



Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: C 07 K 14/47 C 07 K 1/36

(21) Patentansøgning nr: PA 1988 04135

(22) Indleveringsdag: 1988-07-22

(24) Løbedag: 1988-07-22

(41) Alm. tilgængelig: 1989-01-24

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2003-05-12

(30) Prioritet: 1987-07-23 US 077366

(73) Patenthaver: Washington University, Washington University Box 8013, 724 S. Euclid Avenue, St. Louis, Missouri 63110, USA

(72) Opfinder: George John Broze Jr., 15 Westpoint Lane, St. Louis, Missouri 63131, USA

(74) Fuldmægtig: Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark

(54) Benævnelse: Fremgangsmåde til isolering af vævsfaktorinhibitor (TFI) og anvendelse af en således opnået vævsfaktorinhibitor til fremstilling af et antithrombotisk lægemiddel

(56) Fremdragne publikationer:
Proceedings of the National Academy of Science, USA 84(April 1987), side 1886-90

(57) Sammendrag:

Renset vævsfaktor-inhibitor med følgende egenskaber:

A. at den findes i to former, TFI₁ og TFI₂ på henholdsvis 37-40.000 og 25-26.000 dalton fastlagt ved natrium-dodecylpolyacrylamid-gelelektroforese,

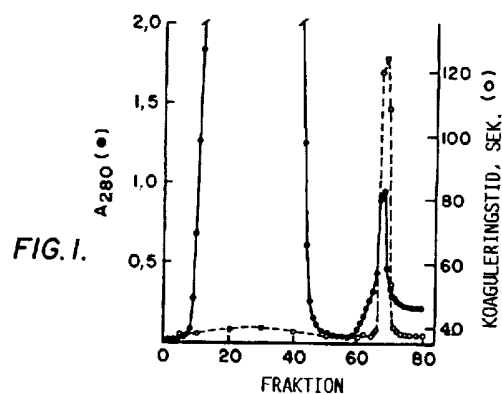
B. at den har en N-endestillet aminosyresekvens på:

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

16
Leu-Pro-Pro-Leu-Lys-Leu-Met-His-Ser-Phe-(Phe)-Ala, 27

hvor X-X ikke er bestemt, og

C. at den udviser hæmmende virkning over for Faktor X_a.



Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til isolering af en koagulationsinhibitor betegnet vævsfaktorinhibitor (TFI) og anvendelsen af en således opnået vævsfaktorinhibitor til fremstilling af et antithrombotisk lægemiddel.

5 Koagulering, der forekommer i pattedyrblod, omfatter to adskilte systemer – de såkaldte indre og ydre systemer. Sidstnævnte system aktiveres, når blod ud-
sættes for vævsthromboplastin (faktor III), i det efterfølgende betegnet vævsfaktor (TF). Vævsfaktor er et lipoprotein, der frembringes i plasmamembranen af
10 mange celletyper, og hvor hjernen og lungerne er specielt rige herpå. Ved at komme i kontakt med TF danner plasmafaktor VII eller dens aktiverede form, faktor VIIa, et calcium-afhængigt kompleks med TF og aktiverer herefter proteo-
lytisk faktor X til faktor Xa og faktor IX til faktor IXa.

Tidligere undersøgelser over reguleringen af TF-initieret koagulering viste, at inkubation af TF (i urensede vævsthromboplastin-præparater) med serum
15 hæmmede dens aktivitet *in vitro* og forhindrede dens dødbringende virkning, når den blev infunderet i mus. Indgående undersøgelser af Hjort, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **9**, Suppl. 27, 76-97 (1957) bekræftede dette, og yderligere arbejde
inden for dette område førte til den konklusion, at en hæmmende del i serum genkendte faktor VII-TF-komplekset. I overensstemmelse med denne hypotese
20 er de kendsgerninger, at hæmningen af TF, der forekommer i plasma, kræver tilstedeværelsen af Ca^{2+} (der også er nødvendig for bindingen af faktor VII/VIIa til TF), og at hæmningen kan forhindres og/eller vendes om ved chelatering af
divalente kationer med EDTA. Nyere undersøgelser har nu vist, at ikke alene faktor VIIa, men også katalytisk aktiv faktor Xa og en yderligere faktor er nød-
25 vendig for frembringelsen af TF-hæmningen i plasma eller serum. Se Broze og Miletich, *Blood* **69**, 150-155 (1987) og Sander et al., *Ibid.* **66**, 204-212 (1985). Denne yderligere faktor, heri defineret som vævsfaktor-inhibitor (TFI), findes i
barium-absorberet plasma og synes at være associeret med lipoproteiner, da TFI-funktionel aktivitet skiller ud med den lipoproteinfraktion, der flyder, dersom
serum centrifugeres til en tæthed på 1,21 g/cm³. Ifølge Broze og Miletich, *supra*,
30 udskiller HepG2-celler (en human hepatomacellelinie) en hæmmende gruppe med samme egenskaber som TFI til stede i plasma.

I *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* **84**, 1886-1890, beskrives isolering af en vævsfaktorinhibitor (TFI) som er produceret af HepG2-

C. "Superose 12"-gel-filtrering af fraktionerne fra affinitetskromatografien indeholdende TFI-aktivitet.

Ved en alternativ isoleringsmetode inaktiveres faktor Xa i trin B ved binding til isopropylphosphat (iPr₂P), "Sephadex® G-75" anvendes som gel-
5 filtreringsmaterialet i trin C, og et fjerde trin D udføres på følgende måde:

D. Mono Q-ionbytter-kromatografi af fraktionerne fra gelfiltreringen indeholdende TFI-aktivitet.

Ved de foregående metoder er HepG2 en velkendt og udbredt tilgængelig human hepatomacellelinie, hvis etablering og karakteristika er beskrevet i US patentskrift nr. 4 393 133. Prøver af denne cellelinie er også tilgængelige fra den
10 permanente samling i American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, under accessionsnummeret ATCC HB 8065.

Andre velegnede cellekilder for TFI er for eksempel SK-HEP-1-celler (ATCC HTB 52), Chang-leverceller (ATCC CCL 13), endotheliale celler og pattedyr-
15 blodsera.

HepG2-cellerne kan dyrkes ved cirka 37 °C i almindeligt næringsdyrkningssubstrat for at udtrykke TFI. Et foretrukket substrat er Earle's modificerede essentielle substrat (EMEM), der er kommercielt tilgængeligt. Andre passende kommercielt tilgængelige substrater er fx beskrevet af Helen J. Morton, *In Vitro* 6(2),
20 89-108 (1970). Disse næringsdyrkningssubstrater indeholder aminosyrer, mineraler, kulhydrater, vitaminer og er ofte forstærket med pattedyrsera, som fx fetalt bovint serum eller kalveserum, og forskellige vækstfaktorer. Som anvendt heri dyrkes HepG2-celler fortrinsvis først i serumholdigt substrat og overføres derefter til serumfrit substrat tilsat vækststimulerende mængder af transferrin, selen,
25 insulin, levercelle-vækstfaktor og lactalbuminhydrolysat.

CdCl₂-bundfaldet dannet i trin A ovenfor fortyndes fortrinsvis med samme volumen af en pufferopløsning inden påførsel på en affinitetskromatografisøjle i trin 1. Pufferopløsningen bør omfatte en vandig opløsning af et biologisk acceptabelt puffermateriale indstillet til en pH-værdi på cirka 7,5. Anvendelsen af 0,05
30 M Tris-HCl er et eksempel herpå. En i det væsentlige lignende puffer kan herefter anvendes til at ækvilibrere affinitetskromatografisøjlen.

"Affi-Gel® 15" der anvendes i trin B, er en kommercielt tilgængelig, aktiveret affinitetsbærer fremstillet som en N-hydroxysuccinimidester af en derivatiseret tværbundet agarosegel.

5 "Superose® 12" og "Sephadex® G-75" der anvendes i gelfiltreringstrinnet C, er kommercielt tilgængelige kugleformede geler fremstillet ved tværbinding af dextran med epichlorhydrin. De foretrukne superfine kvaliteter har en diameter af størrelsesordenen cirka 20-50 µm.

10 Inden påførsel på gelfiltreringssøjlen koncentrerer fraktionerne fra affinitetskromatografien indeholdende TFI-aktivitet i trin B fortrinsvis, fx ved ultrafiltrering, for at reducere mængden af opløsning, der skal arbejdes med, og søjlen kan ækvilibreres med 1M NaSCN, pufret til pH ca. 7,5.

15 Ved en alternativ isoleringsmetode efter gelfiltreringstrinnet C udfældes fraktionerne indeholdende TFI-aktivitet fortrinsvis med acetone, og bundfaldet resolubiliseres herefter til påhædning på Mono Q-søjlen. Denne søjle kan ækvilibreres med 6M urinstof, pufret til pH ca. 8,3.

Mono Q anvendt i trin D er en kommercielt tilgængelig, stærk anionbytterharpiks, baseret på en hydrofil polymer i kugleform, diameter cirka 10 µm, med ladede kvaternære aminogrupeer.

20 Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en speciel fremgangsmåde til isolering af vævsfaktorinhibitor (TFI) fra det konditionerede medium af en levercellelinie, hvilken fremgangsmåde er særegen ved at det konditionerede medium underkastes immunoaffinitetsrensning med anti-TFI-peptid-Ig rejst over for et peptidantigen omfattende aminosyresekvensen:

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

30 Skønt særlige metoder til isolering af TFI er beskrevet heri, kan den pågældende TFI naturligvis være produceret på forskellig vis. TFI-proteinet kan således fremstilles ved almindelig rekombinant DNA-teknologi. Nylige fremskridt inden for biokemien og inden for den rekombinante DNA-teknologi har gjort det muligt at syntetisere specifikke proteiner, fx enzymer, under kontrollerede betingelser,

uafhængigt af den organisme, hvorfra de normalt isoleres. Disse biokemiske syntesemetoder anvender enzymer og subcellulære komponenter af de proteinsyntetiserende systemer i levende celler, enten *in vitro* i cellefri systemer eller *in vivo* i mikroorganismer. I begge tilfælde er hovedelementet tilvejebringelse af en deoxyribonucleinsyre (DNA) med specifik sekvens, der indeholder den nødvendige information til at specificere for den ønskede aminosyresekvens. En sådan specifik DNA-sekvens betegnes et gen. Kodeforholdene hvorved en deoxyribonucleotidsekvens anvendes til at specificere aminosyresekvensen af et protein, er velkendte og arbejder efter et fundamentalt sæt af principper. Se for eksempel Watson, "Molecular Biology of the Gene", 3. udgave, Benjamin-Cummings, Menlo Park, Calif., 1976.

