FI000108298B

(12) **PATENTTIJULKAISU**
**PATENTSKRIFT**

(10) **FI 108298 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **31.12.2001**

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

**C07K 14/435**, 1/00, G01N 33/68,
C12N 15/12, 15/70, 15/62, 1/20, 9/70, 9/72,
C12P 21/02, A61K 38/00, 51/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **925296**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **20.11.1992**

(24) Alkupäivä - Löpdag **21.05.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **20.11.1992**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/US91/03584**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

21.05.1990 US 526397 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS**
**PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN**

(73) Haltija - Innehavare

**1 •Bio-Technology General Corp.,** 1250 Broadway, New York, NY 10001, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •**Vogel,Tikva,** 4 Kosover Street, 76 100 Rehovot, ISRAEL, (IL)
2 •**Levanon,Avigdor,** 8, Mohliver Street, 76 100 Rehovot, ISRAEL, (IL)
3 •**Werber,Moshe,** 36, Burla Street, 61 999 Tel Aviv, ISRAEL, (IL)
4 •**Guy,Rachel,** 23, Miller Street, 76 100 Rehovot, ISRAEL, (IL)
5 •**Panet,Amos,** 11, Harav Schrim Street, 91 999 Jerusalem, ISRAEL, (IL)
6 •**Hartman,Jacob,** 30 Kedoshei Kahir Street, 58 100 Holon, ISRAEL, (IL)
7 •**Shaked,Hadassa,** 3, Tirza Street, 52 100 Ramat Gan, ISRAEL, (IL)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab
Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Fibriininsitomisaluepolypeptidit ja niiden käyttöjä ja valmistusmenetelmiä**
**Fibrinbindningsområdepolypeptider och deras användningar och förfaranden för deras framställning**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism:39384 ATCC, 39786 ATCC, 39788 ATCC 53217 ATCC, 53218 ATCC, 67359 ATCC, 67361 ATCC, 67362 ATCC, 67703 ATCC 67705 ATCC, 67706 ATCC, 67831 ATCC, 67832 ATCC, 67910 ATCC, 68328 ATCC 68456 ATCC, 68605 ATCC, 68606 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

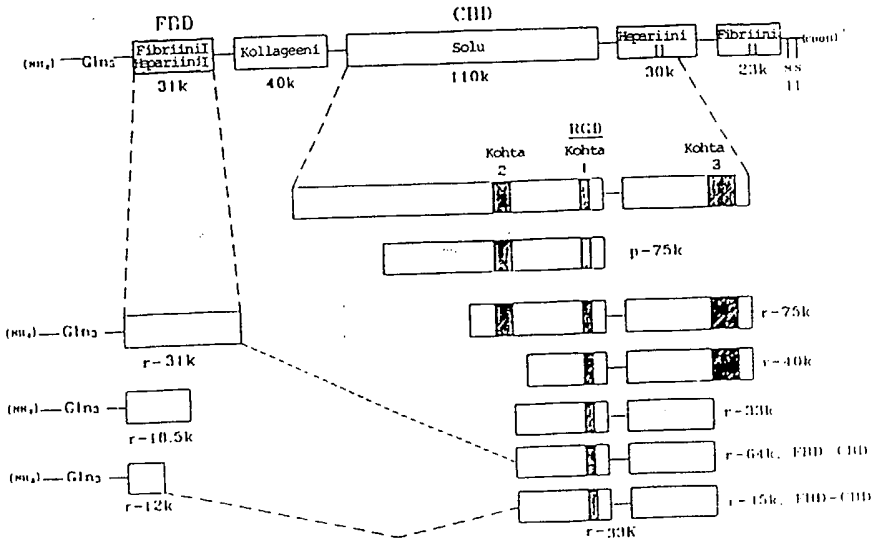
The EMBO journal, vol. 4, 1985, p. 1755-1759

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee kuvausainetta, joka käsittää polypeptidiä, joka on leimattu kuvattavalla merkkiaineella, kuten polypeptidillä, jolla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja voi sitoutua fibriiniin. Edelleen keksintö koskee menetelmää, jossa kuvausainetta käytetään kuvaamaan fibriiniä sisältävää ainetta, ts. veritulppaa tai ateroskleroottista täplää. Edelleen keksintö koskee polypeptidien ekspressiota varten tarkoitettuja plasmideja, joilla polypeptideillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja voi sitoutua fibriiniin, näitä plasmideja sisältäviä isäntiä, menetelmiä polypeptidien tuottamiseksi, hoitomenetelmiä polypeptidejä käyttäen, ja menetelmiä polypeptidien talteenottamiseksi, uudelleenlaskostamiseksi ja uudelleenhapettamiseksi.

Keksintö koskee myös puhdistettuja polypeptidejä, jotka ovat oleellisen vapaita muista ihmisperäisistä aineista, ja joilla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella, ja jotka voivat sitoutua fibriiniin.

Uppfinningen avser ett kontrastmedel, som innehåller en polypeptid, som har stämplats med ett bildbart spårämne såsom en polypeptid med aminosyrasekvens, som är väsentligt närvarande på fibrinbindningsområdet av naturligt förekommande humant fibronektin och kan binda sig till fibrin. Uppfinningen avser även ett förfarande, varvid kontrastmedlet används till att bilda ett ämne innehållande fibrin, med andra ord en blodpropp eller en atherosklerotisk prick. Uppfinningen avser också plasmider för exprimering av polypeptider med en aminosyrasekvens, som är väsentligt närvarande på fibrinbindningsområdet an naturligt förekommande humant fibronektin och kan binda sig till fibrin, värdar innehållande dessa plasmider, förfaranden för framställning av polypeptider, behandlingsförfaranden under användning av polypeptider, och förfaranden för tillvaratagande, omplissering och omoxidering av polypeptider. Uppfinningen avser också renade polypeptider som är väsentligt fria från andra humana ämnen och som har en aminosyrasekvens, som är väsentligt närvarande på fibrinbindningsområdet av naturligt förekommande humant fibronektin och som kan binda sig till fibrin.



# Fibriininsitomisaluepolypeptidit ja niiden käyttöjä ja valmistusmenetelmiä - Fibrinbindningsområdepolypeptider och deras användningar och förfaranden för deras framställning

Tämä patenttihakemus on jatkohakemus US-patenttihakemukselle 526397, jätetty 21.5.1990.

## Keksinnön tausta

Koko tässä patenttihakemuksessa eri julkaisuihin viitataan arabialaisilla numeroilla sulkujen sisällä. Näiden viitteiden täydelliset maininnat ovat selityksen lopussa välittömästi ennen patenttivaatimuksia. Näiden julkaisujen sisältö liitetään täten tähän kokonaisuudessaan viitteeksi, jotta kuvattaisiin täydellisemmin tekniikan taso, johon tämä keksintöä liittyy.

Endoteelin vaurion uskotaan olevan ensimmäinen vaihe veritulpan muodostumisessa, ja sen voi aiheuttaa esimerkiksi hemodynaaminen rasitus, kolesterolin lisääntynyt määrä veressä, liiallinen verenpaine ja immuunikompleksisairaus. Endoteelin vaurioituminen johtaa suonen sisäkalvon paksuuntumiseen, soluproliferaatioon, kolesterolin kertymiseen, ja sidekudoskuitujen muodostumiseen. On havaittu IgG:n ja komplementtitekijän C3 kertymistä vaurioituneisiin endoteelisoluihin ja endoteeliin kuulumattomiin sisäkalvoihin. Verestä peräisin olevat yksitumaiset solut ovat myös osa solupopulaatiota ateroskleroottisissa vammoissa. Täplän muodostumisen mekanismia ei tunneta täysin. Todennäköinen mekanismi on kuitenkin, että varhaisimmat vauriot, rasvaviirut, jotka koostuvat T-solujen ja yksitumaisista peräisin olevien makrofagien seoksista, muodostuvat endoteelin alla, minkä jälkeen seuraa erilaisten sytokiinien erittyminen, mikä johtaa sileiden solujen kulkeutumiseen suonen sisäkalvoon, ja niiden sinne kertymiseen.

