µg/ml | 34                                    57  |
| Hoitamaton         | 3                                      6  |
| Silvadene          | 14                                    21  |
| hEGF 1 µg/ml       | 14                                    17  |
| hEGF 0,1 µg/ml     | 17                                    14  |

25

Esimerkki VII

Sarveiskalvovamman parantaminen rTGF:llä

A. rTGF-polyeptidin valmistaminen

30   TGF-polyeptidi syntetisoitiin käyttäen lähtökohtana aminohapposekvenssiä, joka esitettiin edellä esimerkis-  
 sä II TGF:lle, joka oli puhdistettu kissan sarkoomaviruk-  
 sella transformoitujen Fisher-rotan alkiofibroblastien  
 kasvualustasta. rTGF:n kemiallinen synteesi toteutettiin  
 edellä esimerkissä IV kuvatulla tavalla.

35

### B. Hoitoformulan valmistus

rTGF- $\alpha$ -polypeptidiä lisättiin isotoniseen (285 mosmol), steriiliin, fosfaattipuskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (pH 7,4) pitoisuudeksi 50 ng/ml.

### 5 C. Sarveiskalvoperuskudoksen puhkaisut

Kalvon kokonaan läpäisevät 5 mm:n pituiset aukot, jotka ulottuivat etukammioon asti koko pituudeltaan, tehtiin aikuisten naaraspuolisten Macaca fascicularis -apinoiden sarveiskalvon keskelle. Oikea silmä toimi vertailukohteenä ja sitä käsiteltiin kolmesti vuorokaudessa kahdella pisaralla isotonista (285 mosmol) steriiliä fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (pH 7,4), joka ei sisältänyt rTGF:ää. Vasenta silmää hoidettiin samaa ohjelmaa noudattaen edellä kuvatulla hoitoformulalla. Kolmen vuorokauden hoidon jälkeen haavojen lujuus mitattiin kvantitatiivisesti sijoittamalla pienireikäinen neula (n:o 25) etukammioon sarveiskalvon reunuksen kautta. Neula kytkettiin aneroidi-

10 manometriin ja painetta nostettiin hitaasti ja tasaisesti, kunnes haavat alkoivat vuotaa ja lopulta aukesivat. Tämän menetelmän on kuvannut yksityiskohtaisesti Weene (Anal. Ophthalmol. 15 (183) 438).

### 15 D. Tulokset

Taulukossa IV esitetyt tulokset osoittavat, että TGF-käsiteltyjen sarveiskalvojen puhkaisulujuus oli merkittävästi suurempi kuin fysiologisella suolaliuoksella käsiteltyjen sarveiskalvojen.

Taulukko IV

|               | paine (mm/Hg)              |                   |                                     |                   |
|---------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|
|               | <u>Oikea vertailusilmä</u> |                   | <u>TGF:llä hoidettu vasen silmä</u> |                   |
|               | <u>Vuoto</u>               | <u>Aukeaminen</u> | <u>Vuoto</u>                        | <u>Aukeaminen</u> |
| 30 Apina P-21 | 25                         | 30*               | 210                                 | 225*              |
| Apina P-20    | 35                         | 90*               | 155                                 | >300*             |

35 \*t = 40,0, p >0,025, parillinen T-testi

TGF:n toteaminen monospesifisellä, synteettistä  
ä vastaan muodostetulla antiseerumilla

5           Peptidit, jotka vastaavat aminohappoja osista rTGF-  
aminohapposekvenssiä, jotka kuvattiin edellä esimerkissä  
II, syntetisoitiin kaupallisesti (Peninsula Labs) tavan-  
omaisella kiinteäfaasimenetelmällä (Ohgak et al., Journal  
of Immunol. Meth. 57 (1983) 171 - 184). Peptidit puhdis-  
0       tettiin tarpeen vaatiessa käänteisfaasikorkeapaineneste-  
kromatografialla (RP-HPLC:llä) ennen käyttöä.

Peptidi I - Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Lys-Cys-  
Pro-Asp-Ser-His-Thr

Peptidi III - Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Val-  
Arg-Cys-Glu-His-Ala-Asp-Leu-Leu-Ala

## Peptidien konjugointi ja immunisointi

Kaniinit immunisoitiin injektoimalla ihon alle 1 mg  
attia neljään eri kohtaan. Ensimmäisen injektion  
annettiin kaksi tehostetta kahden viikon väli-  
Tässä kokeessa käytetty seerumi kerättiin 80 vrk:n

kuluttua ensimmäisestä injektioista. Tästä seerumista pre-  
paroiitiin immunoglobuliinifraktio ammoniumsulfaattisaos-  
tuksella. Immunisoivalle peptidille spesifistä vasta-ai-  
netuotetta seurattiin kiinteäfaasi-ELISA:lla.

5           Peptidien leimaus radioaktiivisella jodilla

Peptidit leimattiin  $\text{Na}^{125}\text{I}$ :lla käyttämällä kloramii-  
ni-T-menettelyä, joka oli oleellisilta osiltaan Dasin et  
al.'in kuvaaman menettelyn mukainen [Proc. Natl. Acad.  
Sci. 74 (1977) 2790-2794]. Liuoksiin, jotka sisälsivät  
10 hiiren leuanalussylikirauhas-EGF:ää (mEGF) (170 pmol), syn-  
teettistä rTGF:ää (4 pmol) tai peptidiä III (400 pmol),  
sekoitettiin 1 - 2 mCi  $\text{Na}^{125}\text{I}$ :a (Amersham 2 mCi/nmol) 2 M  
kaliumfosfaatissa (pH 7,5). Lisättiin 50 - 100 µg klor-  
amiini-T:tä ja jatkettiin inkubointia lämpötilassa 4 °C 1  
15 min (mEGF ja rTGF) tai 7 min (peptidi III). Reaktiot py-  
säytet-tiin lisäämällä 10 - 20 µg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ :a ja leimatut pro-  
teiinit erotettiin reagoimattomasta  $\text{Na}^{125}\text{I}$ :sta kromatografi-  
sesti Sephadex G-10:llä (Pharmacia). Tällä tavalla leimat-  
tujen peptidien ominaisaktiivisuudet olivat:  $1 \times 10^{10}$   
20 cpm/nmol (EGF);  $6 \times 10^8$  cpm/nmol (rTGF); ja  $1 - 10^9$   
cpm/nmol (peptidi III).

Radioreseptorimäärittäminen

$^{125}\text{I}$ -EGF:n sitoutuminen reseptoriinsa formaliinilla  
kiinnitettyjen A431-solujen yksisolukerroksilla mitattiin  
25 edellä esimerkissä I kuvatulla tavalla.  $^{125}\text{I}$ -EGF:ää lisät-  
tiin loppupitoisuudeksi 0,33 nmol/l kilpailevien aineiden  
läsnä tai poissa ollessa. Leimaamattoman EGF:n lisääminen  
pitoisuudeksi 0,3 - 0,5 nmol/l johti puoleen  $^{125}\text{I}$ -EGF:n si-  
toutumisen maksimi-inhibitioista. TGF-pitoisuudet ilmoitet-  
30 tiin määränä, joka vaaditaan saamaan aikaan tunnettua TGF-  
määrää vastaava  $^{125}\text{I}$ -EGF:n sitoutumisen esto.

RIA (radioimmuunianalyysi)

Reagenssit sekoitettiin 50 mikrolitran lopputila-  
vuudessa liuosta, joka sisälsi 20 mmol/l natriumfosfaattia  
35 (pH 7,4), 200 mmol/l NaCl:a, 40 mmol/l ditiotreitolia,

0,1 % (w/v) BSA:ta, 0,1 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ :a,  $^{125}\text{I}$ -peptidi III:a ( $10^4$  cpm); lopullista laimennusastetta 1/15000 vastaavan määrän antiseerumia, ja muita aineita ilmoitettaessa.