Et klonet gen kan anvendes til at specificere aminosyresekvensen af proteiner syntetiseret af *in vitro* systemer. RNA-dirigerede protein-syntetiserende systemer er velkendte. Dobbeltstrengt DNA kan induceres til at frembringe mRNA *in vitro* med efterfølgende særdeles korrekt translation af RNA-sekvensen til protein.

Det er nu muligt at isolere specifikke gener eller dele heraf fra højere organismer, som fx mennesker og dyr, og overføre generne eller fragmenterne til mikroorganismer, som fx bakterier eller gær. Det overførte gen opformeres og propageres, efterhånden som den transformerede mikroorganisme opformeres. Som en følge heraf er den transformerede mikroorganisme i besiddelse af evnen til at fremstille det ønskede protein eller gen, som det koder for, fx et enzym, og herefter overføre evnen til afkommet. Se for eksempel Cohen og Boyer, US patentskrift nr. 4 237 224 og 4 468 464.

Opfindelsen beskrives nu nærmere under henvisning til tegningen, hvor

fig. 1 er en grafisk afbildning, der viser elueringsprofilen efter iPr_2P -humantfaktor Xa "Affi-Gel"-affinitetskromatografi af et koncentreret TFI-præparat isoleret fra HepG2-celler, der er en udførelsesform for opfindelsen,

fig. 2 er en grafisk afbildning, der viser elueringsprofilen efter Sephadex G-75 gelfiltrering af en koncentreret prøve fra de TFI-aktive fraktioner fra fig. 1,

fig. 3 er en grafisk afbildning, der viser elueringsprofilen efter Mono Q ionbyt-
terkromatografi af en koncentreret prøve fra de TFI-aktive fraktioner fra fig. 2,

fig. 4 viser SDS PAGE af en rensset TFI-prøve fra fig. 3,

5 fig. 5 er en grafisk afbildning, der viser en sammenligning af rensset TFI fra fig. 3
og normalt humant serum ved et TFI-assay,

fig. 6 er en grafisk afbildning, der viser den hæmmende virkning af det rensede
TFI fra fig. 3 på faktor Xa sammenlignet med dens manglende virkning på
thrombin,

10 fig. 7 er en grafisk afbildning som viser den hurtige hæmning af TF-aktivitet med
det rensede TFI fra fig. 3 i nærværelse af faktor VIIa, faktor Xa og Ca^{2+} ,

fig. 8 er en grafisk afbildning, der viser elueringsprofilen efter bovin faktor Xa-
"Affi-Gel"-affinitetskromatografi af et koncentreret TFI-præparat isoleret fra
HepG2-celler i en anden udførelsesform for opfindelsen,

15 fig. 9 er en grafisk afbildning, der viser elueringsprofilen efter "Superose 12"-
gelfiltrering af en koncentreret prøve fra de TFI-aktive fraktioner i fig. 8,

fig. 10 viser SDS-PAGE af en reduceret, rensset TFI-prøve fra fig. 9,

fig. 11 viser SDS-PAGE af en ikke-reduceret rensset TFI-prøve fra fig. 9,

20 fig. 12(A) viser SDS-PAGE af TFI isoleret fra Chang-leverceller (bane 2), SK-
HEP-I (bane 3 og 4) og HepG2-celler (bane 5 og 6) ved immunoaffinitetskroma-
tografi i yderligere udførelsesformer for opfindelsen med standard-molekylmar-
kører angivet i bane 1, og

25 fig. 12(B) viser Western-blot-metoden (elektroforetisk overførsel) på nitrocellu-
losepapir og farvning med Xa efterfulgt af autoradiografi af elektroforetisk ad-
skilte proteiner fra banerne 2, 3, 4 og 6 i fig. 12(A) i henholdsvis banerne 1, 2, 3
og 4.

For at illustrere særligt foretrukne udførelsesformer for opfindelsen nærmere
udførtes følgende eksempler. I eksempel 1 er TFI isoleret ved hjælp af fi-
retrinsmetoden, og i eksempel 2 ved hjælp af tretrins-metode fra konditioneret

substrat af HepG2-celler som tidligere beskrevet. I eksempel 3 isoleres TFI fra adskillige cellekilder ved immunoaffinitetskromatografi.

EKSEMPEL 1

Materialer

- 5 "Affi-Gel 15" og lavmolekylære standarder til polyacrylamid-elektroforese blev indkøbt fra Bio-Rad Laboratories. Na¹²⁵I (bærerfrit) blev leveret af New England Nuclear, og "Iodo-Gen" blev leveret af Pierce Chemical Co. "Sephadex® G-75 superfine" og en Mono Q-søjle blev leveret af Pharmacia Inc. Earle's modifizierte essentielle substrat (EMEM) og fetalt bovint kalveserum blev skaffet fra KC
10 Biological, Inc. (Lenexa, KS), og levercellevækstfaktor blev skaffet fra Miles Laboratories. Bovint serumalbumin, phenylmethylsulfonylfluorid, diisopropylfluorophosphat (iPr₂P-F), acrylamid, methylenbis(acrylamid), kaninhjernecephalin, transferrin, selen, insulin, lactalbuminhydrolysat, HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsyre), MOPS (3-[N-morpholino]propansulfonsyre) og
15 Trizma-base [Tris(hydroxymethyl)aminoethan] blev leveret af Sigma Chemical Co. Alle andre kemikalier var af reagenskvalitet eller bedre og blev leveret af Fisher Scientific Co. eller af Sigma. Faktor X-deficient humant plasma blev leveret af George King Biomedical (Overland Park, KS). Serumprøver fra raske
20 bloddonorer blev leveret af det amerikanske Røde Kors (St. Louis, MO).
HepG2-celler blev skaffet fra American Type Culture Collection.

Proteiner

- Et urensset præparat af TF blev fremstillet og grundigt vasket med EDTA [Broze og Miletech, *Blood* **69**, 150-155 (1987); Broze og Majerus, *J. Biol. Chem.* **255**, 1242-1247 (1980)]. Faktor X-koaguleringsprotein fra Russell's hugormegift
25 (XCP), antithrombin IIIa, faktor VIIa og human faktor X blev rensset som beskrevet af Broze og Miletech, *supra*; Broze et al., *J. Biol. Chem.* **260**, 10917 (1985); Peterson og Blackburn, *J. Biol. Chem.* **260**, 610-615 (1985); og Miletech, Broze og Majerus, *Methods Enzymol.* **80**, 221-228 (1981). Faktor Xa blev fremstillet
30 ud fra rensset faktor X ved inkubation med insolubileret Z koagulant-protein og inaktiveret med iPr₂P-F [Broze og Miletech, *supra*; Bajaj et al., *Prep. Biochem.* **11**, 397-412 (1981)]. iPr₂P-faktor Xa blev fasthæftet til "Affi-Gel 15" med en slut-

koncentration på ca. 2 mg/ml pakket gel under anvendelse af producentens instruktioner (MOPS-puffer, pH 7,5).

Undersøgelse

En tretrins-undersøgelsesmetode for TF-hæmning anvendtes under rensningsmetoden nedenfor. [Broze og Miletech, supra]. I det første trin blev 10 µl faktor VIIa (1 g/ml), 10 µl faktor X (10 µg/ml), 10 µl CaCl₂ (40 mM), 10 µl antithrombin IIIα (650 µg/ml), 50 µl af prøven, der skulle undersøges, fortyndet i TBSA-puffer (0,1 M NaCl/ 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, indeholdende bovint serumalbumin i 1 mg/ml) og 10 µl urensset, EDTA-vasket TF (10 vol./vol.-procent) inkuberet ved stuetemperatur. Efter 30 minutter blev en 10 µl prøve fortyndet 100 gange i TBSA-puffer med 5 mM CaCl₂. 50 µl af denne fortyndede prøve, 50 µl faktor VIIa (1 µg/ml), 50 µl CaCl₂ (25 mM) og 50 µl faktor X (10 µg/ml) blev derefter inkuberet ved 37 °C. Efter 10 minutters forløb tilsættes 50 af en blanding indeholdende 10 dele faktor X-manglende plasma og 1 del kaninhjernecephalin-lagerreagens (fremstillet som beskrevet af Bell og Altone, *Nature* **174**, 880 (1954) og rekonstitueret som angivet i instruktionerne fra producenten, Sigma) og tiden for den første koageldannelse bestemtes med hjælp af et fibrometer (Baltimore Biological Laboratory, Cockeysville, MD).

Blandinger, hvori TBSA i stedet for prøven var inkuberet i det første trin, tjente som kontroller. Koncentrationen af urensset TF i undersøgelsen udvalgte til at frembringe en kontrolkoagulerings-tid på 35-40 sekunder. Antithrombin IIIa var inkluderet i undersøgelsesmetoden for at formindske virkningen af faktor Xa dannet under første trins-inkubationen på koagulerings-tiden fremkommet i det tredje trin af undersøgelsen. Den relative TFI-aktivitet beregnedes ud fra en standardkurve konstrueret ved at afsætte (på log-log-papir) forlængelsen i sekunder af koagulerings-tiden i forhold til kontrolværdierne mod slutkoncentrationen af normalt sammenhædt serum (50 donorer) i forsøgets første trin. Denne standardkurve frembringer et lineært respons fra 1 - 10 % (vol./vol.) serumkoncentrationer. En enhed TFI-aktivitet defineredes som den, der indeholdtes i 1 ml normalt sammenhædt serum. Undersøgelsesresultaterne fra kromatografifraktionerne er udtrykt som koagulerings-tider og er ikke omregnet til enheder/ml.