Useimmat olemassa olevat menettelytavat ateroskleroosin ja

veritulpan diagnosoimiseksi ja hoitamiseksi ovat invasiivisia, kalliita, ja niillä on rajallinen tehokkuus merkittävässä %-osuudessa potilastapauksia.

Käsite täplän lisäämisestä väriä lisäämällä on kuvattu [Spears, J. et al., J. Clin. Invest. 71: 395-399 (1983)]. Nämä värit merkitsevät täplän pinnat fluoresoivalla yhdisteellä. On ehdotettu täplän hävittämistä hematoporfyriinijohdannaisten fotoaktivoinnilla käyttämällä intraluminaalista laseria lähettävää optista kuitua [Abela, G. et al., Am. J. Cardiol. 50: 1199-1205 (1982)]. Lisäksi on ehdotettu myös tetrasykliinivärejä. [Murphy-Chutorian, D. et al., Am. J. Cardiol. 55: 1293-1297 (1985)].

Edellä tunnistetut värit valittiin niiden kyvyn perusteella sitoutua ateroskleroottisen täplän komponentteihin. Periaatteessa väri absorboi laservaloa, joka konsentroi valon värjätyllä pinnalla. Tapahtuu jonkin verran terveen kudoksen värjäytymistä aiheuttaen väriin liittyvää vairiota ympäröivään kudokseen. Koska laservalon aallonpituus on rajoittunut värin aallonpituuteen, parhaiten kontrolloidun irtoamisen aikaansaamiseksi pn käytettävä kromoforeja, jotka tarjoavat laservalon optimaalisen absorption.

Sepelvaltimotukostena, keuhkoputkien tulppien, syvien laskimoiden veritulpan ja ateroskleroottisten vammojen kuvaus ja havaitseminen ovat kliinisesti hyvin tärkeitä erityisesti uusien veritulppia liuottavien aineiden valossa, jotka on viime aikoina kehitetty. On kuvattu useita kokeellisia lähestymistapoja veritulppien ei-invasiiviseen havaitsemiseen käyttämällä radiofarmaseuttisia aineita, mutta mikään ei ole saavuttanut laajaa kliinistä tunnustusta johtuen kuhunkin aineeseen liittyvistä myötäsyntyisistä haitoista.

Radiofarmaseuttisen aineen perusominaispiirteet verisuonen sisäisten ateroskleroottisten vaurioiden ja veritulppien varhaista havaitsemista varten ovat seuraavat: (i) suuri

affiniteetti veritulppakomponentteja kohtaan; (ii) suhteellisen suuri farmakokineettinen veripuhdistumanopeus [jotta saataisiin korkea veritulppa(sitoutunut)/veri(sitoutumaton)-radioleimatun merkkiaineen suhde]; (iii) turvallisuus: ei-toksinen ja ei-immunogeeninen; ja (iv) valmistuksen ja käytön helppous.

Kirjallisuudessa veritulppien kuvaukseen kuvatut eri aineet ja niiden haitat ovat seuraavia: (a) autologiset verihiutaleet leimattu $^{111}$In:llä: menettelytapa on hankala, aikaavievä, ja veripuhdistuma-aika on suhteellisen pitkä, nimittäin 2 päivää (2); (b) $^{131}$I-fibrinogeeni: määritys perustuu injisoidun radioleimatun fibrinogeenin (alhaiseen) affiniteettiin veritulppaa kohtaan, mutta se ei sovellu nopeisiin kuvaustesteihin johtuen pitkästä oleskeluajastaan veressä, ja lisäksi se ei mene vanhempii veritulppiin eikä mene veritulppiin hepariinin läsnä ollessa (3, 36); (c) ihmisen fibriinin fragmentti E1: vaikka se vaikuttaa ylivoimaiselta fibrinogeeniin verrattuna, sitä on vaikea valmistaa riittäviä määriä laajaa kliinistä käyttöä varten (4); (d) hiiren monoklonaaliset anti-fibriini-vasta-aineet: vaikka ne ovat spesifisiä ja niillä on suuret affiniteetit veritulppian varten, niillä on suhteellisen pitkä veripuhdistuma-aika, ja ne ovat mahdollisesti ihmiskohteille immunogeenisiä (5, 33, 34); (e) hiiren monoklonaaliset vasta-aineet, jotka ovat spesifisiä aktivoiduille verihiutaleille (6, 7): haitta kuten (d); ja (f) leimattu fibronektiini (1): vaikka fibronektiinilla (katso alla) on affiniteettia joukolle veritulpissa esiintyviä aineita kohtaan, sillä on suhteellisen pitkä veripuhdistuma-aika ja radioaktiivisuuden kehittyminen veritulpassa on hidasta. Siten tekniikan tasolla on tarvetta veritulppaspesifiselle radiofarmaseuttiselle aineelle veritulppien nopeaan kuvaukseen.

US-patenttijulkaisussa 4343734 (Lian et al.) kuvataan spesifiset gamma-karboksiglutamiinihappo(GLA)-vasta-aineet, jotka voidaan leimata fluoreskeiinilla kudoksen immunofluoresens-

sivärjäystä varten GLA:n läsnäolon määrittämiseksi siinä. Spesifiset GLA-vasta-aineet sitoutuvat GLA:han, joka on läsnä kehittyneessä ateroskleroottisessa täplässä, jossa on kalsiumkerrostumia. Lian et al. kuvaa, että GLA:ta ei esiinny kalkkiutumattomissa täplissä, ja että GLA:ta esiintyy sydänläpissä ja aortoissa, ja verenkierrossa olevissa proteiineissa kuten protrombiini, hyytymätekijät VII, IX ja X, proteiini C ja proteiini S. GLA:han sitoutuvat vasta-aineet, jotka Lian et al. kuvasi, eivät kuitenkaan sitoudu selektiivisesti ateroskleroositäpliin.

Fibronektiini on glykoproteiini, joka koostuu kahdesta identtisestä alayksiköstä, joiden molempien molekyylipaino on noin 220 000. Ihmissolut tuottavat viljelmässä ja in vivo kahta fibronektiinin tärkeintä muotoa (8). Soluun liittynyt fibronektiini on suhteellisen ei-liukoista ja ottaa osaa solun tarttumiseen, haavan paranemiseen, solun erilaistumiseen ja fagosytoosiin. Plasman fibronektiini, jota muodostuu pääasiassa maksassa, on liukoista seerumiproteiinia, jonka biologiset ominaisuudet ovat samanlaiset kuin solun fibronektiinin.

Fibronektiinia pidetään useita tehtäviä omaavana modulaarisena proteiinina, koska rajoittunut proteolyyttinen katkaisu tuottaa polypeptidejä, joilla on selvästi erottuvat aktiivisuudet. Fibronektiinimolekyylin tärkeimmät funktionaaliset alueet on saatu ja määritetty osittaisella proteolyyttisellä sulatuksella, ja niitä ovat mm. hepariini-, DNA:n-, fibriinin-, kollageenin- tai gelatiinin-, ja solunsitomisalueet (8 - 13).

EP-patenttijulkaisussa 207751, julkaistu 7.1.1989, Baralle, F.E., kuvataan fibronektiinin täydellinen cDNA-sekvenssi. Baralle kuvaa myös fuusioproteiinien ekspressiön, jotka proteiinit sisältävät osan fibronektiinin kollageeninsitomisalueesta fuusioituna Escherichia coli-proteiiniin ß-galaktosidaasi. Samanlaisia fuusioproteiineja kuvaavat Owens

ja Baralle (14). Obara et al. (1987) kuvaa ihmisen fibronektiinin solunsitomisalueen osan ekspression Escherichia colin ß-galaktosidaasiin fuusioituna (15). Lisäksi Obara et al. (1988) kuvaa solunsitomisalueen osan ekspression fuusioituna ß-galaktosidaasiin, jotka on mutagenisoitu, ts. solunsitomisalueen osan kohtaspesifisiä deleetioita saatiin fuusioituneina proteiineina (16). Ihmisen fibronektiinin karboksiterminaalinen fibriininsitomisalue on ekspressöity hiiren L-soluissa fuusioproteiinina ihmisen proteiini C-inhibiittorin signaalisekvenssin kanssa (17).