Reaktio käynnistettiin lisäämällä antiseerumi ja sen annettiin jatkua lämpötilassa 23 °C 90 min. Sitten lisättiin yhtä suuri tilavuus 10-%:isella formaliinilla kiinnitettyä *Staphylococcus A* -valmistetta (Pansorbin, Calbiochem) ja jatkettiin inkubointia vielä 30 min lämpötilassa 23 °C. Immunoabsorbantti poistettiin sedimentoimalla 10-%:isen (w/v) sakkaroosiliuoksen läpi, ja sitoutuneen  $^{125}\text{I}$ -peptidi III:n määrä määritettiin käyttämällä gammalaskuria. Näissä olosuhteissa vasta-aine sitoi noin 25 %  $^{125}\text{I}$ -peptidistä kilpailijan poissa ollessa. Sitoutuneen peptidi III:n määrä korjattiin epäspesifisen sitoutumisen suhteen, joka mitattiin vasta-aineen poissa ollessa (alle 5 % kokonaissitoutumisesta) ja ilmoitettiin prosentteina maksimisitoutumisesta. Kilpailijoiden pitoisuudet ilmoitettiin siinä määränä peptidi III:a, joka tarvittiin saamaan aikaan vastaava saostumisen esto.

#### 20 Kromatografia

Geelisuodatuskromatografia tehtiin valmistajan ohjeiden mukaan Bio Gel P-10 -kolonneilla (BioRad), jotka tasapainotettiin 1 N etikkahapolla. HPLC tehtiin Novapak  $\text{C}_{18}$  -kolonnilla (0,39 x 10 cm, Waters Associates) käyttämällä virtausnopeutta 1 ml/min lämpötilassa 23 °C.

#### 25 Käsitellyn alustan valmistus

Snyder Theilen -transformoitujen Fischer -rotan alkiosolujen (ST-FrSV-RFE klooni 10) seerumiton modifioitu alusta kerättiin Twardzikin et al. kuvaamalla tavalla [Virology, 124 (1983) 201 - 207]. Kasvualusta selkeytettiin sentrifugoimalla pienellä nopeudella ja kylmäkuivattiin. Jäännös suspendoitiin sitten 1 N etikkahappoon ja dialysoitiin perusteellisesti 0,1 N etikkahappoa vastaan. Liukenematon proteiini poistettiin sentrifugoimalla, ja supernatantti kylmäkuivattiin. Lopuksi jäännös suspendoitiin

takaisin sadasosatilavuuteen alkuperäisestä 1 N etikkahappoa ja säilytettiin lämpötilassa 4 °C.

#### Immunoblotting-analyysi

5 Analysoitaville näytteille tehtiin ensin natrium-dodekyyli-sulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE) käyttäen akryyliamidigradienttia 15 -> 20 % ja elektroforeesi ajettiin pelkistävässä olosuhteissa Laemm-  
lin kuvaamalla tavalla [Nature 227 (1970) 680-682]. Erot-  
tamisen jälkeen proteiinit siirrettiin elektroforeettises-  
10 ti nitroselluloosalle (Schleicher and Schuell, BA85, 0,45  $\mu$ ) Burnetten kuvaamalla tavalla [Anal. Biochem. 112 (1981) 195 - 203]. Siirto tehtiin jännitteellä 5 V/cm 3 -  
4 tuntia 23 °C:ssa. Tuloksena olevaa proteiiniblottia in-  
kuboitiin yön yli maitopohjaisessa seoksessa BLOTTO [John-  
15 son et al., Gene Anal. Techn., 1 s. 3 - 8]. Antiseerumi laimennettiin BLOTTO:lla ja lisättiin blottiin peptidi III -ylimäärän läsnä tai poissa ollessa. Inkubointia vasta-  
aineen kanssa jatkettiin usein sekoittaen 2 - 3 tuntia lämpötilassa 23 °C. Sitten blotti pestiin, sitä inkuboi-  
20 tiin  $^{125}$ I-proteiinin kanssa ( $4 \times 10^6$  cpm/ml,  $4 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g) 1 tunti lämpötilassa 23 °C, ja pestiin BLOTTO:lla. Vasta-  
aineen sitoutumiskohdat visualisoitiin tekemällä autora-  
diografia Kodak XAR-5 -filmille lämpötilassa -70 °C käyt-  
tämällä kuvanvahvistuslevyjä.

25 Edellä kuvatun radioimmuunianalyysin yhteydessä li-  
sätty  $^{125}$ I-peptidi III saostui lähes kvantitatiivisesti an-  
tiseerumin laimennusasteen ollessa pieni; antiseerumille  
saatiin tiitteri > 10 000. Vasta-aineaffiniteetti mitat-  
tiin inkuboimalla antiseerumia suhteessa 1/5000 laimennet-  
30 tuna vaihtelevien  $^{125}$ I-peptidi III -pitoisuuksien läsnä ol-  
lessa. Näiden tulosten analysointi Scatchardin menetel-  
mällä antoi tulokseksi yhden ryhmän sitoutuvaa/sitoutuvia  
komponenttia/komponentteja, jonka affiniteettivakio ( $K_a$ )  
125 I-peptidi III:n suhteen oli  $8,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ .

RIA:n spesifisyys

RIA:n spesifisyyden määrittämiseksi tutkittiin erilaisista peptideistä niiden kyky estää  $^{125}\text{I}$ -peptidi III:n saostuminen. Leimaamaton peptidi III esti  $^{125}\text{I}$ -peptidi III:n saostumisen suurin piirtein lineaarisesti alueella 0,13-11 nmol/l; leimaamattoman peptidi III:n pitoisuus, joka sai aikaan puolet saostumisen maksimi-inhibitiosta, oli 0,7 nmol/l. Peptidi IV oli vain hieman tehottomampi saostumisen estäjänä kuin peptidi III, kun taas peptidi II oli täysin tehoton pitoisuuksiin 1,1  $\mu\text{mol/l}$  asti. Myös peptidi I, joka vastaa 11 aminotermiinalista ryhmää, oli tehoton kilpailijana. Nämä tulokset osoittavat, että tavanomaisissa koeolosuhteissa detektoitu epitooppi oli paikallistuneena peptidi III:n 11 karboksitermiinaliseen aminohappoon. Taulukossa V esitetään yhteenveto eri peptidien suhteellisista inhiboivista pitoisuuksista.

Taulukko V

|    | <u>Lisäys</u>        | <u>Suhteellinen inhibointiaktiivisuus</u> |
|----|----------------------|-------------------------------------------|
| 20 | peptidi III          | 1                                         |
|    | peptidi IV           | 3,5                                       |
|    | peptidi I            | > 1500                                    |
|    | peptidi II           | > 1500                                    |
|    | rTGF 0 ditiotreitoli | 1                                         |
| 25 | rTGF - ditiotreitoli | 20                                        |
|    | mEGF                 | > 1500                                    |

Ilmoitetuista lisätyistä aineista tutkittiin niiden kyky estää standardi-RIA edellä kuvatulla tavalla. Kullekin lisätylle aineelle määritettiin pitoisuus, joka tarvittiin saamaan aikaan puolet saostumisen maksimi-inhibitiosta, ja se ilmoitetaan suhteessa peptidi III -pitoisuuteen, joka vaaditaan saamaan aikaan vastaava inhibitio. Merkintä ">" osoittaa suurimman tutkitun pitoisuuden. (Peptidien I-IV inhibitioaktiivisuuteen ei vaikuttanut ditiotreitolin läsnäolo määrityksessä.)

Myös rTGF:n kyky estää  $^{125}\text{I}$ -leimatun peptidi III:n saostuminen tutkittiin. Synteettinen rTGF, joka vastasi biologiselta aktiivisuudeltaan täysin luontaista molekyyliä, oli yhtä tehokas (molaarisen pitoisuuden perusteella arvioituna) inhibiittorina kuin peptidi III. rTGF:n suhteellinen inhibitiokapasiteetti aleni merkittävästi, kun pelkistin jätettiin pois reaktioseoksesta (taulukko). mEGF oli täysin tehoton kilpailijana pitoisuuksiin yli 1  $\mu\text{mol/l}$  asti. Tämä osoittaa, että tässä kuvattu RIA eroaa muista käytettävissä olevista TGF-määrittelyksistä siinä suhteessa, että se on spesifinen TGF:lle muttei EGF:lle.