NaDodSO₄/PAGE udførtes i 15v% geler (4 % stabelgel) som beskrevet af Laemmli, *Nature* (London) **227**, 680-685 (1970). Reducerede prøver opvarme-

des til 100 °C i 5 minutter i nærvær af 10 % 2-mercaptoethanol inden elektrofo-
rese. TFI ekstraheredes efter NaDodSO₄/PAGE ved at udskære banen fra ge-
len, lade den henstå i 0,1 M NaCl/0,05 TrisHCl, pH 7,5, i 30 minutter, opskære
den i 2 mm sektioner og inkubere hver skive natten over i 100 i M NaSCN/0,05
5 M Tris-HCl, pH 7,5/0,025% Lubrol PX (et biologisk ikke-ionisk detergent bestå-
ende af et ethylenoxidkondensat af fed alkohol) indeholdende bovint serumal-
bumin i 0,5 mg/ml. En 1:50 fortynding i TBSA af det ekstraherede materiale un-
dersøgtes herefter som beskrevet ovenfor for TF-hæmning. Western-blot udfør-
tes som beskrevet af Broze, Hickman og Miletich, *J. Clin. Invest.* **76**, 937-946
10 (1985) under anvendelse af ¹²⁵I-mærket faktor Xa som proben. Aminosyre-
sammensætningen af rensset TFI (110 pmol) bestemtes, efterfulgt af 24 timers
hydrolyse i 6 M HCl ved 110 °C på en "Beckman® 6300" autoanalyser med
post-søjle ninhydrin-derivatisering.

Cellekultur

15 HepG2-celler blev dyrket i plast- eller glas-rulleflasker (850 cm²). Efter indle-
dende podning dyrkedes cellerne i EMEM med ikke-essentielle aminosyrer og
penicillin (10³ enheder/ml), streptomycin (100 µg/ml), amphotericin (250 ng/ml),
natriumpyruvat (100 mM), L-glutamin (200 mM) og 5 % fetalt bovint serum og 5
% kalveserum, idet substratet blev udskiftet to gange om ugen. Efter 2 ugers
20 forløb fjernedes substratet indeholdende serum, og cellerne blev forsigtigt va-
sket med EMEM og herefter dyrket i serumfrit substrat bestående af de samme
bestanddele som angivet ovenfor plus transferrin (5 µg/ml), selen (5 ng/ml), in-
sulin (5 µg/ml), levercellevækstfaktor (20 µg/ml), lactoalbuminhydrolysat (5
mg/ml) og HEPES (25 mM). Det konditionerede substrat blev fjernet og erstattet
25 med frisk serumfrit substrat to gange om ugen. HepG2-cellerne kan opretholdes
under disse betingelser i >3 måneder.

Automatiseret Edman-nedbrydnings-kemi anvendtes til at bestemme den NH₂-
terminale proteinsekvens af rensset TFI. En Applied Biosystems, Inc., model
470A gasfasesekvenser (Foster City, CA, USA) anvendtes til nedbrydningerne
30 (Hunkapiller et al., *Methods Enzymol.* **91**, 399-413 (1983). De respektive PTH-
aminosyre-derivater blev identificeret ved RP-HPLC-analyse på on-line-måde
under anvendelse af en Applied Biosystems, Inc., model I20A PTH Analyser
udstyret med en Brownlee 2,1 mm I.D. PTH-C₁₈-søjle.

Elektroblot-metoden anvendtes på prøven for at sekvansere bånd isoleret direkte fra SDS-PAGE. De anvendte metoder var som beskrevet af Aebersold et al., *J. Biol. Chem.* **261**, 4229-4238 (1986). Under anvendelse af disse sekvenseringsmetoder kunne de første to N-terminale aminosyrer ikke fastslås, men aminosyrerne 3-27 bestemtes som følger:

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

10 Rensning af TFI

Hvis ikke andet er angivet, udførtes oprensningen ved stuetemperatur. Oprenningsmetoden er sammenfattet nedenfor som et 4-trins skema i tabel 1.

TABEL 1

	Rensning af TFI				
	Protein mg*	Aktivitet enheder	Specifik aktivitet enheder/mg	Udbytte %	Oprrensning gange
Serumfrit substrat	23 400 (2840)+	4 400	0,88 (1,55)±	100	1
CdCl ₂ -udfældning, eluering og dialyse	480	4 090	8,52	93	45 (5,50)±
iPr ₂ P-faktor Xa-"Affi-Gel"	7,0	1 240	180	28	957 (116)+
"Sephadex® G-75"	0,83	870	1 050	20	5 590 (677)±
Mono Q	0.06	590	9 800	13	52 100 (6320)±

*Beregnet under antagelse af en ekstinktionskoefficient ved 280 nm på E_{1%¹cm} = 10.

+Substratet grundigt dialyseret mod TS-puffer.

±Værdier baseret på dialyseret substrat med 10 000 molekylvægts afskæring.

Den detaljerede oprensningemetode var som følger.

A. Cadmiumchloridudfældning

HepG2-celle serum-frit konditioneret substrat (4 liter) blev centrifugeret efter til-
sætning af phenylmethylsulfonylfluorid (slutkoncentration 0,1 mM) og NaN_3
5 (slutkoncentration 0,05 vægt/vol.-%) ved 2500 x g i 30 minutter for at fjerne af-
faldspartikler. CdCl_2 (1,0 M) tilsattes herefter til en slutkoncentration på 5 mM,
og blandingen omrørtes i 15 minutter. Bundfaldet der indeholdt TFI-aktiviteten,
blev fracentrifugeret (2500 x g i 30 minutter), og den supernatante del smidt
væk. Pillen opløstes med 40 ml 0,5 EDTA/5 mM $\text{iPr}_2\text{P-F}$, pH 9,5, og dialysere-
10 des herefter grundigt over for TS-puffer (0,1 M NaCl/0,05 M Tris HCl/0,1 mM
phenylsulfonylfluorid/0,5 mM EDTA/0,02% NaN_3 , pH 7,5).

B. iPr_2 -faktor Xa-"Affi-Gel 15"-kromatografi

Det dialyserede præparat klarede ved centrifugering (10.000 x g i 15 minutter)
og påhældtes en søjle af iPr_2P -faktor Xa-"Affi-Gel 15" ækvilibreret i RS-puffer.
15 Gelen blev vasket med startpuffer, og det bundne materiale elueret med 2 M
 NaSCN /0,05 M Tris-HCl, pH 7,5/0,05% Lubrol PX/0,02% NaN_3 /0,1 mM phenyl-
methylsulfonylfluorid (fig. 1). Fraktioner indeholdende TFI-aktivitet blev hældt
sammen og koncentreret til ca. 1 ml under anvendelse af en YM5 hydrofil ultra-
filtreringsmenbran (Amicon).

20 C. Gelfiltrering og acetonedelipidation

Den koncentrerede prøve påførtes en søjle af "Sephadex G-75 superfine" bragt
i ligevægt i 1 M NaSCN /0,05 M Tris-HCl, pH 7,5/0,05% Lubrol PX/0,02 %
 NaN_3 /0,1 mM phenylmethylsulfonylfluorid (fig. 2). Fraktioner indeholdende TFI-
aktivitet blev hældt sammen og blandet med 8 volumener acetone. Efter 30 mi-
25 nutters forløb blev bundfaldet opsamlet ved centrifugering (10 000 x g, 20 mi-
nutter, 10 °C).

D. Mono Q ionbytterkromatografi

Acetonebundfaldet blev solubilisert med 1,0 ml 6 M urinstof/0,02 M Tris-
HCl/0,05% Lubrol PX, pH 8,3 og påført en Mono Q-søjle bragt i ligevægt i
30 samme puffer. Søjlen fremkaldtes med en 30 ml lineær gradient fra startpuffer

til 6 M urinstof/0,5 M Tris-HCl/0,05% Lubrol PX, pH 8,3 (fig. 3). Fraktioner indeholdende TFI-aktivitet blev hældt sammen som vist i fig. 3, koncentreret til ca. 1 ml (YM5, Amicon), dialyseret over for 1 M NaSCN/0,05 M Tris-HCl/0,05% Lubrol PX, pH 7,5 og opbevaret ved 4 °C.

5 TFI's egenskaber

NaDodSO₄/PAGE af det rensede TFI viste et dominerende bånd ved molekylvægt 38 000 (ureduceret) eller 39.000 (reduceret) (fig. 4). Ekstraktion af gelskiver efter NaDodSO₄/PAGE af en ureduceret prøve af det rensede præparat viste at hæmmende virkning vandrede sammen med det Coomassie-farvede bånd. Som ventet genkendtes det samme bånd med I¹²⁵-mærket faktor Xa ved immunoblot (resultater ikke vist). Aminosyresammensætningen af den rensede TFI er angivet i tabel 2 nedenfor. Den rensede TFI viste sig at være lig med den hæmmende faktor som er tilstede i serum ved at den krævede faktor VII, faktor X og Ca²⁺ for udtrykkelsen af aktivitet (Broze og Miletich, *supra*) (Tabel 3 nedenfor), og fortyndinger af den rensede TFI frembragte en linie parallel med linien for den normale humane serumstandardkurve (fig. 5).

Inkubation af den rensede TFI (250 mg/ml) med faktor Xa (25 ng/ml) førte til tab af Xa koagulationsaktivitet ved et funktionelt bio-assay (fig. 6). Denne hæmmende virkning af TFI var ikke en generel egenskab rettet mod alle serinproteaser, da thrombin var fuldstændigt upåvirket ved inkubation med TFI (fig. 6).