Missään edellä olevista viitteistä ei kuvata fibronektiinin N-terminaalisen fibriininsitomisalueen ekspressiota; lisäksi kaikki heidän kuvaamansa yhdistelmä-DNA-proteiinit ovat fuusioproteiineja.

Tämä keksintö aikaansaa polypeptidejä, joilla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä fibronektiinin N-terminaalisella fibriininsitomisalueella. Näillä polypeptideillä on likimääräiset molekyylipainot 31 kD, 20 kD, 18,5 kD ja 12 kD, määritettynä vertailumerkkiaineilla SDS-geeleillä pelkistävissä olosuhteissa, ja niillä on seuraavat ominaispiirteet, jotka tekevät niistä lupaavia farmaseuttisia aineita: (i) niillä on ihmisproteiinissa läsnä oleva aminohapposekvenssi, ja siten niitä pidetään ei-immunogeenisinä; (ii) niillä on spesifisyyttä fibriiniin perustuen niiden kykyyn ristiliittyä kovalenttisesti trans-glutaminaasikatalysoidussa reaktiossa syntymätilassa olevaan samoin kuin aikaisemmin muodostuneisiin veritulppiin (hyytymiin); (iii) sitoutuvat solunulkoiseen matriisiin, mitä ominaisuutta voidaanm hyödyntää ateroskleroottisten täplien havaitsemisessa; (iv) niillä on suhteellisen lyhyt veripuhdistuma-aika; (v) menevät verihyytymiin hepariinin läsnä ollessa; ja (vi) niitä tuotetaan yhdistelmä-DNA-tekniikoilla ja voidaan sen vuoksi mahdollisesti tuottaa suuressa mittakaavassa.

Tämä keksintö aikaansaa huokean, tarkan menetelmän fibriiniä sisältävien aineiden, ts. veritulpan ja ateroskleroottisen täplän kuvaamiseen sekä in vitro että in vivo. Lisäksi, tämä keksintö aikaansaa plasmideja polypeptidien ekspressöimiseksi, joissa on aminohapposekvenssi oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja jotka voivat sitoutua fibriiniin, jotka ovat leimattuja ja joita käytetään fibriinipitoisten aineiden kuvaamiseen, ja menetelmiä tällaisten polypeptidien valmistamiseksi.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö aikaansaa kuvausaineita, jotka sisältävät polypeptidejä, jotka on leimattu kuvattavalla merkkiaineella, jolloin tällaisella polypeptidillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja voi sitoutua fibriiniin.

Edelleen annetaan käyttöön menetelmä fibriiniä sisältävän aineen, ts. veritulpan tai ateroskleroottisen täplän kuvaamiseen, jossa menetelmässä kuvattava fibriiniä sisältävä aine saatetaan kontaktiin edellä kuvatun kuvausaineen kanssa sellaisissa olosuhteissa, että aine sitoutuu fibriiniä sisältävään aineeseen ja kuvataan sitoutunut aine ja kuvataan täten fibriiniä sisältävä aine.

Annetaan myös käyttöön plasmidi polypeptidin ekspressioon, jolla polypeptidillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja joka voi sitoutua fibriiniin, joka plasmidi sisältää DNA:ta, joka koodittaa polypeptidiä ja DNA koodittaa sopivia säätelyelementtejä, jotka sijaitsevat suhteessa polypeptidiä koodittavaan DNA:han niin, että se aikaansaa polypeptidin ekspression sopivassa isäntäsolussa.

Keksintö aikaansaa myös puhdistetun polypeptidin, joka on oleellisen vapaata muista ihmisperäisistä aineista, ja jolla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja joka voi sitoutua fibriiniin.

Edelleen anetaan käyttöön menetelmiä tällaisten polypeptidien talteenottoon ja uudelleenlaskostukseen ja uudelleenhapetukseen, ja hoitomenetelmiä tällaisten polypeptidien käyttämiseksi.

Kuvioiden lyhyt kuvaus

Kuvioissa määrättyjen esitettyjen restriktioentsyymikohtien vieressä suluissa olevat numerot vastaavat identtisesti numberoituja asemia pitkin kuviossa 2 esitettyä ihmis-fibronektiini-cDNA:n nukleotidisekvenssiä (katso myös kuviota 3 EP-patenttijulkaisussa 207751, julkaistu 7.1.1987, Baralle, F.E.)

Seuraavat kuviot kuvaavat plasmidien konstruointia, jotka plasmidit ekspressöivät polypeptidejä, joilla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä fibronektiinin aminoterminaalisella fibriininsitomisalueella (FBD). FBD alkaa kypsän fibronektiinin aminohaposta numero 1, joka on glutamiini ja vastaa neljättä kuviossa 2A esitettyä aminohappoa (Q), ts. FBD-sekvenssin N-terminaalinen pää on Q-A-Q-Q (glutamiini-alaniini-glutamiini-glutamiini); vastaava ensimmäinen nukleotidi kuvion 2A cDNA-sekvenssissä on sen vuoksi numbero 14, joka ilmaistaan nuolella. Kaikki näissä kuvioissa ja koko selityksessä kuvatut yhdistelmä-DNA-FBD-polypeptidit on numeroitu tästä ensimmäisestä glutamiinista aminohappona numero 1, ja kaikki vastaavat cDNA-sekvenssit numeroidaan kuviossa 2 esitetyllä tavalla.

Jotkin kuvioista kuvaavat plasmidien konstruoinnin, jotka ekspressöivät FBD-polypeptidiä, joka on liittynyt C-terminaalisessa päässään fibronektiinin solunsitomisalueen

osaan (CBD). CBD:tä vastaavasta cDNA-sekvenssistä, jonka keksinnön hakijat ovat kloonanneet ja ekspressoineet, puuttuu 270 emäsparin ylimääräisen alueen (ED) segmentti, joka yltää nukleotidista 4811 nukleotidiin 5080, mukaan lukien, on Baralle-kartalla (katso kuviota 2). Siten cDNA-sekvenssi, jonka sanotaan yltävän nukleotidista 3317 nukleotidiin 5566 Baralle-kartalla, sisältää vain 1980 nukleotidia, koska siitä puuttuu ED-segmentin 270 nukleotidia, ts. nukleotidista 4811 nukleotidiin 5080 mukaan lukien; tämä alue tunnetaan tekniikan alalla myös ED-A-alueena. Koska nukleotidi 5081 on muuttunut G:stä A:han, aminohappo 1690 on muuttunut alaniinista treoniiniksi. Samalla lailla tämän DNA-fragmentin ekspressöimä polypeptidi koodittaisi aminohaposta 1102 aminohappoon 1851 Baralle-kartalla, mutta siitä puuttuisi ED-alueen koodittamat 90 aminohappoa, ts. aminohapot 1600 - 1689 mukaan lukien, ja sisältäisi siten vain 660 aminohappoa. Tämä pätee kaikille tässä patenttihakemuksessa kuvatuille CBD-polypeptideille, jotka yltävät ED-alueen yli. (Alue, joka tunnetaan alalla ED-B-alueena, puuttuu sekä Baralle'n sekvenssistä että hakijoiden DNA:sta.)

31-kD, 20-kD, 18,5-kD, 12-kD ja-33 kD peptideinä ekspressöityjen polypeptidien määritelmä on operationaalinen määritelmä, joka perustuu niiden likimääräiseen molekyylipainoon määritettynä SDS-polyakryyliamidigeeleillä pelkistävissä olosuhteissa verrattuna tunnetun molekyylipainon omaaviin merkkiaineisiin.

Kuvio 1. Tässä kuviossa esitetään kaaviomaisesti erilaiset fibronektiinialueet ja konstruoidut yhdistelmä-DNA-polypeptidit.

Kuvio 2. Tässä kuviossa esitetään ihmis-fibronektiini-cDNA:n nukleotidisekvenssi.

Kuvio 3. Valmistettiin seitsemän paria kemiallisesti syntetisoituja oligomeerejä. Synteettiset oligomeerit koodittavat

ihmis-fibronektiinin (FN) ensimmäisiä 153 N-terminaalista aminohappoa. Tässä kuviossa esitetään näiden seitsemän synteettisen oligomeerin parin sekvenssi.