Jotta osoitettaisiin suoraan, että antiseerumi sitoo rTGF:ää, korvattiin  $^{125}\text{I}$ -peptidi III  $^{125}\text{I}$ -leimatulla rTGF:llä tavanomaisessa RIA:ssa. Havaittiin annoksesta riippuva  $^{125}\text{I}$ -TGF:n saostuminen, jota esti oleellisesti ylimääräisen peptidi III:n lisääminen. Tällä tavalla saatujen sitoutumistulosten Scatchard-analyysi osoitti, että antiseerumin  $K_d$   $^{125}\text{I}$ -TGF:n suhteen oli  $2,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Tämä arvo sopii kohtuullisen hyvin yhteen  $^{125}\text{I}$ -peptidille III määritetyn  $K_d$ :n kanssa ( $8,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ), ja osoittaa, että antiseerumi sitoutuu rTGF:ään.

#### rTGF:n toteaminen transformoitujen solujen modifioidusta kasvualustasta

Eräs TGF-lähde on RNA-kasvainviruksilla transformoitujen solujen kasvualusta. rTGF:n toteamiseksi viljeltyjen transformoitujen solujen modifioidusta kasvualustasta käytettiin seuraavaa menettelyä. Kissan sarkoomaviruksen Snyder-Theilen -kannalla (ST-FeSV FRE kloonin 10) transformoidun Fischer-rotan alkiosolulinjan on aiemmin osoitettu tuottavan kohonneita määriä rTGF:ää [Gray et al., Nature 303 (1983) 722-725]. Kerättiin seerumiton modifioitu alusta, käsiteltiin se ja väkevöitiin edellä kuvatulla tavalla. Osalle alustasta tehtiin sitten geelisuodatuskromatografia Bio-Gel P-10:llä happamissa olosuhteissa. Fraktiosta analysoitiin rTGF EGF-reseptorikilpailumäärityksellä tai RIA:lla.

Näissä olosuhteissa havaittiin EGF:n kanssa kilpailevaa aktiivisuutta kahdessa molekyylikokoryhmässä, toinen noin  $M_r = 10\ 000$  ja toinen  $M_r = 20\ 000$ ; kummatkin molekyyllilajit eluoituivat selvästi näytteen proteiinin pääosan jälkeen. Kumpikin kokoluokka, jolla oli EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuus, oli myös immunologisesti aktiivinen. Immunologista aktiivisuutta havaittiin lisäksi kolonnin patsaan tilavuudessa, jossa ei havaittu EGF:n kanssa kilpailevaa aktiivisuutta. Nämä havainnot osoittavat, että edellä kuvatut rTGF-kokoryhmät ovat aktiivisia RIA:ssa. EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuuden suhde immunologiseen aktiivisuuteen pieneni voimakkaasti suurimolekyyllisissä TGF-fraktioissa, mikä osoittaa, että näiden TGF-molekyyllilajien biologinen aktiivisuus on pienempi kuin pienimolekyylisten fraktioiden.

Sen vahvistamiseksi, että immunologinen aktiivisuus esiintyi samassa molekyyllilajissa kuin EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuus, tehtiin RP-HPLC yhdistetyille fraktioille, jotka saatiin toistamalla tämä koe preparatiivisessa mittakaavassa ja jotka sisälsivät rTGF-kokoryhmät  $M_r = 10\ 000$  ja  $M_r = 20\ 000$ ; käytetyt olosuhteet olivat samantaiset kuin ne, joita käytettiin rTGF:n puhdistamiseen Marquardtin et al. mukaisesti [Proc. Natl. Acad. Sci., 80 (1983) 4684-4688]. Yhdistettyjen TGF-fraktioiden, joiden  $M_r$  oli  $10\ 000$ , ollessa kyseessä sekä EGF:n kanssa kilpaileva että immunologinen aktiivisuus puhdistuivat rinnakkain suurin piirtein kvantitatiivisella saannolla. Kummankin aktiivisuuden puhdistuminen rinnan sekä geelisuodatuskromatografiassa että HPLC:ssä viittasi vahvasti siihen, että kumpikin aktiivisuus esiintyy samassa molekyyllilajissa. Kun EGF:n kanssa kilpailevalle kokoryhmälle  $M_r = 20\ 000$  tehtiin HPLC, havaittiin samanlainen EGF:n kanssa kilpailevan ja immunologisen aktiivisuuden rinnakkaispuhdistuminen. Nämä kokeet osoittavat, että suuri osa immunologisesta aktiivisuudesta, joka havaittiin St-FeSV-FRE-kloonin 10 käsitellyssä kasvualustassa, oli rTGF:n aiheuttamaa.

### Eri rTGF-kokoryhmien immunoblotting-analyysi

Retroviruksilla transformoitujen rotan solujen käsitellessä alustassa esiintyvät suuremmat TGF-kokoryhmät voisivat edustaa joko aggregoituneita tiloja tai TGF-molekyylin erillisiä molekyylimuotoja. Näiden kahden vaihtoehdon erottamiseksi toisistaan tehtiin synteettiselle rTGF:lle ja luonnon TGF:n kokoluokille  $M_r = 10\ 000$  ja  $M_r = 20\ 000$  immunoblottinganalyysi, kun polypeptidikomponentit oli erotettu SDS-PAGE:lla pelkistävässä olosuhteissa. Immuunireaktiivinen synteettinen rTGF ja pienimolekyylinen luonnon rTGF liikkuivat rinnakkain kumpikin yhtenä polypeptidiketjuna, jonka  $M_r$  oli  $6\ 000$ , ja antiseerumin inkubointi peptidi III -ylimäärän kanssa salpasi näiden molekyylien immunologisen reaktiivisuuden. Suurimolekyylinen kokoluokka sitä vastoin sisälsi kolmea immuunireaktiivista peptidiä,  $M_r = 24\ 000$ ,  $M_r = 40\ 000$  ja  $M_r = 42\ 000$ ; peptidi III -ylimäärän lisääminen salpasi myös näiden peptidien immunologisen reaktiivisuuden. Kaikissa kaistoissa havaittiin radioaktiivinen vyöhyke, jonka liikkumisnopeus vastasi  $M_r$ :a  $43\ 500$ . Peptidi III -ylimäärän lisääminen poisti epätäydellisesti tämän materiaalin, ja se havaittiin yhtäläisesti kaikissa kokeissa analysoitavasta näytteestä riippumatta; siksi se näyttää edustavan kokeessa muodostunutta keinotekoista tuotetta. On huomionarvoista, ettei suurimolekyyllisessä kokoluokassa havaittu TGF:ää, jonka  $M_r = 6000$ . Nämä tulokset osoittavat, että suurempimolekyylliset rTGF-kokoluokat edustavat erillisiä TGF:n muotoja.

### Esimerkki IX

Synteettinen rTGF-fragmentti, joka sitoutuu reseptoreihin ja on antigeeninen

#### Peptidit

Hiiren leuanalussylykirauhasista eristettiin EGF uuttamalla  $1\ M\ HCl$ :lla, joka sisälsi  $1\ \%$  trifluorietikkahappoa (TFA),  $5\ \%$  muurahaishappoa ja  $1\ \%$   $NaCl$ :a, konsentroimalla Sep-Pak-kolonneilla (Waters) ja tekemällä RP-HPLC Bondapak C-18 -kolonneilla (Waters) Elson et al.'in

kuvaamalla tavalla [Biochemistry Int., 8 (1984) 427 - 43-5]. Luonnon rotta-TGF:n kokonaissynteesiä on kuvattu edellä esimerkissä IV.