Under tilstedeværelse af faktor VIIa, faktor Xa og Ca²⁺ frembragte TFI meget hurtig hæmning af TF-aktivitet med en tilsyneladende t_½ på 20 sekunder (fig. 7). Tilsætning af heparin (0,5 enheder/ml) til blandingerne accelererede begyndelseshastigheden af hæmningen tre gange (t_½ = 6 sekunder). Hæmning af tilsyneladende TF-aktivitet med TFI påvirkedes ikke ved tilsætning af antithrombin IIIα (65 µg/ml) til reaktionsblandingen.

TABEL 2

Aminosyresammensætning af TFI

Aminosyre	Forkortelse	Mol pr. 38 000 g protein
Asparaginsyre	Asp	40
Threonin	Thr	20
Serin	Ser	19
Glutaminsyre	Glu	44
Prolin	Pro	15
Glycin	Gly	33
Alanin	Ala	19
Cystein	Cys	13*
Valin	Val	12
Methionin	Met	+
Isoleucin	Ile	15
Leucin	Leu	27
Tyrosin	Tyr	10
Phenylalanin	Phe	20
Histidin	us	5
Lysin	Lys	26
Arginin	Arg	18
Tryptophan	Trp	ND

ND = ikke bestemt

* Cystein-værdi efter 24 timers hydrolyse; permyresyreoxidation udførtes ikke.

5 + Methionin blev oxideret under hydrolyse; intet blev detekteret.

TABEL 3

Krav om faktor VII, faktor X og Ca²⁺ for udtrykkelsen af aktivitet af rensed TFI

Udelukkelse fra første trin*	Koaguleringsstid+, sek.
10 Ingen	95,3
faktor X	40,2
faktor VIIa	41,3
Ca ²⁺ (5 mM EDTA)	40,8
Kontrol	37,7

15 * Se beskrivelse af TFI-undersøgelsen ovenfor.

+Resultaterne af gennemsnit af dobbeltforsøg. Slutkoncentrationen af TFI var 10 ng/ml i det første trin af undersøgelsen.

De funktionelle egenskaber ved TFI isoleret fra HepG2-konditioneret substrat ovenfor illustreredes på følgende måde.

Koagulationsundersøgelser

Faktor Xa-hæmning med TFI. Reaktionsblandinger indeholdende rensed TFI
5 (250 ng/ml), faktor Xa (25 ng/ml) og enten EDTA (1 mM) eller CaCl₂ (5 mM) og
en 1:40 fortynding af en stamopløsning af kaninhjernecephalin (fremstillet som
angivet i de publicerede instruktioner fra Sigma) i TBSA (0,1 M NaCl, 0,05 M
Tris-HCl, pH 7,5, 1 mg/ml bovint serumalbumin) inkuberedes ved stuetempera-
10 tur. Til forskellige tidspunkter tilsattes en 100 µl sub-prøve til en fibrometerkop,
der allerede indeholdt 50 µl CaCl₂ (25 mM) og 50 µl kaninhjernecephalin (1:10
fortynding af stamopløsningen) ved 37 °C. 50 µl faktor X-deficient plasma tilsat-
tes herefter umiddelbart, og tiden for koageldannelse bestemtes på et fibrome-
15 ter (BBL, Cockeysville, MD, USA). Faktor Xa-aktivitet bestemtes ved at sammen-
ligne koaguleringstiderne med en standardkurve konstrueret under anvendelse
af fortyndinger af Xa i samme inkubationsblandinger, men uden TFI.

Thrombin-hæmning af TFI

Reaktionsblandinger indeholdende TFI (400 ng/ml) og thrombin (0,5 enhe-
der/ml, 180 ng/ml) blev inkuberet ved stuetemperatur i TBSA. Til forskellige tids-
20 punkter tilsattes en 100 µl sub-prøve til 100 µl 0,15 M NaCl, 6,6 g/l PEG-6000,
10 mM imidazol, 10 mM CaCl₂, pH 7,4, opvarmet til 37 °C. 50 µl fibrinogen (2
mg/ml) tilsattes umiddelbart herefter, og tiden for koageldannelse bestemtes på
et fibrometer. Relativ thrombin-aktivitet bestemtes under anvendelse af en
standardkurve, der var konstrueret med fortyndinger af thrombin.

Hæmning af TF med TFI

25 100 µl af en blanding indeholdende faktor VIIa (200 ng/ml), faktor Xa (200
ng/ml), CaCl₂ (8 mM) og TF (2 vol./vol.-%), der var inkuberet ved stuetempera-
tur i 1 minut, tilsattes til 100 µl TBSA indeholdende TFI (600 ng/ml) med eller
uden antithrombin IIIα (130 µg/ml) og heparin (1 enhed/ml). Til forudbestemte
tidspunkter herefter blev en 10 µl prøve udtaget og fortyndet 100 gange i TBSA
30 med 5 mM CaCl₂. Af praktiske hensyn henstod de fortyndede prøver fra tidlige-
re tidsudtagninger, indtil den sidste 1 minuts prøve var blevet opnået, og heref-

- ter undersøgtes alle for rest-TF-aktivitet under anvendelse af en 2-trins undersøgelsesmetode. 50 μ l faktor VIIa (1 μ g/ml), 50 μ l CaCl_2 (25 mM), 50 μ l fortyndet prøve og 50 μ l faktor X (10 μ g/ml) blev inkuberet ved 37 °C. Efter 1 minuts forløb tilsattes 50 μ l af en blanding indeholdende 10 dele faktor X-deficient plasma og 1 del kaninhjernecephalin-stamreagens (fremstillet som angivet af Sigma), og tiden for koageldannelse bestemtes med et fibrometer. Da denne TF-undersøgelsesmetode involverer en fortynding af prøven fra den oprindelige inkubationsblanding og en yderligere 1-2 minutters inkubation, betragtes de afledte hæmningsstørrelser som "tilsyneladende" størrelser.
- 10 Resultaterne af ovennævnte præparative arbejder i laboratoriemålestok, der førte til isoleringen og den funktionelle afprøvning af det rensede TFI, er yderligere eksemplificeret ved den detaljerede beskrivelse af tegningens fig. 1-7.

Fig. 1. Denne figur viser iPr_2P -faktor Xa-"Affi-Gel"-affinitetskromatografi. Det dialyserede TFI-præparat (ca. 100 ml) efter CdCl_2 -udfældning og ekstraktion påførtes en 1,5 x 40 cm søjle af iPr_2P -faktor Xa-"Affi-Gel 15" ækvilibreret i 0,1 M NaCl /0,05 M Tris-HCl, pH 7,5/0,5 mM EDTA/0,02% NaN_3 /0,1 mM phenylmethylsulfonylfluorid. Efter vask med startpuffer fortyndedes TFI med 2 M NaSCN /0,05 M Tris-HCl, pH 7,5/0,05 % Lubrol PX/0,1 mM phenylmethylsulfonylfluorid. Strømningshastigheden var 3 ml/time, og fraktionsstørrelsen var 4 ml. Prøver fortyndedes 500 gange til TFI-undersøgelse. Fraktionerne 66-70 blev hældt sammen.

Fig. 2. Denne figur viser "Sephadex G-75 superfine"-gelfiltreringen. Den koncentrerede prøve (ca. 1 ml) fra iPr_2P -faktor Xa-"Affi-Gel"-kromatografi påførtes en 1 x 120 cm søjle af "Sephadex G-75 superfine". Strømningshastigheden var 1,5 ml/time, og fraktionsstørrelsen var 1 ml. Prøver fortyndedes 2 000 gange til TFI-undersøgelse. Fraktionerne 34-41 blev hældt sammen.

Fig. 3. Denne figur viser Mono Q-ionbytterkromatografien. Efter acetoneudfældning solubileredes TFI med 6 M urinstof/0,02 M Tris-HCl, pH 8,3/0,05 % Lubrol PX og påførtes en 1 ml Mono Q-søjle ækvilibreret i samme puffer. Efter vask med startpuffer fremkaldtes søjlen med en 30 ml gradient fra startpuffer til slutpuffer (6 M urinstof/0,5 M Tris-HCl, pH 8,3, 0,05 % Lubrol PX). Strømningshastigheden var 20 ml/h, og fraktionsstørrelsen var 1 ml. Prøver fortyndedes

2 000 gange til TFI-prøvning. Horizontal fed streg angiver fraktioner, der er hældt sammen.

5 Fig. 4. Denne figur viser NaDodSO₄/PAGE af rensset TFI. Rensset TFI (3,75 µg pr. bane) underkastedes NaDodSO₄/PAGE enten ureduceret (2 baner) eller efter reduktion med 10% 2-mercaptoethanol (1 bane). (Øvre del) En af banerne indeholdende ureduceret TFI blev udkåret fra gelen og skåret i skiver, og TFI-aktiviteten ekstraheredes til undersøgelse. (Nedre del) Coomassie-blåfarvning af reduceret (R) og ureduceret (U) TFI. Start er til venstre.

10 Fig. 5. Denne figur viser en sammenligning af rensset TFI og normalt humant serum ved TFI-assay. Fortyndinger af rensset TFI blev undersøgt ved det funktionelle TFI-assay og sammenlignet med en standardkurve, der var konstrueret under anvendelse af normalt humant serum. Y-aksen er forlængelsen af koaguleringstiden i forhold til kontrolværdien (39 sekunder), og X-aksen er slutkoncentrationen af TFI (●, i ng/ml) eller normalt humant serum (○, i % vol./vol.) i
15 det første trin af assayet.

Fig. 6. Denne figur viser virkningen af TFI på faktor Xa og thrombin. Reaktionsblandinger indeholdende rensset TFI og enten Xa eller thrombin blev fremstillet som beskrevet ovenfor. Til forudbestemte tider blev prøver udtaget og undersøgt for rest-enzymaktivitet ved bioassay. □--□, thrombin; ●--●, Xa; ○--○, Xa
20 med phospholipider og Ca²⁺. I kontrolblandinger, der manglede TFI, var der intet tab af Xa- eller thrombinaktivitet (ikke vist).