Kuvio 4. DNA-fragmentti, joka koodittaa ihmis-FN:n N-terminaalisen alueen aminohappoja 1 - 153, koottiin kuviossa 3 esitetyistä seitsemästä kemiallisesti syntetisoidun oligomeerin parista:

Oligomeerit 3/4, 5/6, 7/8 ja 9/10, kukin pari erillisessa putkessa, emäspariutettiin ja sitten fosforyloitiin 5'-päähän T4-polynukleotidikinaasientsyymiä käyttäen.

Toisessa vaiheessa parit 3/4 ja 5/6 liitettiin toisiinsa T4 DNA-ligaasia käyttäen. Samalla lailla reaktioparit 7/8 ja 9/10 liitettiin toisiinsa. Kummankin liittämisvaiheen jälkeen erä liittämisseosta analysoitiin geelillä juuri muodostuneiden fragmenttien koon ja liittämisen tehokkuuden määrittämiseksi.

Kolmannessa vaiheessa kaksi edellä mainittua liittämisseosta sekoitettiin yhteen, ja pari 6, oligomeerit 11/12, jotka oli emäspariutetty ja fosforyloitu aikaisemmin erillisessä putkessä, lisättiin seokseen. 326 emäsparin DNA-fragmentti, joka saatiin edellä olevasta liittämisseoksesta, eristettiin agaroosigeelistä ja puhdistettiin.

Puhdistettu synteettinen 326 emäsparin fragmentti lisättiin kahteen muuhun synteettisten linkkerien pariin: pari 1, oligomeerit 1/2 ja pari 7 oligomeerit 13/14. Parissa 1 vain oligomeeri 2 oli fosforyloitu 5'-päässä ja parissa 7 vain oligomeeri 13 oli fosforyloitu 5'-päässä.

T4 DNA-ligaasilla liittämisen jälkeen seos eristämättä edelleen lisättiin pBR322-vektori-DNA:han, joka oli sulatettu EcoRI- ja BamHI-endonukleaaseilla.

Saatu plasmidi, jota merkittiin pFN 932-18, sisälsi koko synteettisen EcoRI(5'-pää)/BamHI(3'-pää)-restriktiofragmentin, joka koodittaa ihmis-FN:n 153 N-terminaalista aminohappoa pBR322-vektorissa.

Kuvio 5. FN:n 153 N-terminaalisen aminohapon sekvenssin ekspressio.

Plasmidi pFN 932-18 sulatettiin NdeI- ja BamHI-endonukleaaseilla. NdeI/BamHI-DNA-fragmentti, joka koodittaa FN:ää (153 ensimmäistä aminohappoa + lisäksi N-terminaalista metioniinia) eristettiin ja liitettiin suureen fragmenttiin, joka saatiin sulattamalla plasmidin pTV301 NdeI- ja BglII-endonukleaaseilla. (Plasmidi pTV301 ekspressöi ihmisen kasvuhormonia, hGH, λ-$P_L$-promoottorin ja cII-RBS:n kontrollin alla).

Saatua plasmidia kutsuttiin nimellä pFN949-2.

Kuvio 6.
Lopetuskodonin TAA insertointi FN:n N-terminaalisen alueen 3'-päähän (aminohapon 262 kohdalle)

Synteettinen oligonukleotidi, joka sisältää TAA-lopetuskodonin ja BglII-kohdan, jolla on seuraava sekvenssi:

CTGTTTAAGCA
GACAAATTCGTCTAG

liitettiin 3'-päähän (PvuII-kohtaan) EcoRI/PvuII-FN-fragmenttiin, joka eristettiin cDNA-plasmidista p931-5 (katso kuviota 6), sulattiin EcoRI:llä ja PvuII:lla. Liittäminen suoritettiin EcoRI:llä ja BamHI:llä sulatetun DNA-vektoriplasmidin pBR322 (suuri fragmentti) läsnä ollessa. Saatua plasmidia merkittiin pFN935-12.

Kuvio 7.

Fibronektiinin (FN) ja r31 kD FBD:n farmakokinetiikan vertailu rotissa

$^{125}$I-FN:ää (0,1 mg/kg; 5 x $10^6$ cpm) tai $^{125}$I-r31 FBD:tä (0,1 mg/kg;

5 x 106 cpm) injisoitiin laskimonsisäisesti, ja otettiin verinäytteitä ilmoitettuna ajankohtana. Liukenematon radioaktiivisuus verinäytteissä määritettiin trikloorietikkahapposaostuksella; ajankohdalla 0, arvo 100 % vastaa 40 000 cpm/ml FN:llä ja 46 000 cpm/ml FBD:llä.

Kuvio 8. S. aureus'in sitoutuminen katetreihin

3,0 x 106 PFU/ml $^{125}$I-S. aureus'in (1 CPM/3 PFU) sitominen muovisiin keuhkoputkikatetreihin (3 cm kutakin reaktiota varten, rinnakkaisin), jotka oli päällystetty FN:llä suoritettiin menetelmissä kuvatulla tavalla. Vertailureaktioita suoritettaessa bakteereja ja lisättyä proteiinia esi-inkuboitiin huoneenlämpötilassa 30 min ajan ja lisättiin sitten katetreihin inkuboitavaksi edelleen menetelmät-kappaleessa kuvatulla tavalla.

Kilpailureaktioihin käytetyt polypeptidit olivat: P-31 (p31 kD), r-20 (20-kD yhdistelmä-DNA-FBD-polypeptidifragmentti) ja r-31 (uudelleenhapetettu ja uudelleenlaskostettu r31kD). Jotkin reaktioista (katso kuviota) mitattiin, kun läsnä oli 5 $\mu$M hepariinia (sian ohutsuolen limakalvosta, molekyylipaino 10 000; Sigma).

"Kontrolli"-reaktion sitoutuminen kilpailevien aineiden puuttuessa (8,8 % syötettyä bakteeria) normalisoitiin 100 %:iin.

Kuvio 9.

Fibronektiinialueiden yhdistelmä-DNA-polypeptidit täysimittaiseen fibronektiiniin verrattuna

Tässä kuviossa esitetään rinnakkain erilaisia yhdistelmä-DNA-polypeptidejä koodittavia cDNA-klooneja suhteessa toisiinsa ja fibronektiini-cDNA:n täysimittaiseen sekvenssiin

ja kaavamaiseen esitykseen ihmis-fibronektiinimolekyylin sisällä läsnä oleviin erilaisiin alueisiin.

Kuvio 10.

r12 kD FBD-polypeptidiä ekspressöivän plasmidin pFN 196-2 konstruointi

Suuri BspMI/HindIII-fragmentti, joka saatiin sulattamalla plasmidin pFN 975-25 (Kuvio 10) BspMI:llä ja HindIII:llä, liitettiin T4 DNA-ligaasilla linkkerien A synteettisellä parilla (katso kuviota 15). Plasmidi pFN 196-2 tuotettiin, transformoitiin Escherichia coli-kantaan A1645 ja transformoitiin uudelleen Escherichia coli-kantaan A4255. Plasmidi pFN 196-2 sisältää fibronektiini-cDNA:n 5'-terminaalisen sekvenssin nukleotidista 14 nukleotidiin 340, ts. se koodittaa ensimmäisiä 109 aminohappoa fibronektiinin FBD:stä päättyen arginiinitähteeseen. Lopullisessa polypeptidissä on läsnä N-terminaalinen lisämetioniini. Plasmidi pFN 196-2 antaa r12 kD FBD-polypeptidin hyvän ekspression λ-promoottorin ja ß-laktamaasin ribosomaalisen sitomiskohdan kontrollin alla, ja se on talletettu kansainväliseen talletuslaitokseen the ATCC tulonumerolla 68328.

Kuvio 11.