Synteettiset peptidifragmentit valmistettiin 1 %  
5 divinyylibentseeniä sisältävällä kloorimetyyli-polystyreenihartsilla (Bio-Rad) käyttämällä Na-t-butoksikarbonyyli-suojausta. Peptideistä poistettiin suojaus ja ne irrotettiin hartsista käyttämällä HF:a tai, C-päästä suojattujen analogien ollessa kyseessä, peptidi irrotettiin ensin ammonolyysillä ( $\text{NH}_3/\text{MeOH}$ ). Raakapeptidit, joista oli poistettu suojaus, laimennettiin ja syklisoitiin disulfidimuotoon hapettamalla 0,01 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ :lla. Peptidiliuos laitettiin Bio-Rex 70 -kationinvaihtokolonnille, pestiin  $\text{H}_2\text{O}$ :lla (300 ml) ja eluoitiin AcOH-gradientilla ( $\rightarrow$  50 %). Peptidi puhdistettiin preparatiivisella HPLC:llä kolonnissa (2,5 x 100 cm Altex), joka oli täytetty Vydac 218TP C-18:lla, käyttäen eluenttina 20-%:ista  $\text{CH}_3\text{CN}$ -liuosta, joka sisälsi 0,03 mol/l  $\text{NH}_4\text{OAc}$ :a (pH 4,5) (10). Peptidit 1 ja 2 edustavat rTGF:n aminohapposekvenssejä 34 - 43, joilla on suojaamattomat tai vastaavasti suojatut päät (N Ac, C - amidi). Peptidi 3 on vastaavan hTGF-silmukan metyyliesteri (Ac-Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Ala-Arg-CysOMe), joka on valmistettu siirtotesteröinnillä hartsista (emäs/MeOH).  
20

#### Immunogeenin valmistus ja immunologinen määrittäminen

25 TGF-peptidi 1 liitettiin tulivuorikotilon hemosyaniinin (KLH) tai naudan seerumialbumiiniin tioli/maleimidisidoksella [King et al., J. Immunol. Methods 28 (1979) 201 - 206]. Kantaja-peptidikompleksit puhdistettiin geelisuodatuksella. Saatiin keskimäärin 60 mol peptidiä/l mol KLH:a ja 20 ml peptidiä/l mol BSA:a. Kaniinit immunisoi-  
30 tiin KLH:n ja peptidin 1 konjugaatilla injektoimalla useaan kertaan 2 mg proteiinia täydellisessä Freundin apuaineessa ihonalaisesti (s.c.) tai lihaksensisäisesti (i.m.). Kaniineille annettiin tehosteet kahden viikon väliajoin injektoimalla s.c. immunogeenia epätäydellisessä  
35 Freundin apuaineessa. Viiden tehosteen jälkeen kerätyn

antiseerumin IgG-fraktio käytettiin immunologisiin määrittä-  
tyksiin ja se leimattiin radionuklidilla käyttämällä  
Na<sup>125</sup>I:a (NEN) ja Enzymobeads-helmiä (Bio-Rad) siten, että  
laskentatuloksena oli  $4 \times 10^5$  cpm/ $\mu$ g proteiinia. 92-kuoppaiset  
5 polyvinyylikloridilevyt (Costar) päällystettiin liuoksel-  
la, joka sisälsi 200  $\mu$ g/ml BSA:n ja peptidin 1 konjugaat-  
tia, ja vastapäällystettiin fosfaattipuskuroidulla fysiolo-  
gisella suolaliuoksella, joka sisälsi 10 % normaalin  
kaniinin seerumia. Levyjä inkuboitiin 4 tuntia lämpötilas-  
sa 37 °C [<sup>125</sup>I]anti(KLH - peptidi 1)-IgG:n kanssa (50000  
10 cpm/syvennys) inhibiittorien läsnä tai poissa ollessa,  
pestiin ja tehtiin yksittäisille kuopille laskenta.

#### Radioreseptorimäärittäminen

Ihmisen epidermoidikarsinoomasoluja A-431 tai ih-  
15 misen esinahkafibroblasteja (HFF), jotka oli kerätty pri-  
maariviljelmistä, kasvatettiin yhtenäiseksi pinnaksi 24-  
kuoppaisissa ryhmämaljoissa (Costar) Dulbeccon minimialus-  
tassa (Dulbecco's minimal essential medium, DMEM, Gibco),  
joka sisälsi 10 % naudan sikiöseerumia (FCS, Hyclone). EGF  
20 leimattiin radiojodilla edellä kuvatulla tavalla pulssi-  
määrään  $4 \times 10^4$  -  $8 \times 10^4$  cpm/mg proteiinia. Soluja inku-  
boitiin lämpötilassa 4 °C 60 min DMEM:ssä (pH 7,4 20  
mmol/l Hepesiä), joka sisälsi 1 mmol/l [<sup>125</sup>I]-EGF:ää ja  
0,1 % BSA:ta, inhibiittoripeptidien läsnä ollessa. Solut  
25 pestiin kolmesti kylmällä puskuriliuoksella, hajotettiin  
0,1 N NaOH:lla, ja mitattiin soluihin kytkeytynyt radioak-  
tiivisuus (gammalaskuri). Epäspesifinen sitoutuminen, jo-  
ka määritettiin 100-kertaisen ylimäärän kylmää EGF:ää läs-  
nä ollessa, oli alle 5 % ja alle 10 % spesifisestä sitou-  
30 tumisesta A431-soluille ja vastaavasti HFF-soluille.

#### Solujen proliferaatiomäärittäminen

HFF-soluja kasvatettiin yhtenäiseksi kerrokseksi  
48 kuoppaisissa ryhmämaljoissa DMEM:ssä, joka sisälsi 10 %  
FCS:a, ja lisääntyminen pysäytettiin pitämällä soluja 2  
35 vrk ravintovajauksessa DMEM:ssä, joka sisälsi 0,5 % FCS:a.  
Mitogeeneja ja peptideja inkuboitiin solujen kanssa lämpö-

tilassa 37 °C 18 tuntia ennen 4 tunnin käsittelyä 1  $\mu$ Ci:llä [<sup>3</sup>H]-metyylitymidiiniä (NEN) ja määritettiin trikloorietikkahapolla saostuva radioaktiivisuus.

5 KLH:n ja peptidin 1 konjugaattia vastaan muodostetut kaniinin vasta-aineet reagoivat BSA-TGF-peptidin kanssa kiinteäfaasi-RIA:n mukaan. Tätä reaktiota inhiboi konsentraatiosta riippuvalla tavalla peptidi 1 ja hieman vähemmän luonnon TGF. EGF ei sitä vastoin aiheuttanut merkittävää inhibitiota.

10 Rotan TGF syrjäyttää kompetitiivisesti EGF:n sitoutumisen reseptoreihinsa. TGF-peptidien kyky kilpailla [<sup>125</sup>I]-EGF:n kanssa sitoutumisesta joko A-431-soluihin tai HFF-soluihin arvioitiin. Peptidi 1 esti osittain [<sup>125</sup>I]-EGF:n sitoutumisen A-431-soluihin pitoisuuden ollessa  
15  $> 10^{-6}$  mol/l. Peptidien 2 ja 3 kyky estää sitoutumista oli parempi; IC<sub>50</sub>-arvot olivat  $4 \times 10^{-6}$  mol/l ja vastaavasti  $4 \times 10^{-7}$  mol/l (ts. noin 0,02 ja 0,2 % EGF:n tai TGF- $\alpha$ :n sitoutumistehosta). Samanlaisia havaintoja tehtiin EGF:n inhibitiosta HFF-soluilla (taulukko VI). Näiden vuorovaikutusten reseptorispesifisyyttä valaisee näiden peptidien kyvyttömyys estää endoteelisolukasvutekijän sitoutuminen  
20 tai mitogeeninen vaikutus HFF-soluihin (ei esitetä).

Millään TGF-peptideistä ei ollut luontaisia mitogeenisia ominaisuuksia pitoisuuteen  $10^{-5}$  mol/l asti inkuboitaessa niitä lisääntymättömien HFF-solujen kanssa (tuloksia ei esitetä). TGF-peptidit estivät kuitenkin pitoisuudesta riippuvalla tavalla DNA-synteesin indusoinnin lisääntymättömissä HFF-soluissa EGF:n vaikutuksesta. Nämä antagonistit olivat yhtä tehokkaita käytettäessä TGF:ää  
25 mitogeenina (taulukko VI). Samoin kuin sitoutumistehokin TGF-peptidien antagonistinen teho parani suljettaessa ami-  
30 no- ja karboksipääät.