Fig. 7. Denne figur viser hæmningen af vævsfaktor (TF) med TFI. Blandinger indeholdende VIIa (100 ng/ml), Xa (100 ng/ml), Ca²⁺ (4 mM), TF (1 % vol./vol.), TFI (300 ng/ml) med eller uden antithrombin IIIα (65 µg/ml) og heparin (0,5 enheder/ml) blev fremstillet ved stuetemperatur. Til forudbestemte tidspunkter blev prøver udtaget, fortyndet og undersøgt for tilbageværende TF-aktivitet. ○--○,
25 uden antithrombin IIIα eller heparin; ▽--▽, med heparin, men uden antithrombin IIIα; □--□, med antithrombin IIIα, men uden heparin; △--△, med antithrombin IIIα og heparin; åbne symboler på den øverste horisontale linie (100 % aktivitet) repræsenterer de respektive inkubationsblandinger uden TFI.
30

EKSEMPEL 2

Isolering af TFI fra det konditionerede substrat af HepG2-celler udførtes som beskrevet i eksempel 1, bortset fra følgende variationer:

1. Isolering udførtes i det væsentlige ved 3-trins metoden i stedet for den tidligere definerede 4-trins metode.
2. Ved CdCl₂-udfældningen, trin A, anvendtes et andet puffersystem (se nedenfor), og dialysen blev udeladt.
3. Faktor Xa-"Affi-Gel 15"-affinitetskromatografi i trin B under anvendelse af bovin faktor Xa uden binding til iPr₂P i stedet for den humane faktor Xa bundet til iPr₂P.
4. "Superose 12"-gel anvendtes i stedet for "Sephadex G-75"-gel ved gelfiltreringen i trin C.

Detaljeret beskrivelse af disse ændringer er angivet nedenfor:

HepG2-celle serumfrit konditioneret substrat (4 liter) centrifugeredes ved 2500 x g i 30 minutter for at fjerne småstykker. CdCl₂ (1,0 M) blev herefter tilsat til en slutkoncentration på 10 mM, og blandingen omrørtes i 30 minutter. Bundfaldet, der indeholdt TFI-aktiviteten, opsamledes ved centrifugering (10.000 x g i 20 minutter), og den supernatante del bortkastedes. Pelleten opløstes i 80 ml 0,5 N EDTA, 100 KI enheder/ml aprotonin (Sigma), pH 9,5, og det uopløselige materiale fjernedes ved centrifugering (10.000 x g i 20 minutter).

Bovin faktor X-rensning

Bovin faktor X blev oprenset fra bariumsulfateluatet af bovint plasma (Sigma Chemical Co., St. Louis). 40 enheder (hver fra 1 liter plasma) af eluatet blev genoplæsnet i 1,6 liter H₂O, og pH blev indstillet til 6,0 med HCl. Tørt benzamidin tilsattes til en slutkoncentration på 1 mM, og blandingen blev centrifugeret ved 10.000 x g og 4 °C for at fjerne uopløseligt materiale. Prøven blev herefter påført (100 ml/time) en 5 x 95 cm søjle af DEAE-"Sephacrose", der var bragt i ligevægt i 0,02 M natriumcitrat, 1 mM benzamidin, 0,02% NaN₃, pH 6,0 ved 4 °C. Efter vask af søjlen med 2 liter udgangspuffer blev den fremkaldt med en 15

liter gradient fra startpuffer til 0,8 M NaCl, 0,02 M natriumcitrat, 1 mM benzamidin, 0,02% NaN₃, pH 6,0. Fraktioner indeholdende bovin faktor X₁ og X₂, der eluerede efter protein C, men inden protein Z, blev slået sammen, koncentreret til ca. 40 ml (PM10, Amicon, Lexington, MA) og dialyseret i 0,1 M MOPS, pH 7,5. Udbyttet var 68 mg rensede faktor X. Faktor Xa frembragtes ved aktivering af faktor X med usolubileret XCP (faktor X-koagulantprotein fra Russell's hugormegift).

Bovine faktor Xa-"Affi-Gel"-affinitetskromatografi

Prøven blev fortyndet med samme volumen 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,2% Lubrol PX og påførtes med en strømningshastighed på 4 ml/time en 2 ml søjle af "Sephacrose 4 B"-agarose forbundet i serie med en 3 ml søjle af bovin faktor Xa-"Affi-Gel" der var bragt i ligevægt med 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% Lubrol PX. Søjlerne blev vasket med 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% Lubrol (20 ml) og derefter med 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 2% Lubrol PX (20 ml). "Sephacrose 4 B"-præ-søjlen blev herefter fjernet fra kredsløbet, og den bovine faktor Xa-"Affi-Gel"-søjle vasket yderligere med 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 2% β-octylglucosid (20 ml) og elueredes med 0,5 M benzamidin, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 2% 8-octylglucosid. Fraktioner indeholdende TFI, bestemt ved TFI-undersøgelse, blev slået sammen (fig. 8, fraktionerne 62-66) og koncentreret til ca. 0,4 ml under anvendelse af en YM5 membran (Amicon Corp., Danvers, Mass., USA). Den store mængde A₂₈₀ i de eluerede fraktioner skyldes benzamidin.

"Superose 12"-gel-filtrering

Den koncentrerede prøve (ca. 0,4 ml) påførtes to 25 ml "Superose 12"-søjler forbundet i serie, der var bragt i ligevægt i 1 M NaSCN, 2% 8-octylglucosid, 0,02 M MOPS, pH 7,9. Søjlerne blev fremkaldt med udgangspuffer med en gennemstrømningshastighed på 0,3 ml/minut. Fraktionerne 27-31 indeholdende TFI-aktivitet blev identificeret og hældt sammen (fig. 9).

Karakterisering af TFI

30 SDS-PAGE-natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgel-elektroforese af det reducerede rensede TFI-materiale afslørede et diffust bånd med en tilsyneladende

molekylvægt på 39 000 dalton, dersom der farvedes med sølvnitrat. Eluering af gelskiver viste, at funktionel TFI-aktivitet vandrede sammen med proteinbåndet (fig. 10).

Western-blot og farvning med ^{125}I -Xa

- 5 Det rensede materiale binder faktor X. Den sammenhældte TFI-mængde fra "Superose 12"-kromatografi blev underkastet SDS-PAGE og overført elektroforetisk til nitrocellulose. Efterfølgende inkubation af nitrocellulosen med ^{125}I -Xa viste, at det rensede protein binder faktor Xa (fig. 11)

- 10 Resultaterne af ovennævnte præparative arbejde i laboratoriemålestok i eksempel 2 fører til isolering af rensed TFI, og er nærmere beskrevet i omtalen af tegningens fig. 8 til 11.

- 15 Fig. 8. Denne figur viser den bovine faktor Xa-"Affi-Gel"-affinitetskromatografi. Fraktionerne 1 til 60 havde et volumen på 4 ml og fraktionerne 60 til 70 havde et volumen på 1 ml. Absorbans (A_{280}) er vist som ●--●; TFI-aktivitet af 1000 gange fortyndede prøver som o--o.

Fig. 9. Denne figur viser "Superose 12"-gel-filtreringen. Fraktionerne 27-31 indeholdende TFI-aktivitet blev hældt sammen og opbevaret ved $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Absorbans (A_{280}) er vist som en fuldt optrukken linie; TFI-aktivitet af 1.000 gange fortyndet prøve er vist som o--o.

- 20 Fig. 10 viser SDS-PAGE af reduceret, rensed TFI. Den rensede TFI (2 μg) blev underkastet NaDodSO₄/PAGE efterfulgt af reduktion med 10% 2-mercaptoethanol og sølvfarvning. Molekylvægt-markører i kilodalton er angivet i den venstre bane. Den højre bane viser et diffust bånd af reduceret TFI med en tilsyneladende molekylvægt på 39 000 dalton.

- 25 Fig. 11 viser SDS PAGE af ureduceret rensed TFI på det øvre blot, hvor det rensede TFI (2 μg) blev underkastet NaDodSO₄/PAGE og sølvfarvning. Det nedre ^{125}I -Xa-blot viser det ureducerede TFI (1 μg) elektroforetisk overført til nitrocellulose, farvet med ^{125}I -Xa og autoradiograferet. Den øvre del af figuren viser TFI-aktiviteten af ekstraherede celleskiver efter SDS-PAGE af 1 μg TFI.

EKSEMPEL 3

Isolering af TFI fra adskillige cellekilder, specielt Chang-leverceller, SK-HEP-I-celler og HepG2-celler udførtes ved immunoaffinitetskromatografi hvorved der som immunogenet anvendtes et syntetisk peptid med aminosyresekvensen 3-25 af det tidligere beskrevne modne TFI, på følgende måde:

Immunisering

Et TFI-peptid indeholdende en sekvens svarende til aminosyresekvensen 3-25 af det modne TFI blev syntetiseret under anvendelse af Biosystem's fastfase-peptidsyntesemetode. TFI-peptidet (5 mg) blev konjugeret til 10 mg albueskælhæmocytein med glutaraldehyd. To New Zealand hvide kaniner immuniseredes hver ved intradermal injektion med et homogenat indeholdende 1 ml Freund komplet adjuvans og 1 ml af konjugatet (200 µg TFI-peptid). En måned senere blev kaninerne hver boostet med et homogenat indeholdende 1 ml Freund ukomplet adjuvans og 1 ml af konjugatet (100 µg TFI-peptid). Antiserum blev indsamlet hver uge herefter. Booster-injektioner blev udført en gang om måneden, indtil kaninerne afblødtes efter 3 måneder.