Plasmidin pFN 197-10 konstruointi, joka ekspressöi modifioitua 12-kD FBD-polypeptidiä (12 kD')

Plasmidi pFN 975-25 käsiteltiin kuten kuviossa 10 paitsi, että käytettiin erilaista linkkerien paria, B (katso kuviota 15). Liittäminen tuotti plasmidin pFN 197-10, joka koodittaa FN:n FBD:n N-terminaalista sekvenssiä; kuitenkin, modifikaatio nukleotidin 340 jälkeen NdeI-kohdan (CATATG) tuottamiseksi ennen lopetuskodonia antaa tulokseksi polypeptidin koodittamisen, joka sisältää 111 aminohappoa, jossa ensimmäiset 109 aminohappoa vastaavat r12 kD-polypeptidin 109 ensimmäistä aminohappoa, joiden jälkeen seuraavat lisäaminohappotähteet, ts. histidiini ja metioniini. N-terminaalinen lisämetioniinitähde on läsnä lopullisessa polypeptidissä. Plasmidi pFN 197-10 transformoitiin Escherichia coli-

kantaan A1645 ja sitten Escherichia coli-kantaan A4255, ja se antoi modifioidun r12 kD (12 kD') FBD-polypeptidin hyvän ekspression λ-promoottorin ja ß-laktamaasin ribosomaalisen sitoutumiskohdan kontrollin alla.

Kuvio 12.
Fibronektiinin r33 kD solunsitoutumisalueeseen (CBD) fuusioitua 12 kD' FBD:tä ekspressöivän plasmidin pFN 202-5 konstruointi

Suuri fragmentti, joka muodostui plasmidin pFN 197-10 NdeI- ja HindIII-sulatuksen jälkeen (kuvio 11), liitettiin T4 DNA-ligaasilla plasmidin pFN 137-2 NdeI/HindIII-CBD(solunsitomisalue)-fragmenttiin. Plasmidi pFN 137-2, joka on talletettu kansainväliseen talletuslaitokseen the ATCC tulonumerolla 67910, on kuvattu kantapatenttihakemuksessa, US-patenttihakemuksessa 345952; r33 kD CBD-sekvenssi sisältää fibronektiinin aminohapponumerot 1329 - 1722 (katso kuviota 2), lukuunottamatta 90 aminohappoa numeroita 1600 - 1689, joita koodittaa ED-A-alue (katso kuvioiden lyhyen kuvauksen johdantoa).

Tulokseksi saatu plasmidi, pFN 202-5, transformoitiin Escherichia coli-kantaan A1645 ja sitten Escherichia coli-kantaan A4255. Plasmidi pFN 202-5 sisältää plasmidin pFN 197-10 koodittaman 111 aminohapon cDNA-sekvenssin, minkä jälkeen seuraa cDNA-sekvenssi r33 kD CBD:tä varten alkaen seriinin (r33 kD CBD:n ensimmäisen aminohapon kodonilla. Tämä plasmidi antoi noin 45-kD polypeptidin hyvän ekspression, joka polypeptidi sisälsi r12 kD fibriininsitomisalueen ja 33-kD fibronektiinin solunsitomisalueen; tämä fuusioitu polypeptidi ekspressöityi λ-promoottorin ja ß-laktamaasin ribosomaalisen sitoutumiskohdan kontrollin alla.

Kuvio 13.
Plasmidin pFN 195-4 konstruointi, joka plasmidi ekspressöi r31 kD FBD:tä fuusioituna sekvenssiin DGRGDS
Eristettiin suuri fragmentti, joka saatiin sulattamalla

plasmidin pFN 975-25 PvuII:lla ja HindIII:lla, ja liitettiin T4 DNA-ligaasilla synteettisten linkkerien pariin, C (katso kuviota 15). Tulokseksi saatu plasmidi, jota merkitään pFN 195-4, transformoitiin Escherichia coli-kantaan A1645 ja sitten Escherichia coli-kantaan A4255. Plasmidi pFN 195-4 sisältää täysimittaisen FBD-cDNA-sekvenssin nukleotidista 14 nukleotidiin 793 (koodittaen 260 aminohappoa), jonka jälkeen seuraa sekvenssi, joka koodittaa peptidisekvenssiä asp-gly-arg-gly-asp-ser, ts. kooditetussa polypeptidissä on yhteensä 260 aminohappoa, minkä jälkeen seuraa sekvenssi DGRGDS. Lopullisessa polypeptidissä on läsnä N-terminaalinen metioniinilisätähde. Plasmidi pFN 195-4 ekspressöi hyvin r31 kD fibriininsitomisaluetta fuusioituna sekvenssiin asp-gly-arg-gly-asp-ser (DGRGDS) λ-promoottorin ja ß-laktamaasin ribosomaalisen sitomiskohdan kontrollin alla.

Kuvio 14.

Fuusioitua 31-kD FBD-33 kD CBD-polypeptidiä ekspressöivän plasmidin pFN 194-2 konstruointi

Eristettiin suuri PvuII/HindIII-fragmentti, joka tuotettiin sulattamalla plasmidin pFN 975-25 PvuII:lla ja HindIII:lla ja liitettiin T4 DNA-ligaasilla linkkerien pariin, D (kuvio 15) ja liitettiin sitten solunsitomisalue (CBD)-fragmenttiin, joka saatiin sulattamalla plasmidi pFN 137-2 (ATCC tulonumero 67910) NdeI:llä ja HindIII:lla; katso kuviota 12 CBD-alueen määrittelyä varten. Tulokseksi saatu plasmidi, jota merkitään pFN 194-2, transformoitiin Escherichia coli-kantaan A1645 ja sitten Escherichia coli-kantaan A4255. Plasmidilla pFN 194-2 on alhainen ekspressio fuusioidulle r31 kD FBD-r33 kD CBD-polypeptidille, jonka likimääräinen molekyylipaino on 64 kD, λ-$P_L$-promoottorin ja ß-laktamaasin ribosomaalisen sitomiskohdan kontrollin alla. Plasmidin pFN 194-2 koodittama polypeptidi sisältää DNA:n, joka koodittaa fibronektiinin 265 ensimmäistä aminohappoa fuusioituna metioniinikodoniin, jonka jälkeen seuraa cDNA-sekvenssi fibronektiinin CBD:tä varten, alkaen aminohappo seriinin kodonista CBD:n asemassa 1.

Ammattimies tietää kuinka saavutetaan plasmidin pFN 194-2 ekspressöimän polypeptidin suuri ekspressiö. Eräs esimerkki tällaisesta runsaasti ekspressöivästä on plasmidi pFN 205-5, joka kuvataan kuviossa 25.

Kuvio 15.
Plasmidien konstruointiin käytetyt oligonukleotidilinkkerit
Valmistettiin neljä kemiallisesti syntetisoitujen oligomeerien (A, B, C ja D) paria ja käytettiin konstruoimaan plasmidit, jotka kuvataan kuvioissa 10, 11, 13 ja 14, vastaavasti).

Kuvio 16.
Leimatun r31 kD FBD:n vastaanotto ruostumattomasta teräksestä olevalla silmukalla indusoituihin laskimoveritulppiin
Pylväät ja pystysuorat sulut edustavat keskiarvoa ± SEM (N = 10) spesifisestä radioaktiivisuudesta, joka liittyy eristettyihin veritulppiin, laskimosegmentteihin, jotka sisältävät veritulpan ("veritulpat in situ"), tai ääreisveren näytteisiin 24 tuntia 31-kD $^{125}$I-FBD:n annon jälkeen. Katso yksityiskohtia varten esimerkin 7 kappaletta A.

Kuvio 17.
Leimattujen r12 kD, r20 kD ja r31 kD FBD-polypeptidien vertailu rotan laskimoveritulppamallissa
Pylväät ja pystysuorat sulut edustavat keskiarvoa ± SEM (N = 5) spesifisestä radioaktiivisuudesta, joka liittyy eristettyihin veritulppiin (T) tai vereen (B) 24 tuntia $^{125}$I-leimattujen yhdistelmä-DNA-polypeptidien annon jälkeen, kuten ilmaistaan. Katso yksityiskohtia varten esimerkin 7 kappaletta B.