## Taulukko VI

## Synteettisten TGF-fragmenttien biologinen aktiivisuus

| 5 |           | Mitogeneesiin esto <sup>b</sup> |                          |                          |                          |
|---|-----------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|   |           | Sitoutuminen <sup>a</sup>       | IC <sub>50</sub> (M)     | IC <sub>50</sub> (M)     |                          |
|   |           |                                 |                          | EGF                      | TGF <del>α</del>         |
|   |           | A-431                           | HFF                      |                          |                          |
|   | Peptidi 1 | $8 \pm 2 \times 10^{-5}$        | $6 \pm 2 \times 10^{-5}$ | $>10^{-5}$               | $>10^{-5}$               |
|   | Peptidi 2 | $4 \pm 2 \times 10^{-6}$        | $2 \pm 2 \times 10^{-6}$ | $5 \pm 2 \times 10^{-6}$ | $3 \pm 1 \times 10^{-6}$ |
|   | Peptidi 3 | $4 \pm 1 \times 10^{-7}$        | $3 \pm 1 \times 10^{-7}$ | $6 \pm 2 \times 10^{-7}$ | $5 \pm 3 \times 10^{-7}$ |

10

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub>-arvot laskettu inhibitiokäyrästä, jotka kuvaavat [<sup>125</sup>I]-EGF:n (1 nM) sitoutumista soluihin. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub>-arvot ovat pitoisuuksia, jotka alentavat puoleen vertailunäytteen kyvyn edistää [<sup>3</sup>H]-metyylitymidiniin ottoa lisääntymätömiin HFF-soluihin, jotka on indusoitu EGF:llä tai TGF:llä (1 nM).

15

## Esimerkki X

## TGF stimuloi luun resorptiota in vitro

20

Muuntavaa kasvutekijää sisältävät valmisteet puhdistettiin ihmisen melanoomasoluja sisältävästä käsitelystä alustasta ja ihmisen verihiutaleista esimerkissä I kuvatulla tavalla ja synteettinen rotan TGF valmistettiin edellä esimerkissä II kuvatulla tavalla. TGF-valmisteiden ja synteettisen TGF:n biologista aktiivisuutta seurattiin käyttämällä EGF-radioreseptorimäärittystä tai pehmytagarilla tapahtuvan pesäkkeenmuodostuksen avulla samoin esimerkissä I kuvatulla tavalla.

25

30

Synteettinen rotan TGF (MP = 5600) resorboi luuta pitoisuudesta riippuvalla tavalla. Pitoisuudet yli 2 ng EGF-ekvivalenttia/ml stimuloivat luun resorptiota kolmessa eri kokeessa. Synteettinen TGF vaati vähintään 72 tuntia stimuloidakseen luun resorptiota. Tässä suhteessa synteettinen muoto näyttää olevan samanlainen kuin EGF, joka resorboi luuta saman ajanjakson kuluessa tässä biologisessa kokeessa (Tashjian *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 85 (1978) 966).

35

Ihmisen melanoomasolulinjasta valmistetut osittain puhdistetut valmisteet, jotka sisälsivät suuri- ja pienimolekyyllisiä TGF:iä, tutkittiin myös luun resorptiokokeella. Sekä suurimolekyylliset (27 000 daltonia) että pienimolekyylliset (6 000 daltonia) muodot stimuloivat luun resorptiota. Suurimolekyylinen muoto stimuloi resorptiota 48 tunnin kuluessa, kun taas pienimolekyylinen muoto vaati 72 - 96 tuntia resorption stimulointiin, mikä on sama kuin rotan synteettisen TGF-I:n ja EGF:n vaatima aika (Tashjian, yllä)

Tulokset osoittavat, että TGF pystyy stimuloimaan luun resorptiota in vitro. Synteettistä rotan TGF:ää ja pienimolekyyllistä ihmisen TGF:ää sisältävät valmisteet käyttäytyivät samalla tavalla kuin EGF, sillä ne vaativat pitkäköjiä inkubointijaksoja resorption stimulointiin. Ne olivat tehokkaita noin yhtä kertaluokkaa pienempinä pitoisuuksina kuin EGF. Suurimolekyylinen ihmisen melanooma-TGF stimuloi luun resorptiota 48 tunnissa.

#### Esimerkki XI

Synteettisen muuntavan kasvutekijän aikaansaama luun resorption stimulointi in vitro

Synteettinen rotan TGF valmistettiin edellä esimerkissä IV kuvatulla tavalla. Proteiinin puhtaus varmistettiin natriumdodekyyli-sulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla, aminohappoanalyysillä ja RP-HPLC:llä. TGF-valmisteiden ja synteettisen TGF:n biologista aktiivisuutta seurattiin EGF-radioreseptorimäärityksen avulla (Todaro et al., Nature 264 (1976) 26). Luun resorptio määritettiin mittaamalla <sup>45</sup>Ca:n vapautuminen ennalta leimatuista rotan sikiön pitkistä luista. Tiineisiin rottiin injektoidiin 18. raskauspäivänä 200 µCi <sup>45</sup>Ca:a (Raisz, J., Clin. Invest., 44 (1975) 103). Emot tapettiin 19. raskauspäivänä ja sikiöt poistettiin. Värtsinä- ja kyynärluiden mineralisoituneet varret leikattiin vapaiksi ympäröivästä kudoksesta ja rustosta ja sijoitettiin elinlauteeseen. Luita inkuboitettiin BGJb-alustassa (Irvine Scientific) 24

tuntia 37 °C:ssa, kostutetussa atmosfäärissä, joka sisälsi 5 % CO<sub>2</sub>:a ja 95 % ilmaa, heikosti kompleksoituneen <sup>45</sup>Ca:n vaihtumisen mahdollistamiseksi. Sitten luita kasvatettiin 48 - 120 tuntia BGJb-alustassa, jota oli täydennetty 5 %:lla naudan sikiöseerumia (KC Biologicals), joka sisälsi vertailu- tai tutkittavia aineita. Luun resorbointiaktiivisuus mitattiin alustaan vapautuneen <sup>45</sup>Ca:n prosenttiosuutena kokonaismäärästä, ja ilmoitettiin käsitelty/vertailunäytesuhteena. Tilastollinen merkitsevyys määritettiin parittomille tuloksille tehdyllä Studentin testillä.

Synteettinen rotan TGF (molekyylipaino 5 600) stimuloi luun resorptiota pitoisuuksina yli 2 ng EGF-ekvivalenttia/ml pitoisuudesta riippuvalla tavalla kolmessa eri kokeessa. Synteettinen TGF ei aiheuttanut merkittävää luun resorboitumista luun viljelyn 48 ensimmäisen tunnin aikana, mutta stimuloi selvästi resorptiota seuraavien 3 vrk:n aikana. Tässä suhteessa TGF:n synteettinen muoto näyttää olevan samanlainen kuin EGF, joka resorboi luuta samanlaisen ajanjakson kuluessa tässä biologisessa kokeessa (Raisz, et al., Endocrinology 107 (1980) 270). TGF:n vaikutus luun resorptioon näytti olevan riippumaton prostaglandiinisynteesistä.

Koska rotan TGF resorboi luuta in vitro, tutkittiin myös ihmisvalmisteista, jotka sisälsivät TGF-aktiivisuutta, niiden vaikutus luuhun. Suuri- ja pienimolekyylistä TGF:ää sisältävät osittain puhdistetut valmisteet preparoitiin ihmisen melanoomasolulinjasta (Marquardt et al., J. Biol. Chem. 275 (1982) 5220). Nämä valmisteet puhdistettiin osittain happouutolla ja geelisuodatuskromatografialla. Sekä suurimolekyylliset (13 000) että pienimolekyylliset (6 000) muodot stimuloivat luun resorptiota. Suurimolekyylinen muoto stimuloi resorptiota 48 tunnissa, kun taas pienimolekyylinen muoto vaati 72 - 92 tuntia resorption stimulointiin, mikä on sama aika kuin rotan TGF:n ja EGF:n vaatima.