Isolering af anti-TFI-peptid-Ig

Det syntetiske TFI-peptid (3 mg) kobledes til 0,8 g CNBr-aktiveret "Sephacryl® 4B" under anvendelse af producentens metode (Pharmacia). For at isolere specifikt antistof blev sammenhædt antiserum (15 ml) blandet med samme volumen af en opløsning (PNBT) indeholdende PBS, 0,4 M NaCl, 0,1 M benzamidin og 1 % "Triton® X-100" og kromatograferet på TFI-peptid-"Sephacryl 4B"-søjlen ved stuetemperatur. Søjlen blev vasket med 30 ml PNBT-opløsning og herefter med den samme opløsning uden "Triton X-100". Det bundne antistof blev elueret med 0,1 M glycin/HCl, pH 2,2, neutraliseret umiddelbart ved tilsætning af 1/10 volumen 1 M Tris-OH og dialyseret grundigt over for saltvandsopløsning. Omtrent 6,5 mg anti-TFI-peptid-Ig blev isoleret fra 15 ml antiserum.

Cellekultur

Chang-lever-, SK hepatoma- og HepG2-celler blev dyrket til sammenflydning i Dulbecco's modificerede Eagle's substrat (DMEM) tilsat 10 % fetalt bovint se-

rum, 50 enheder/ml penicillin og 50 µg/ml streptomycin i 175 cm² kolber. Fem kolber indeholdende hver slags celler blev trypsinbehandlet og anvendt til at pøde en 10-kammers cellefabrik (Nunc). Efter sammenflydning (ca. 1 uge) blev cellerne vasket to gange med PBS og inkuberet i et serumfrit substrat. Det serum-fri substrat bestod af DMEM tilsat 0,5 % lactalbumin-hydrolysat, 50 enheder/ml aprotinin, ITS præmix (insulin-transferrin-selen, Collaborative Research product), 20 ng/ml levercelle-vækstfaktor (glycyl-histidyl-lysin) og 100 ng/ml phorbol-12-myristat-13-acetat. Det serumfri substrat blev ombyttet med frisk substrat hver tredje dag. Cellerne kan holdes under disse betingelser i >2 måneder. De sammenhældte konditionerede substrater blev indstillet til 0,02 % NaN₃ og 0,01 % "Triton X-100" og opbevaret ved 4 °C. Visse substrater blev koncentreret 20 til 100 gange ved ultrafiltrering under anvendelse af Amicon's YM30 spiralmembransystem.

Immunoaffinitetsrensning af TFI

15 Isoleret anti-TFI-peptid-Ig (20 mg) blev koblet til 2 g CNBr-aktiveret "Sephacrose 4B" efter producentens instruktioner. Lejevolumenet af gelen var 7 ml. For at isolere TFI blev det konditionerede substrat (ukoncentreret eller koncentreret) fra Chang-lever-, SK-hepatoma- eller HepG2-celler kromatograferet på anti-TFI-peptid-Ig-"Sephacrose 4B"-søjlen med en hastighed på 2 ml/minut i kulden, indtil 20 signifikant TFI-aktivitet kom til syne i gennemløbet. Søjlen blev herefter vasket med 70 ml PNBT og 70 ml af samme opløsning uden "Triton X-100". Det bundne TFI blev elueret med 0,1 M glycin/HCl, pH 2,2, og koncentreret til omtrent 0,6 ml ved vakuumdialyse over for 0,1 M glycin/HCl, pH 2,2.

Resultater:

25 Ved immunoaffinitetskromatograf i på en anti-TFI-peptid-Ig-"Sephacrose 4B"-søjle isoleredes TFI fra en række leverafledte cellelinier, Chang-lever, SK-hepatoma og HepG2-heptaoma. Fig. 12(A) viser SDS-PAGE af proteinerne, der elueredes fra anti-TFI-peptid-Ig-"Sephacrose"-søjlen. I forskellige præparationer observeres noget forskellige proteinprofiler. I visse præparationer er et 40 kDa-protein det eneste hovedprotein (bane 4 og 5); i andre findes et antal proteinbånd sammen, og et 38 kDa-protein er et dominerende bånd i stedet for 40 kDa-proteinet. For at fastslå, hvilke proteiner, der er TFI-relaterede, udførtes 30 ¹²⁵I-Xa-bindingsundersøgelsen. De isolerede TFI-prøver blev underkastet elek-

troforese i en 12 % SDS-polyacrylamidgel, og proteinerne overførtes herefter ved elektroforetisk blot til et nitrocellulosepapir og undersøgte for ^{125}I -Xa-bindingsaktivitet. Det viste sig, at tre hovedbånd med tilsyneladende molekylvægte på 40, 38 og 25 kDa er i besiddelse af ^{125}I -Xa-bindingsaktivitet, mens andre bånd ikke er i besiddelse heraf. (Fig. 12(B)). Sekvensanalyse af 38 kDa-båndet fra SK-hepatoma-cellerne viser, at det har den samme aminoterminal sekvens som den 40 kDa TFI der blev isoleret fra HepG2-celler i eksempel 1 ovenfor. Baseret på immunoaffinitet, aminosyresekvensering og ^{125}I -Xa-bindingsstudier viser det sig, at 40, 38 og 25 kDa-inhibitorerne kan afledes fra det samme molekyle.

Resultaterne af ovennævnte præparative arbejde i laboratoriemålestok, der førte til isolering af TFI fra adskillige cellekilder ved immunoaffinitetskromatografi er nærmere beskrevet i den detaljerede omtale af tegningens fig. 12(A) og 12(B).

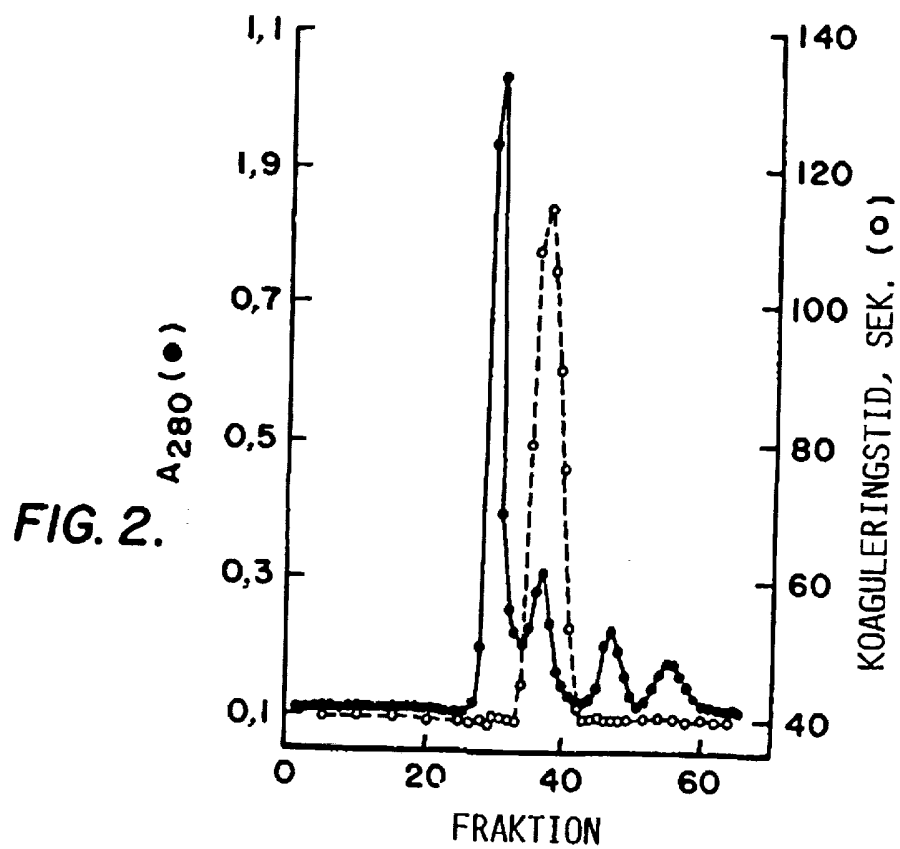
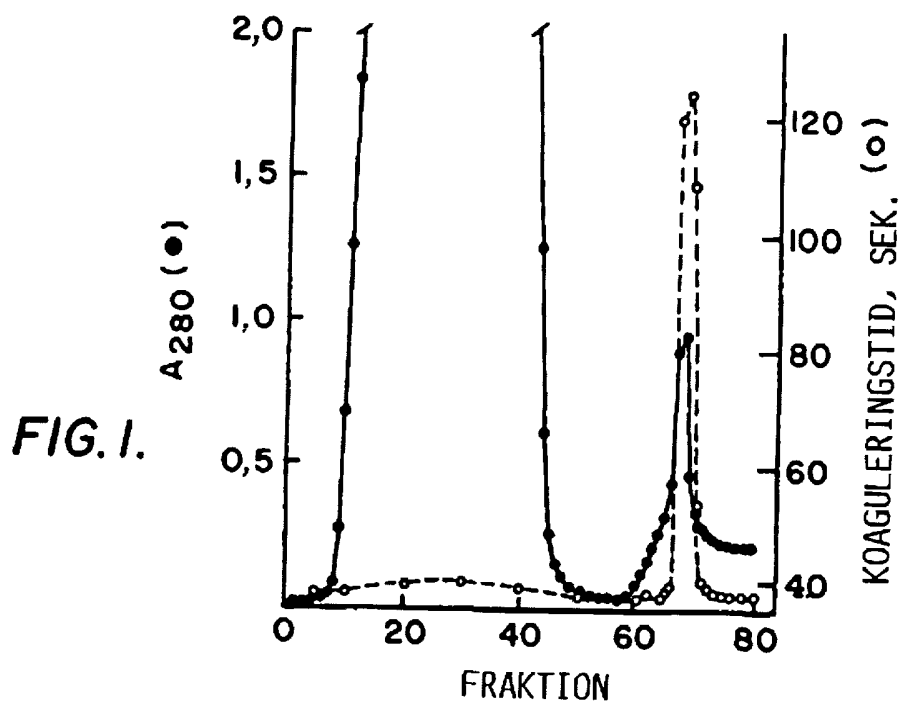
Fig. 12. Denne figur viser SDS-PAGE af immunoaffinitetsisoleret TFI og screening af ^{125}I -Xa-bindingsaktivitet. (A) SDS-PAGE. Elektroforese udførtes på en 12 % polyacrylamidgel. Bane 1, molekylvægtmarkører; bane 2, Chang-lever-TFI; bane 3, SK-hepatoma-TFI (præparation 1); bane 4, SK-hepatoma-TFI (præparation 2); bane 5, HepG2-TFI (præparation 1); bane 6, HepG2-TFI (præparation 2). (B) Screening af ^{125}I -Xa-bindingsaktivitet. Prøver blev underkastet elektroforese på en 12 % polyacrylamidgel. Proteinerne blottes elektroforetisk over på et nitrocellulosepapir under anvendelse af "Bio-Rad Trans-Blot"®-apparatet og metoden. Efter overførslen blev nitrocellulosepapiret først forsigtigt rystet i PBB-opløsning (PBS indeholdende 5 mg/ml BSA og 2,5 mg/ml bovint gammaglobulin) og derpå i PBB-opløsning indeholdende 400 ng/ml ^{125}I -Xa, hver ved stuetemperatur i 1 time. Herefter blev nitrocellulosepapiret tørret og autoradiograferet i 3 dage under anvendelse af Kodak XAR-5 film. Bane 1, Chang-lever-TFI; bane 2, SK-hepatoma-TFI (præparation 1); bane 3, SK-hepatoma-TFI (præparation 2) og bane 4, HepG2-TFI (præparation 2).