Kuvio 18.
$^{125}$I-leimatun r31 kD FBD:n metabolinen stabiilisuus rotissa
Rotat injisoitiin laskimonsisäisesti $^{125}$I-r31 kD FBD:llä (5 x $10^6$ cpm/rotta) samanlaisessa kokeessa kuin kuviossa 7 kuvattu. Ilmaistuilla aikaväleillä otettiin verinäytteitä, lisät-

tiin putkiin, jotka sisälsivät natriumsitraattia (lopullinen natriumsitraattikonsentraatio = 0,38 %), ja tulokseksi saadut verierät käsiteltiin seuraavalla tavalla: joko (a) käsiteltiin 20-% TCA:lla, ja mitattiin TCA:han liukenemattoman aineen radioaktiivisuus (TCA-saostuksen jälkeen); tai (b) inkuboitiin ennalta muodostetun hyytymän kanssa (käyttäen 20 µl kokoverta kontrollirotasta); $^{125}$I-31 kD FBD:n sitoutuminen ennalta muodostettuun hyytymään mitattiin 2-vaiheisen reaktion II (Esimerkki 6) olosuhteissa. Radioaktiivisuus mitattiin gammalaskurilla, ja kunkin näytteen aktiivisuus laskettiin %-osuutena reaktioseoksessa läsnä olevasta kokonaisaktiivisuudesta. (Normaalisti TCA-saostukseen liittyy näyteerän sijoittaminen suodattimille, joista lasketaan kokonaisradioaktiivisuus, pesten suodattimen kolmesti 20-% TCA:lla, sen jälkeen kahdesti 20-% etanolilla TCA:n uuttamiseksi, ja lasketaan suodattimet TCA-liukenematonta aktiivisuutta varten, jolloin voidaan laskea TCA-liukenematon aktiivisuus.)

Kuvio 19.

Fibriininsitomisaluepolypeptidien sitoutuminen fibriinihyytymään

Tämä koe suoritettiin oleellisesti 2-vaiheisessa reaktiossa II kuvatulla tavalla (Esimerkki 6). 0,5 µM $^{125}$I yhtä alla ilmaistuista fibriininsitomisaluepolypeptideistä inkuboitiin 37 °C:ssa ennalta muodostetun fibriinihyytymän kanssa, joka oli peräisin 20 µl:sta sitraattikäsiteltyä kokoverta. Sitoutuminen mitattiin, kun läsnä oli 5 mM $CaCl_2$ ja 0,02 yksikköä/ml transglutaminaasia. Reaktio päätettiin 45-min inkuboinnin jälkeen sentrifugoimalla; pelletti pestiin kolmesti PBS:llä ja radioaktiivisuus mitattiin gammalaskurissa.

1. plasman 31 kD FBD (p31 kD)
2. r12 kD
3. r20 kD
4. r31 kD (erä A)
5. r31 kD (erä B)
6. r31 kD (erä C)

Kuvio 20.

Vertailu $^{125}$I-r12 kD:n tuoreeseen ja pakastettuun fibriinihyytymään sitoutumisesta

Tämä koe suoritettiin oleellisesti 2-vaiheiselle reaktiolle II kuvatuissa olosuhteissa (esimerkki 6). Esimuodostettuja fibriinihyytymiä, jotka ovat peräisin 20 µl:sta sitraattikäsiteltyä ihmisen kokoverestä joko pakastettiin -70 °C:ssa 7 päivän ajan (pakastetut hyytymät) tai käytettiin välittömästi niiden muodostamisen jälkeen (tuoreet hyytymät).

Fibriinihyytymiä inkuboitiin 0,15 µM $^{125}$I-r12 kD:n kanssa, kun läsnä oli tai ei ollut 0,02 yksikköä/ml marsun maksan transglutaminaasia (Sigma). Sitoutuminen fibriinihyytymiin mitattiin esimerkissä 6 kuvatulla tavalla.

Kuvio 21.

r20 kD polypeptidin uudelleenlaskostaminen ja puhdistaminen tarkkailtuna eluutioprofiileilla Superose 12-kolonnista (kiinnitetty FPLC:hen)

200-µl erät r20 kD polypeptidiä eri uudelleenlaskostus- ja puhdistusprosessin vaiheissa injisoitiin Superose 12-kolonnin päälle (kiinnitetty FPLC:hen). Kolonni tasapainotettiin ja eluoitiin liuoksella, jossa oli 150 mM NaCl/20 mM Tris HCl, pH 7,8, virtausnopeudella 0,8 ml/min. Pienempi jälki saadaan FPLC Controller LCC-500:stä. A. r20 kD polypeptidin pelletti liuotettiin 6 M guanidiini·HCl:ään ja pelkistetään 50 mM ß-merkaptoetanolilla; B. Uudelleenlaskostettu ja ilmassa uudelleenhapetettu r20 kD polypeptidi; C. Q-Sepharose-kolonniin sitoutuneet polypeptidit, ts. materiaali, joka erotettiin puhdistetusta r20 kD:stä; D. Läpivirtaus Q-Sepharose-kolonnista; E. Läpivirtaus hepariini-Sepharose-kolonnista, ts. materiaalia, joka erotettiin puhdistetusta r20 kD:stä; F. Puhdistettu 20 kD polypeptidi (retentioaika = 18,16 min), joka eluoitiin hepariini-Sepharose-kolonnista 0,5 M NaCl:llä. Huomaa, ettei tällä retentioajalla 18,16 min ollut huippua profiilissa A, jossa materiaali on pelkistetyssä muodossa, eikä profiileissa C & E, jotka sisältävät

20-kD polypeptidin väärin laskostettuja muotoja.

Kuvio 22.
r12 kD polypeptidin uudelleenlaskostaminen ja puhdistaminen tarkkailtuna eluutioprofiileilla Superose 12-kolonnista (kiinnitettynä Waters HPLC-järjestelmään)
25 - 100-µl erät r12 kD polypeptidiä uudelleenlaskostus- ja puhdistusmenetelmän eri vaiheissa injisoitiin Superose 12-kolonnin päälle (kiinnitetty Waters HPLC-järjestelmään). Kolonni tasapainotettiin ja eluoitiin liuoksella, jossa oli 150 mM NaCl/20 mM Tris HCl, pH 7,8, virtausnopeudella 0,8 ml/min. A. r12 kD polypeptidin pelletti liuotettuna 6 M guanidiini·HCl:llän ja pelkistettynä 50 mM ß-merkaptoetanolilla; B. Uudelleenlaskostettu ja ilmassa hapetettu r12 kD polypeptidi; C. Q-Sepharoseen sitoutuneet polypeptidit, ts. materiaali, joka erotettiin puhdistetusta r12 kD:stä; D. Läpivistaus sekä Q- että hepariini-Sepharose-kolonneista (tässä tapauksessa kolonnit liitettiin sarjaan, ja läpivirtaus Q-Sepharosesta lisättiin sen vuoksi automaattisesti hepariini-Sepharose-kolonniin), ts. materiaali joka erotettiin puhdistetusta r12 kD:stä; E. Puhdistettu r12 kD polypeptidi (retentioaika - 18,83 min), joka eluoitiin hepariini-Sepharose-kolonnista 0,5 M NaCl:llä. Huomaa, ettei tällä retentioajalla 18,83 min ollut huippua profiilissa A, jossa materiaali on pelkistetyssä muodossa, eikä profiileissa C & D, jotka sisältävät r12 kD polypeptidin väärin laskostuneita muotoja.

Kuvio 23.
Plasmidin pFN 208-13 konstruointi
Kaksi erää plasmidia pFN 975-25 (ATCC No. 67832) sulatettiin erikseen XmnI:llä ja XbaI/StyI:llä, vastaavasti. Kummastakin sulatuksesta eristettiin suuret fragmentit ja sekoitettiin yhteen kuviossa 8 esitetyn synteettisen oligomeerin kanssa. Sitten seosta keitettiin 2,5 min ajan, jäähdytettiin vähitellen 60 min ajan 30 °C:ssa, sen jälkeen 60 min ajan 4 °C:ssa, ja lopuksi 30 min 0 °C:ssa. Tämä nyt uudelleen emäs-

pariutettu DNA täytettiin sitten Klenow-fragmentilla ja liitettiin T4 DNA-ligaasilla. DNA transformoitiin E. coli A1645:een, ja transformantit seulottiin oligomeerille positiivisen kloonin suhteen. Plasmidia positiivisesta kloonista merkittiin pFN 208-13, ja talletettiin kansainväliseen talletuslaitokseen the ATCC E. coli A4255-isännässä tulonumerolla 68456. Tämä plasmidi ekspressöi 18,5-kD FBD-polypeptidiä molekyylin aminoterminaalisesta päästä $\lambda$-$P_L$-promoottorin ja ß-laktamaasin ribosomisitoutumiskohdan kontrollin alla.