Esimerkki XII

Vacciniaviruksella infektoidut solut vapauttavat uutta polypeptidiä, joka on toiminnallisesti muuntavan ja ihokasvutekijän sukulaisaine

5 Cercopithecus-apinan munuaissolujen (BSC-1) yksi-  
kerrosviljelmiä pidettiin yllä naudan sikiöseerumilla  
(10 %) täydennetyssä Eagle'n väliaineessa. Vacciniavirusta  
(VV) (kanta WR) kasvatettiin Hela-soluissa ja puhdistet-  
tiin sedimentoimalla sakkaroositiheysgradientin läpi (Moss  
10 teoksessa Gene Amplification and Analysis, vol. 2., toim.  
Chirickjian ja Papis, Elsevier/North Holland, New York,  
1981, s. 253 - 266).

BSC-1-yksisolukerroksia inkuboitiin lämpötilassa  
37 °C puhdistetun viruksen kanssa Eaglesin perusalustassa,  
15 joka oli täydennetty naudan sikiön seerumilla (2 %). Solu-  
viljelmien supernatantit selkeytettiin sentrifugoimalla  
pienellä kierrosnopeudella ja kylmäkuivattiin. Jäännös  
suspendoitiin sitten 1 M etikkahappoon ja dialysoitiin  
perusteellisesti 0,2 M etikkahappoa vastaan. Liukenematon  
20 materiaali poistettiin sentrifugoimalla, supernatantti  
kylmäkuivattiin, suspendoitiin uudelleen 1 M etikkahap-  
poon, jota käytettiin sadasosa alkuperäisestä tilavuudes-  
ta, ja säilytettiin lämpötilassa 4 °C.

Geelisuodatus tehtiin Biol-Gel P-10 -kolonneilla  
25 (BioRad, Richmond, CA), jotka oli tasapainoitettu 1 M e-  
tikkahapolla). HPLC-loppupuhdistukseen käytettiin kahta  
sarjaan kytkettyä Bio-Sil TSK-250 -kolonnia (BioRad).

Eristetyllä materiaalilla, joka nimettiin V a c -  
ciniaviruksen kasvutekijäksi (VGF), oli edellä esimerkis-  
30 sä V esitetty aminohapposekvenssi.

Käytetty radioreseptorimäärittäminen oli edellä esimer-  
kissä I kuvatuskaltaisen. TGF- ja VGF-pitoisuudet ilmais-  
tiin määränä, joka tarvitaan saamaan aikaan tunnetun EGF-  
määrän kanssa ekvivalenttinen <sup>125</sup>I-EGF:n sitoutumisen esto.

35 Käytetty RIA oli edellä esimerkissä VIII kuvatuskaltaisen.

EGF:n kanssa kilpailevan aktiivisuuden esiintyminen  
VV:lla infektoidujen solujen kasvualustassa

Supernatantista, joka saatiin BSC-1-viljelmästä 24 tunnin kuluttua VV-infektioinnista, tutkittiin, sisältääkö  
5 se materiaalia, joka pystyy kilpailemaan <sup>125</sup>I-leimatun EGF:n kanssa sitoutumisesta runsaasti EGF-reseptoreita sisältäviin ihmisen ihokarsinoomasoluihin (A431). VV-infektoidut solut vapauttivat voimakkaan EGF:n kanssa kilpailevan aktiivisuuden, joka saa aikaan suurin piirtein täydellisen  
10 kyllätystilan (>10 ng) kokeessa, jossa käytettiin ainemäärää, joka vastasi 10 ng:aa 0,5 ml:sta viljelmänestettä suspendoitua materiaalia. Aktiivisuus nimettiin VV-kasvutekijäksi (VGF). (Valeinfektoidut BSC-1-vertailuviljelmät sitä vastoin sisälsivät hyvin vähän EGF:n kanssa  
15 kilpailevaa aktiivisuutta jopa pienimmän tutkitun laimennusasteen ollessa kyseessä.)

Seuraavien testien tarkoituksena oli tutkia VGF-tuotannon kinetiikkaa. Varhaisimpana tutkimushetkenä, 2 tuntia infektoinnin jälkeen, kasvualustassa esiintyi jo  
20 kasvaneita pitoisuuksia EGF:n kanssa kilpailevaa aktiivisuutta, mikä viittaa VGF:n nopeaan syntetisoitumiseen ja vapautumiseen. Tämän aktiivisuuden määrä oli korkeimmillaan viljelmäsupernatanteissa 12 tunnin kuluessa; 24 tunnin kuluttua määrä oli noussut vain hieman. Koska VV:n  
25 koodaama polypeptidi, jonka rakenne on homologinen EGF:n ja TGF:n kanssa, on varhaisen geenin tuote, seurattiin VGF-geenin ilmentymistä BSC-1-soluviljelmissä, joita käsiteltiin sytosiiniarabinosidilla (AraC) heti viruksen adsorboitumisjakson (1 tunti) jälkeen. AraC:n aiheuttama  
30 DNA-synteesin esto salpaa myöhäisten Vacciniageenien ilmentymistä, kun taas varhaisten geenien ilmentyminen ei häiriinny samalla tavalla. VGF:n tuotanto ei estynyt AraC:lla käsitellyissä viljelmissä, vaan lisääntyi ylikaksinkertaiseksi infektoiduihin vertailuviljelmiin nähden  
35 mitattuna 13 ja 24 tuntia infektoinnin jälkeen. VGF:n tuotantomäärä oli riippuvainen myös virusinokulaatista (tau-

lukko VII). Pesäkkeenmuodostusyksiköiden (PFU) suhteen soluihin ollessa 20:1, havaittiin viljelmäsupernatanteissa noin 3 ng-EGF-ekvivalenttia VGF:ää/ml 24 tunnin kuluttua infektoinnista. VGF-tuotanto oli verrannollinen infektoivien yksiköiden lukumäärään; BSC-1-viljelmissä, jotka infektoitiin määrillä 40 ja 80 PFU/solu havaittiin noin 6 ja vastaavasti 10 ng-EGF-ekvivalenttia tuotetta.

Taulukko VII: Infektoivan viruksen määrän vaikutus VGF:n vapautumiseen

| Virusmäärä<br>PFU/solu | Vapautunut VGF<br>EGF-ekvivalentteja<br>(ng/ml) |
|------------------------|-------------------------------------------------|
|                        |                                                 |
| -                      | 0                                               |
| 10                     | 2,7                                             |
| 20                     | 4,5                                             |
| 40                     | 6,1                                             |
| 80                     | 10,0                                            |

VGF:n osittainen puhdistus

VV-infektoiduissa BAS-1-soluissa esiintyvä EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuus eristettiin osittain puhdistuneena uuttamalla viljelmäsupernatantit hapolla 24 tunnin kuluttua infektoinnista. VV-infektoitujen soluviljelmien supernatanteissa saadut, hapolla liuenneeseen muotoon saatetut polypeptidit (10,5 mg) laitettiin BioGel P-10 -kolonniin, joka oli tasapainotettu 1 M etikkahapolla, ja tutkittiin kustakin fraktiosta EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuus. Pääosa EGF:n kanssa kilpailevasta aktiivisuudesta (fraktio 42) eluoitui vähän hiilihappohydraasimarkkerin (MP = 29 000) jälkeen, ja sen näennäinen molekyypaino oli 25 000. Fraktioissa, jotka vastasivat EGF:n tai rotan TGF:n tunnettuja eluoitumiskohtia (fraktio 100 ja vastaavasti 78), ei havaittu merkittävää aktiivisuutta tällä pylväällä. VGF-aktiivisuushuippu (fraktio 42 - 44)

käytettiin myöhempiin biologisiin kokeisiin. Molekyyllipaino varmistettiin käyttämällä peräkkäin kytkettyjä Bio-Sil TSK 250 -HPLC-loppupuhdistuskolonneja, EGF:n kanssa kilpaileva aktiivisuus eluoitui kokonaan suurimpana piikkinä  
5 alueella, joka vastasi proteiinimarkkeria MP = 25 000.