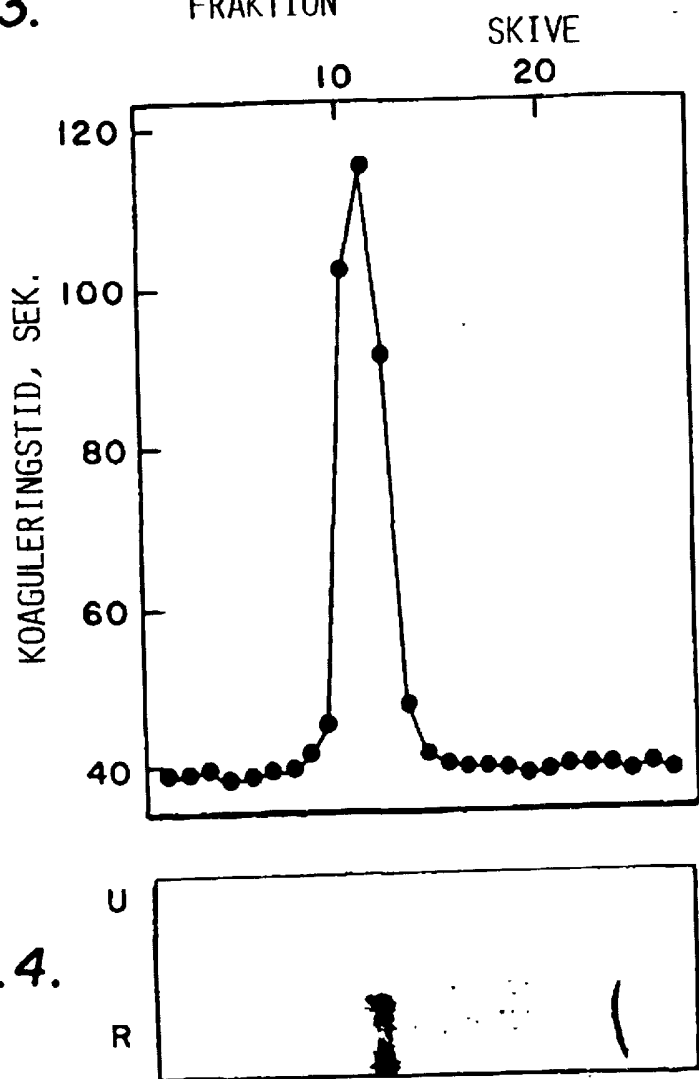
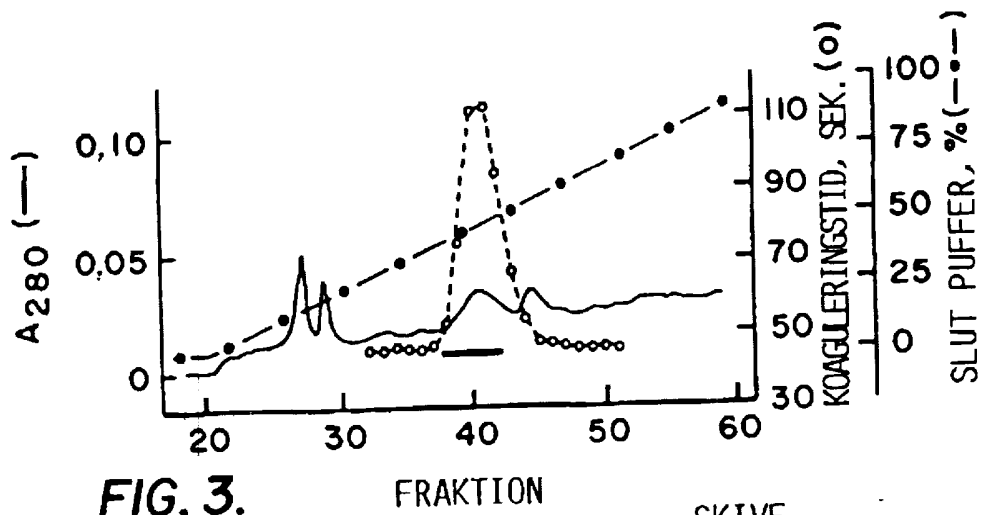
PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til isolering af vævsfaktorinhibitor (TFI) fra det konditionerede medium af en levercellelinie, **kendetegnet** ved, at det konditionerede medium underkastes immunoaffinitetsrensning med et anti-TFI-peptid-Ig rejst over for et peptidantigen omfattende aminosyresekvensen:

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

- 10 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at det konditionerede medium er opnået ved dyrkning af Chang leverceller eller SK-HEP-1 celler i kultur.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, **kendetegnet** ved, at immunoaffinitetsrensningen udføres som immunoaffinitetskromatografi på en anti-TFI-peptid-Ig-
- 15 "Sepharose® 4B"-søjle.
4. Anvendelse af vævsfaktorinhibitor opnået ved fremgangsmåden ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3 til fremstilling af et antithrombotisk lægemiddel.





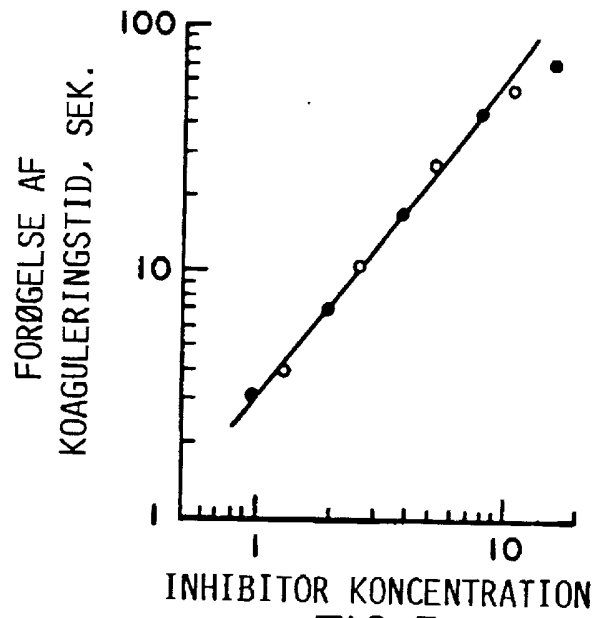


FIG. 5.

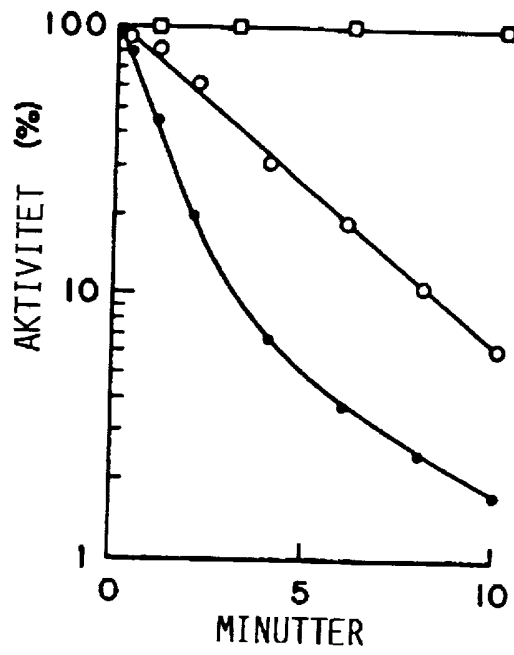


FIG. 6.

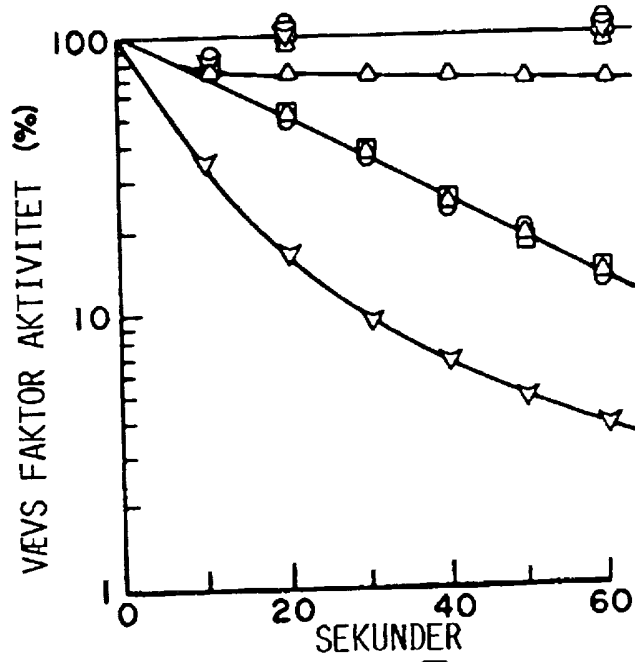


FIG. 7.