Kuvio 24.
Plasmidin pFN 208-13 konstruoinnissa käytetty synteettinen linkkeri
Tässä kuviossa esitetään synteettinen oligomeeri, jota käytettiin plasmidin pFN 208-13 (kuvio 23) konstruoinnissa.

Kuvio 25.
Plasmidin pFN 205-5 konstruointi
Pieni fragmentti eristettiin plasmidin pFN 194-2 (kuvio 14) sulatuksesta XbaI/HindIII:lla. Pieni fragmentti eristettiin plasmidin pFN 962-3 (kuvattu yhdessä siirretyssä PCT-patenttihakemuksessa US8905875 ja julkaistu kansainvälisenä patenttijulkaisuna W09007577, 12.6.1990, kuviot 45 - 49 ja kuvien selitys) NdeI/HindIII-sulatuksesta. Sitten nämä kaksi fragmenttia liitettiin suuren fragmentin kanssa, joka eristettiin plasmidin pMLK-100 (ATCC tulonumero 68605) NdeI/HindIII-sulatuksesta. Tulokseksi saatu plasmidi, jota merkitään 205-5, ekspressöi paljon 64-kD polypeptidiä, joka sisältää 31-kD FBD:n fuusioituna 33-kD CBD:hen $\lambda$-$P_L$-promoottorin, CII ribosomin sitoutumiskohdan kontrollin alle ja sisältää trp-transkription lopettajan, jota merkitään "ter" välittömästi alavirtaan rakennegeenistä. Tämä polypeptidi on puhdistettu ja uudelleenlaskostettu oleellisesti tavalla, joka kuvataan 31-kD FBD-polypeptidille, joka kuvataan edellä mainitussa PCT-patenttijulkaisussa.

Kuvio 26.

Plasmidin pFN 201-3 konstruointi
Suuri fragmentti eristettiin plasmidin pFN 949-2 (ATCC tulonumero 67831) HindIII/StyI-sulatuksesta, ja liitettiin pienen fragmentin kanssa, joka eristettiin plasmidin pFN 196-2 (ATCC tulonumero 68328) HindIII/StyI-sulatuksesta. Tulokseksi saatu plasmidi, jota merkitään pFN 201-3, ekspressöi 12-kD FBD-polypeptidiä $\lambda$-$P_L$-promoottorin ja CII-ribosominsitomiskohdanb kontrollin alla.

Kuvio 27.
Plasmidin pFN 203-2 konstruointi
Suuri fragmentti eristettiin plasmidin pMLK-100 (talletettu E. coli 4300:ssa ATCC tulonumerolla 68605) NdeI/HindIII-sulatuksesta ja liitettiin pienen fragmentin kanssa, joka eristettiin plasmidin pFN 201-3 NdeI/HindIII-sulatuksesta. Tulokseksi saatu plasmidi, jota merkitään pFN 203-2, joka ekspressoi 12-kD FBD-polypeptidiä $\lambda$-$P_L$-promoottorin, $C^{I-}$ ribosominsitomiskohdan ja trp-transkription lopetussekvenssin kontrollin alla, jota lopetussekvenssiä kutsutaan "ter", talletettiin kansainväliseen talletuslaitokseen ATCC E. coli A4255:ssä ATCC-tulonumerolla 68606. Plasmidi pFN 203-2 tunnetaan myös nimellä pFN 203-2-3.

Kuvio 28.
FBD-polypeptidifragmenttien sitoutuminen verisuonikomponentteihin
Tässä kuviossa esitetään 12-kD polypeptidin sitoutumisen alhaista astetta verisuonikomponentteihin kuten endoteelisoluihin, solunulkoiseen matriisiin, ja immobilisoituun fibronektiiniin verrattuna 31 kD:hen esimerkissä 9 kuvatulla tavalla. 12-kD:n sitoutumista lisättiin, mutta se pysyi edelleen suhteellisen alhaisena verrattuna 31-kD:hen jopa eksogeenisen transglutaminaasin lisäyksen kanssa.

Kuvio 29.
Erilaisten FBD-polypeptidifragmenttien vaikutus S. aureus'in sitoputumiseen endoteelisoluihin (EC)

Leimatun S. aureus'in valmistus ja endoteelisolun (EC) sitoutumismääritys kuvataan esimerkissä 9. Testattiin plasman ja yhdistelmä-DNA 31 kD:n, yhdistelmä-DNA 18,5 kD:n, ja yhdistelmä-DNA 12 kD:n estovaikutus S. aureus'in sitoutumiseen EC:hen.

Tässä kuviossa esitetään eri FBD-polypeptidien annosvaikutus S. aureus'in endoteelisoluihin sitoutumiseen 4 °C:ssa naudan sikiön seerumin (FCS) läsnä ollessa ja puuttuessa. (Aikaisemmat kokeet osoittivat dramaattisen 2 - 3-kertaisen kasvun S. aureus'in EC:hen sitoutumisessa FCS:n läsnä ollessa 37 °C:ssa, mutta vain vähäisen kasvun 4 °C:ssa. Kasvu johtuu luultavasti plasmafibronektiinin läsnä olosta FCS:ssä.) Tämän keksinnön kokeessa, joka suoritettiin 4 °C:ssa, ei ollut merkittävää lisätyn FCS:n vaikutusta sitoutumiseen. Sekä plasman että yhdistelmä-DNA 31 kD:llä nähdään sitoutumisen voimakas annoksesta riippuva esto, kun taas yhdistelmä-DNA 18,5 kD- ja 12 kD-polypeptidifragmentit eivät käytännöllisesti katsoen aiheuttaneet sitoutumisen estoa, mikä osoittaa, että niillä on vähän tai ei lainkaan S. aureus-sitoutumisaffiniteettia.

Kuvio 30.
Erilaisten FBD-polypeptidifragmenttien sitoutuminen ennalta muodostettuun fibriinihyytymään (Reaktio II)
Tässä kuviossa esitetään erilaisten FBD-polypeptidien spesifisyys ennalta muodostettuun fibriinihyytymään, kuten kuvataan esimerkissä 9. Testatut FBD-polypeptidit olivat 31 kD, 20 kD, 18,5 kD ja 12 kD. Lisäksi testattiin 45-kD fuusiopolypeptidi, jossa oli 12-kD FBD-fragmentti fuusioituna 33-kD CBD:hen (Esimerkki 40). Kontrollina sisällytettiin 33-kD CBD-polypeptidi (yhdessä siirretty PCT-patenttijulkaisu WO9007577, s. 62 - 64). Kaikki testatuista FBD-polypeptideistä, mukaan lukien 45-kD fuusiopolypeptidin, sitoutuivat ennalta muodostettuun fibriinihyytymään samanlaisissa osuuksissa (25 - 38 % sitoutunutta). Yksistään 33-kD CBD sitoutui hyytymään vain pieninä osuuksina. Transglutaminaasi-inhi-

biittori jodiasetaatti (IAC) esti sitoutumisen 50 - 75 %:lla, ilmaisten, että transglutaminaasi on sitoutumisreaktion aktiivinen komponentti. Jodiasetaatilla ei ollut näkyvää vaikutusta 33-kD CBD-polypeptidin sitoutumiseen, ilmaisten, että se sitoutuu eri mekanismilla.

Kuvio 31.
Esimerkissä 13 kuvataan veritulppien leimaus in vivo käyttämällä 12-kD ja 18,5-kD FBD-polypeptidifragmentteja. Kuviossa esitetään tulokset veritulpan (vinoviivoitetut pylväät) ja veren (avoimet pylväät) spesifisenä radioaktiivisuutena ruostumattomasta teräksestä olevan silmukan sisältävillä rotilla, 24 tuntia $^{111}$In-leimattujen yhdistelmä-DNA-FBD-proteiinien laskimonsisäisen annon jälkeen. Pylväät ja pystysuorat sulut edustavat yksikölle cpm/g märkäpainoa keskiarvoja ja SEM:iä, vastaavasti. Kuviossa 32 esitetään veritulppa:veri-suhteet.