#### EGF:n ja TGF:n immunologinen vertailu

TGF:n ja VGF:n vertailemiseksi tarkemmin viimeksi mainittu tutkittiin edellä kuvatulla tavalla kompetitiivisella radioimmuunimäärityksellä TGF:n suhteen. Määrityksellä pystytään erottamaan EGF TGF:stä ja tunnistamaan  
10 rotta- ja ihmis-TGF:n pieni- ja suurimolekyylliset muodot (Linsley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 365-369). Rotan TGF kilpaili tehokkaasti <sup>125</sup>I-leimatun TGF-peptidin kanssa sitoutumisesta vasta-aineeseen; käyrä oli  
15 samanlainen kuin leimaamattoman TGF-peptidin. Havaittiin antigeenin 50-%:inen syrjäytyminen vasta-aineesta antigeenipitoisuuden ollessa noin 0,2 - 0,3 ng-EGF-ekvivalenttia. Kun tutkittiin VGF:ää vastaavina pitoisuuksina, ei havaittu kilpailua, mikä viittaa siihen, ettei VGF ole TGF-pep-  
20 tidiryhmän jäsen ainakaan immunologisten ominaisuuksien suhteen. Kompetitiivisessä radioimmuunimäärityksessä luonnon EGF:n suhteen VGF-valmisteet saivat aikaan hyvin pienen (<10 %) <sup>125</sup>I-leimatun EGF:n syrjäytymisen luonnon EGF:n polyklonaalisesta vasta-aineesta.

#### VGF:n biologinen aktiivisuus

Havaitun VGF:n määrä (>2 000 ng/l) oli vähintään yhtä kertalukua suurempi kuin TGF-määrä parhaimmassa TGF:n tuottajassa, Snyder-Theilen -kissan sarkoomaviruksella ei-  
30 produktiivisesti transformoiduissa Fischer-rotan alkiosoluissa (FRE).

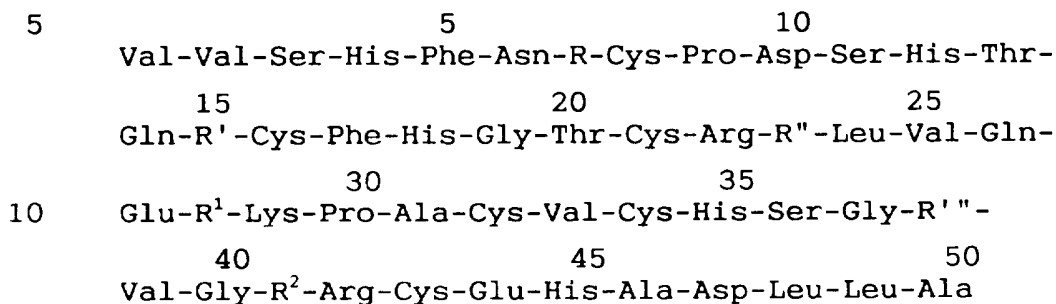
TGF:stä riippuvassa pehmytagarkokeessa, jossa mitataan tarttumiskohdasta riippumatonta solukasvua, VGF stimuloi rotan munuaissolut muodostamaan progressiivisesti kasvavia pesäkkeitä pehmytagariin. Nanogrammaekvivalenttia  
35 kohden laskettuna osittain puhdistettu VGF-valmiste tuotti 102 pesäkettä, kun taas EGF ja TGF tuottivat 120 ja vas-

taavasti 154 pesäkettä. (On mahdollista, että osittain puhdistetuissa VGF-valmisteissa esiintyvät kontaminoivat aktiivisuudet vaikuttavat kvantitatiiviseen tulokseen tämän tyyppisessä biologisessa kokeessa.)

- 5           VGF oli myös voimakkaasti mitogeeninen tutkittuna erilaisten viljeltyjen fibroblastien suhteen. Käytettäessä määriä, jotka saavat aikaan vastaavan sitoutumisen EGF-reseptoreihin, seerumivajauksessa viljellyille (48 tuntia) minkin fibroblasteille (jotka sisältävät suhteellisen runsaasti kalvon EGF-reseptorikohtia), VGF sai aikaan DNA-synteesin lisääntymisen 78 %:lla verrattuna stimuloimattomiin seerumivajauksessa kasvatettuihin soluihin, kun taas hiiren leuanalussylikirauhas-EGF:llä havaittiin deoksiuridiinin oton lisääntyminen 59 %:lla. VGF:n mitogeeninen vaikutus on siten vähintään yhtä voimakas kuin EGF:n.
- 10
- 15

## Patenttivaatimukset

1. Menetelmä biologisesti aktiivisten polypeptidien valmistamiseksi, joilla on kaava



jossa R on Asp tai Lys, R' on Phe tai Tyr, R" on Ser tai Phe, R'" on Phe tai Tyr, R<sup>1</sup> on Asp tai Glu ja R<sup>2</sup> on Ala tai Val, tai näiden polypeptidien aminohapposekvenssin 1 - 13, 34 - 43, 34 - 50 tai 39 - 50 käsittävien oligopeptidifragmenttien valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) aminohapot liitetään peräkkäin polypeptidin tai oligopeptidin kaavan mukaisessa järjestyksessä tavanomaisella kiinteäfaasimenetelmällä sopivalla kantajalla, tai

b) muodostetaan synteettisesti kaksisäikeinen DNA-sekvenssi, joka koodaa polypeptidirakenteen aminohapposekvenssiä, kaksisäikeinen DNA liitetään kloonausvälineen tai -vektorin sopivaan kohtaan yhdistelmä-DNA-molekyylin muodostamiseksi ja transformoidaan sopiva isäntä mainitulla yhdistelmä-DNA-molekyyllillä polypeptidin ilmentymisen aikaansaamiseksi, tai

c) eristetään homogeeninen muuntokasvutekijäpolypeptidi vesipitoisesta väliaineesta, joka sisältää tämän muuntokasvutekijäpolypeptidin epäpuhtaassa muodossa, menetelmällä, joka käsittää seuraavat vaiheet:

(1) dialysoidaan vesipitoinen väliaine, joka sisältää muuntokasvutekijän epäpuhtaassa muodossa, vesipitoista etikkahappoa vastaan antamaan liuotinfraasi, joka sisältää muuntokasvutekijäpolypeptidiä ja joka faasi väkevöidään ja valinnaisesti selkeytetään,

(2) muodostetaan vaiheen 1) väkevöity liuotinfraasi uudelleen vesipitoisella etikkahapolla ja saatetaan uudelleenmuodostettu liuos geelisuodatuskromatografiaan viemällä uudelleenmuodostettua liuosta geelisuodatuskromatografiapylvääseen, jota on tasapainotettu vesipitoisella etikkahapolla, ja eluoidaan vesipitoisella etikkahapolla eluootin valittujen fraktioiden saamiseksi, jotka sisältävät muuntokasvutekijäpolypeptidiä puhtaampana, ja valitut fraktiot yhdistetään ja väkevöidään, jolloin saadaan osittain puhdistettu, muuntokasvutekijäpolypeptidiä sisältävä tuote,

(3) saatetaan vaiheen (2) osittain puhdistettu, muuntokasvutekijäpolypeptidiä sisältävä tuote peräkkäiseen käänteisfaasikorkeapainenestekromatografiaan viemällä tuote, uudelleenmuodostamisen jälkeen vesipitoiseen trifluorietikkahappoon, yhden tai useampien hiilivetysidottujen piihappomatriisipylväiden läpi, jotka on tasapainotettu vesipitoisella trifluorietikkahapolla, korkeapainenestekromatografian olosuhteissa, jolloin pylvään alkueluointi suoritetaan käyttäen lineaarista asetoni-triiligradi-enttia vesipitoisessa trifluorietikkahapossa ja sen jälkeen pylväseluointi, joka suoritetaan ensimmäisestä korkeapainenestekromatografiavaiheesta saaduille, yhdistetyille, muuntokasvutekijäpolypeptidiä sisältäville fraktioille, toteutetaan käyttäen lineaarista 1-propanoligradi-enttia vesipitoisessa trifluorietikkahapossa, jolloin 1-propanolin gradienttia nostetaan riittävän pieninä 1-propanolin väkevyysslisäyksinä antamaan muuntokasvutekijäpoly-peptidi yhtenä ainoana selvänä huippuna homogeenisenä poly-peptidinä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että R on Asp, R' on Phe, R'' on Tyr, R<sup>1</sup> on Asp ja R<sup>2</sup> on Ala.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan oligopeptidifrag-

mentti, joka käsittää aminohapposekvenssin

A) Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Lys-Cys-  
Pro-Asp-Ser-His-Thr

B) Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys

5 C) Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys-Glu-His-  
Ala-Asp-Leu-Leu-Ala tai

D) Val-Gly-Val-Arg-Cys-Glu-His-Ala-Asp-Leu-Leu-Ala.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,  
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan oligopeptidi-  
10 fragmentti, joka käsittää aminohapposekvenssin  
Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Ala-Arg-Cys.