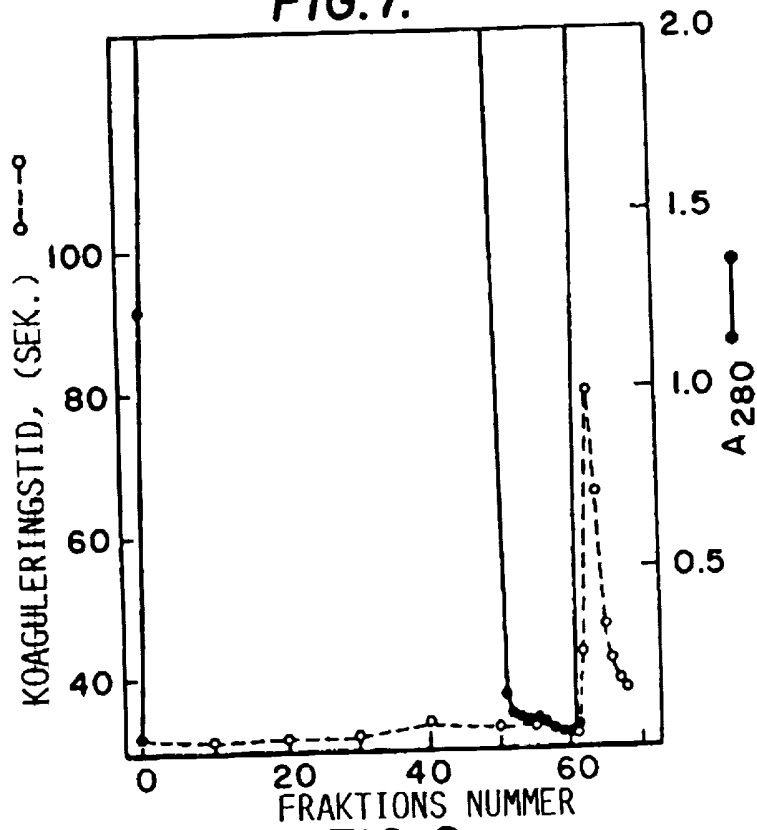
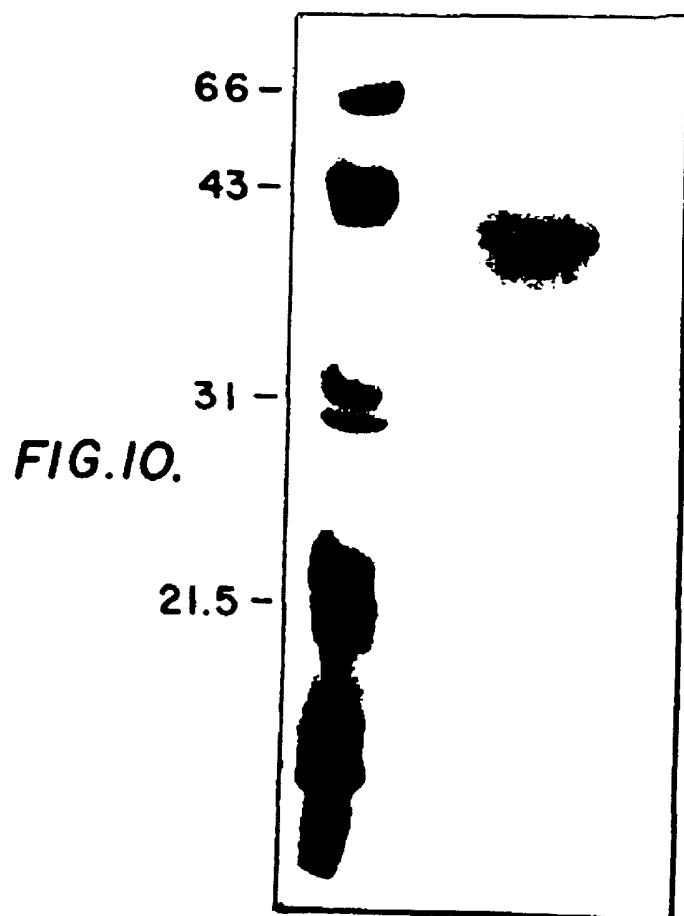
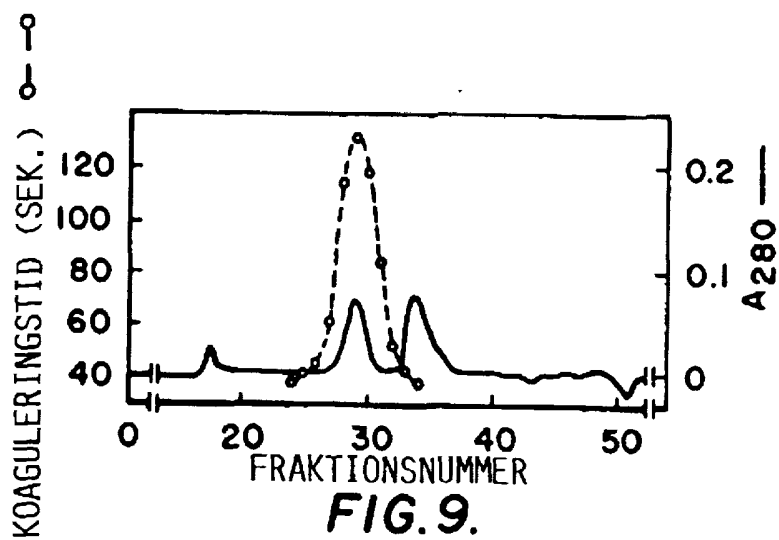


FIG. 8.



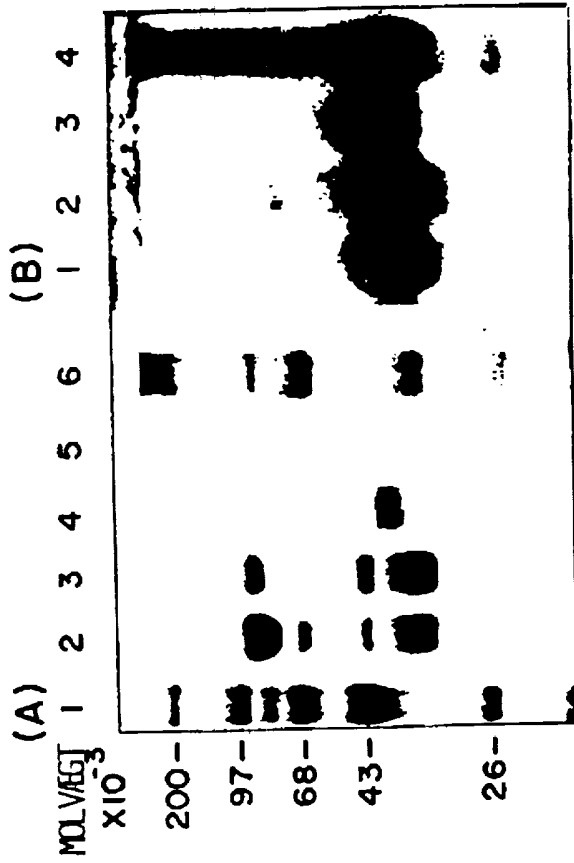


FIG. 12.

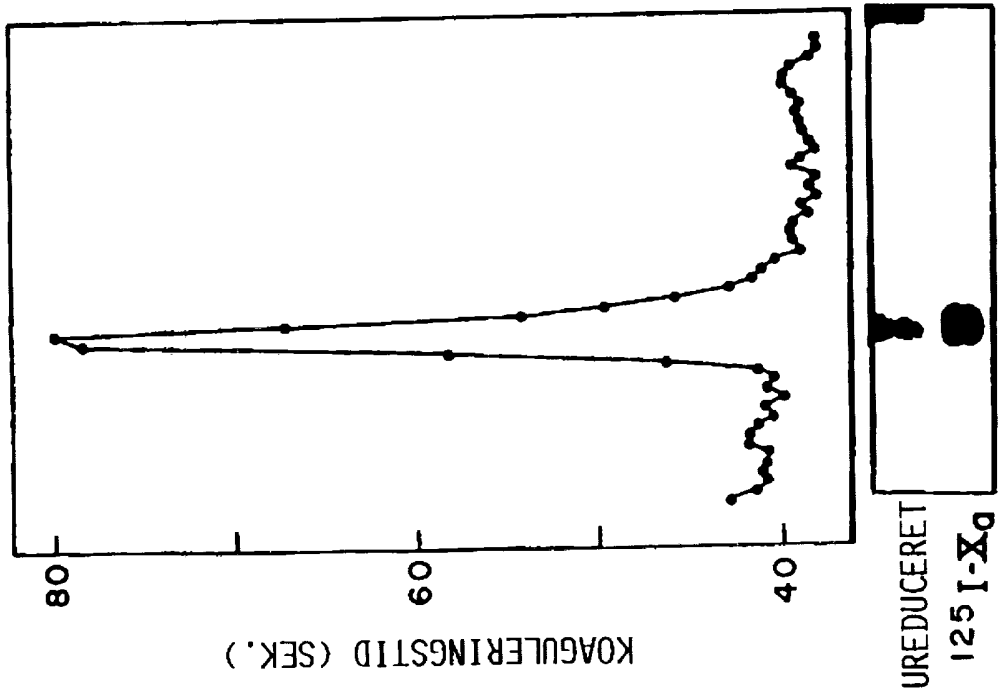


FIG. 11.