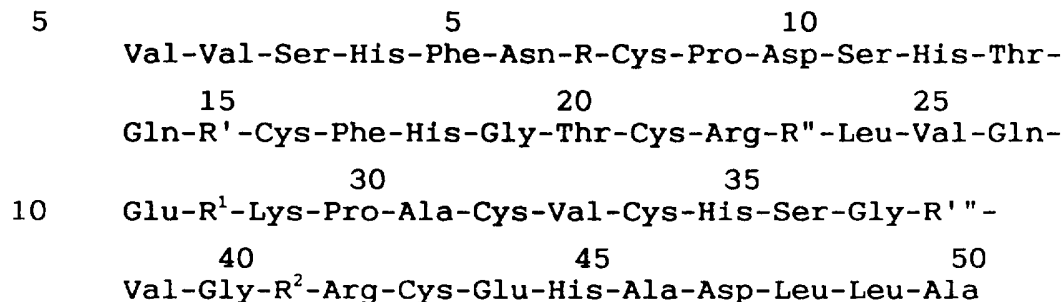
5. Patenttivaatimuksen 1 kohdan c) mukainen mene-  
telmä, t u n n e t t u siitä, että vesipitoinen väliai-  
ne, joka sisältää muuntokasvutekijäpolypeptidiä epäpuh-  
15 taassa muodossa, on kehon neste, joka sisältää muuntokas-  
vutekijän, tai vesipitoinen väliaine, joka on käsitelty  
muuntokasvutekijää tuottavalla solulinjalla.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,  
t u n n e t t u siitä, että homogeeninen muuntokasvuteki-  
20 jäpolypeptidi on ihmisen muuntokasvutekijäpolypeptidi.

7. Patenttivaatimuksen 1 kohdan c) mukainen mene-  
telmä, t u n n e t t u siitä, että vesipitoinen väliaine,  
joka sisältää muuntokasvutekijäpolypeptidiä epäpuhtaassa  
muodossa, on seerumiton väliaine, joka sisältää muuntokas-  
25 vutekijää tuottavan elinkykyisen solulinjan.

## Patentkrav

1. Förfarande för framställning av biologiskt aktiva polypeptider med formeln



vari R är Asp eller Lys, R' är Phe eller Tyr, R" är Ser eller Phe, R'" är Phe eller Tyr, R<sup>1</sup> är Asp eller Glu och R<sup>2</sup> är Ala eller Val, eller för framställning av oligopeptidfragmenter, omfattande aminosyrasekvensen 1 - 13, 34 - 43, 34 - 50 eller 39 - 50 hos dessa polypeptider, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

20 a) kopplar aminosyror efter varandra i en följd enligt formeln för polypeptiden eller oligopeptiden medelst ett konventionellt fastfasförfarande på en lämplig bärare, eller

25 b) bildar syntetiskt en dubbelsträngad DNA-sekvens, som kodar aminosyrasekvensen hos polypeptidstrukturen, kopplar den dubbelsträngade DNA:n till ett lämpligt ställe i ett kloningsmedel eller -vektor för bildande av en rekombinant-DNA-molekyl och transformerar en lämplig värd med nämnda rekombinant-DNA-molekyl för åstadkommande av  
30 expression av polypeptiden, eller

c) isolerar en homogen transformerande tillväxtfaktorpolypeptid ur ett vattenhaltigt medium innehållande denna transformerande tillväxtfaktor i oren form med ett förfarande, som omfattar följande steg:

35 1) ett vattenhaltigt medium innehållande transformerande tillväxtfaktor i oren form dialyseras mot vattenhaltig ättiksyra för erhållande av en lösningsfas, som

innehåller den transformerande tillväxtfaktorpolypeptiden och som koncentreras och eventuellt görs klar,

2) den koncentrerade lösningsfasen från steget 1) bildas på nytt med vattenhaltig ättiksyra och den på nytt bildade lösningen underkastas gelfiltreringskromatografi genom att leda den på nytt bildade lösningen till en gelfiltreringskromatografikolonn, vilken har balanserats med vattenhaltig ättiksyra, och elueras med vattenhaltig ättiksyra för erhållande av valda eluantfraktioner, som innehåller den transformerande tillväxtfaktorpolypeptiden i en renare form, och de valda fraktionerna kombineras och koncentreras för erhållandet av en partiellt renad produkt innehållande den transformerande tillväxtfaktorpolypeptiden,

3) den partiellt renade produkten innehållande den transformerande tillväxtfaktorpolypeptiden från steget 2) underkastas sekventiell omvändfashögtrycktsvätskekromatografi genom att leda produkten, efter återbildningen i vattenhaltig trifluorättiksyra, genom en eller flera kolvetebundna, kieselsyramatriskolonner, vilka har balanse-rats med vattenhaltig trifluoriättiksyra, i högtrycktsvätskekromatografiförhållanden, varvid den initiella kolonnelueringen utförs under användande av en lineär acetonitrilgradient i vattenhaltig trifluoriättiksyra och efterföljande kolonnelueringen, vilken utförs med de kombinerade, transformerande tillväxtfaktorpolypeptidhaltiga fraktionerna från det initiella högtrycktsvätskekromatografisteget, under användande av en lineär 1-propanolgradient i vattenhaltig trifluoriättiksyra, varvid 1-propanol-gradienten ökas i tillräckligt små 1-propanol-koncentrationsinkrement för erhållande av den transformerande tillväxtfaktorpolypeptiden, som en enda distinkt topp i form av en homogen polypeptid.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att R är Asp, R' är Phe, R'' är Tyr, R<sup>1</sup> är Asp och R<sup>2</sup> är Ala.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e-  
t e c k n a t därav, att man framställer en oligopep-  
tidfragment, som innehåller aminosyrasekvensen

A) Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Lys-Cys-

5 Pro-Asp-Ser-His-Thr

B) Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys

C) Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys-Glu-His-  
Ala-Asp-Leu-Leu-Ala eller

D) Val-Gly-Val-Arg-Cys-Glu-His-Ala-Asp-Leu-Leu-Ala.

10 4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e-  
t e c k n a t därav, att man framställer en oligopep-  
tidfragment, som innehåller aminosyrasekvensen

Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Ala-Arg-Cys.

15 5. Förfarande enligt steget c) i patentkravet 1,  
k ä n n e t e c k n a t därav, att det vattenhaltiga me-  
-diet, som innehåller den transformerande tillväxtfaktor-  
polypeptiden i oren form, är en kroppsvätska, som in-  
nehåller den transformerande tillväxtfaktoren, eller ett  
vattenhaltigt medium, som behandlats med en cell-linje,  
20 som producerar den transformerande tillväxtfaktoren.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e-  
t e c k n a t därav, att den homogena transformerande  
tillväxtfaktorpolypeptiden är en human transformerande  
tillväxtfaktorpolypeptid.

25 7. Förfarande enligt steget c) i patentkravet 1,  
k ä n n e t e c k n a t därav, att det vattenhaltiga me-  
diet, som innehåller den transformerande tillväxtfaktor-  
polypeptiden i oren form, är ett serumfritt medium, som  
innehåller en transformerande tillväxtfaktor producerande,  
30 livsduglig cell-linje.