Kuvio 32.
Spesifisen radioaktiivisuuden veritulppa:veri-suhteet 24 tuntia $^{111}$In-leimatun 12 kD-, 18,5 kD- ja 31 kD-FBD:n annon jälkeen kuviossa 31 kuvatussa rottasilmukkamallissa.

Kuvio 33.
Lineweaver-Burke-kaaviot ihmisen Glu-plasminogeeni-aktivaatiokinetiikalle, pH-arvossa 7, ja 37 °C:ssa käyttämällä joko SK:ta tai FBD/SK-kompleksia aktivaattoreina. 200-$\mu$l tilavuudessa 96-kaivoisilla levyillä plasminogeenisubstraattikonsentraatio vaihteli välillä 0,9 x $10^{-6}$ ja 2,7 x $10^{-6}$ M. S-2251-substraatin (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) lopullinen konsentraatio oli 5 x $10^{-4}$ M, ja lopullinen aktivaattorikonsentraatio oli 2 x $10^{-6}$ M. Reaktionopeus, v, edustaa absorbanssin muutosta aallonpituudella 405 nm, deltaA (absorbanssiyksikköä), per aika deltat (min).

Kuvio 34.
Fibriini/agar-levyjä valmistettiin sekoittamalla 5 ml (2

mg/ml) fibrinogeeniä, 5 ml (0,4 %) Noble-agaria, 0,5 ml (1 M) $CaCl_2$:ta ja 0,5 ml (10 u/ml) trombiinia, kaikki imidatsolilla puskuroidussa suolaliuoksessa, pH 7,4. Polymerisoinnin jälkeen tehtiin Pasteur-pipettejä ja tyhjöä käyttämällä pieniä kaivoja, joihin lisättiin erät SK:ta tai FBD/SK-kompleksia konsentraatioilla välillä $10^2$ - $10^4$ ng/ml. Kun oli inkuboitu 37 °C:ssa yön yli, mitattiin liukenemisvyöhyke.

Kuvio 35

Marsun transglutaminaasilla katalysoitu [$^{14}$C]-putreskiinin tuleminen FBD:hen tai FBD/SK-kompleksiin
Määrityksiä suoritettiin 30 minuuttiin asti huoneenlämpötilassa 6 $\mu$M FBD SK:llä, tai FBD/SK-kompleksilla, 0,05 u/ml transglutaminaasia, 6 $\mu$M [$^{14}$C]-putreskiinia, 6 $\mu$M kylmää putreskiinia, 50 mM Tris·HCl:ää, pH 7,5, ja 10 mM $CaCl_2$. Sisällytettiin myös kontrollit, joissa oli 20 mM EDTA:ta (pisteviiva) tai 5 mM DTT:tä (katkoviiva). (Δ) SK, (■) FBD, (□) FBD/SK-kompleksi.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus
Plasmidit pFN 975-25, pFN 949-2, pFN 137-2, ja pFN 196-2 talletettiin Budapestin sopimuksen mukaisesti kansainväliseen talletuslaitokseen the American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 ATCC-tulonumeroilla 67832, 67831, 67910 ja 68328, vastaavasti. Samalla lailla useat muut tässä patenttihakemukjsessa mainituista ATCC-talletuksista suoritettiin Budapestin sopimuksen mukaisesti.

Ihmis-fibronektiinin primäärisen sekvenssin on osoitettu järjestäytyneen kolmeen homologisten toistojen tyyppiin, tyyppeihin I, II ja III. Fibriininsitomisalue (FBD), joka koostuu 259 aminohaposta ja jonka näennäinen molekyylipaino on 31 kD, on tehty viidestä tyypin I toistosta ("sormesta"), joista kukin on pituudeltaan noin 45 aminohappoa kahdella disulfidisidoksella, yhdistettynä kahteen noin 20 aminohapon jaksoon proteiinin sekä N- että C-terminaalisessa päässä.

Kuviossa 1 esitetään yleinen kaaviomainen kuva fibronektiinin alueiden ja konstruoitujen yhdistelmä-DNA-molekyylien rakenteesta.

Tässä vaaditut yhdistelmä-DNA-fibriininsitomisalue (FBD)-polypeptidit käsittävät fibriininsitomisalueen polypeptidifragmentteja (polypeptidit r20 kD, r18,5 kD ja r12 kD). Nämä polypeptidit ovat pienempiä kuin 31-kD polypeptidi ja käsittävät osan fibriininsitomisalueen sekvenssistä. Useita muita fibriininsitomisalueen polypeptidejä voidaan ekspressöidä muilla konstruoiduilla plasmideilla käyttämällä tekniikan tasolla tunnettuja menetelmiä, tässä patenttihakemuksessa kuvatuista plasmideista, ja nämä polypeptidit voidaan uudelleenlaskostaan, uudelleenhapettaa ja puhdistaa tässä patenttihakemuksessa kuvattuja menetelmiä käyttämällä.

Tässä patenttihakemuksessa kuvattu täysimittainen yhdistelmä-DNA-fibriininsitomisalue (r31 kD polypeptidi) käsittää fibronektiinin ensimmäiset 262 aminohappoa, sekvenssillä arg-ala-ala-val karboksiterminaalisessa päässä. Kaikkien FBD:n lopullisten polypeptidien ja polypeptidifragmenttien aminoterminaalisessa päässä on läsnä metioniinilisätähde. Plasmafibriininsitomisalue, joka on johdettu plasman fibronektiinia tryptisesti sulattamalla, käsittää fibronektiinin ensimmäiset 259 aminohappoa, ts. arginiinin ollessa karboksiterminaalisessa päässä ja ensimmäisen koodatun aminohapon, glutamiinin, ollessa muutettuna pyroglutamaattitähteeksi.

r31 kD polypeptidissä on viisi edellä käsiteltyä tyypin I homologista silmukkaa tai sormea (ts. 10 disulfidisidosta), r20 kD polypeptidissä ja r18,5 kD polypeptidissä on kummassakin kolme silmukkaa (ts. 6 disulfidisidosta), ja r12 kD polypeptidissä on kaksi silmukkaa (ts. 4 disulfidisidosta). Näiden disulfidisidosten läsnäolo selittää välttämättömyyden ja myös vaikeuden uudelleenlaskostus/uudelleenhapetus-menettelytavassa, joka kehitettiin, jotta saataisiin ja puhdis-

tettaisiin oikein laskostettuja FBD-polypeptidejä, joissa on oikeat disulfidisidokset. Oikein laskostetut FBD-polypeptidit ovat biologisesti aktiivisia, ts. ne voivat sitoutua fibriiniin; lisäksi, r31 kD polypeptidi voi sitoutua Staphylococcus aureus'iin.

Yhdistelmä-DNA-FBD-polypeptidit muodostuvat inkluusiokappaleissa, jotka saadaan pelletissä, joka muodostuu solukakun rikkomisen jälkeen.

Tässä keksinnössä kuvataan fibronektiinin fibriininsitomisalueen (FBD) yhdistelmä-DNA-polypeptidifragmenttien valmistaminen käytettäväksi veritulppakuvauksessa ja veritulpan muodostumisen estossa. Nämä polypeptidit voidaan myös kiinnittää veritulppia hajottavaan aineeseen aineen kohdistamiseksi veritulppaan.

Yhdistelmä-DNA-solut, jotka tuottavat FBD:n polypeptidifragmentteja, voivat olla mitä hyvänsä soluja, joihin on lisätty yhdistelmä-DNA-tekniikoilla DNA-sekvenssi, joka koodittaa FBD-polypeptidifragmenttia. Solun on pystyttävä ekspressöimään DNA-sekvenssiä ja tuottamaan polypeptidituotetta. Solu voi olla nisäkässolu, sienisolu kuten hiivasolu, tai bakteerisolu.

Bakteerisolu voi olla mitä hyvänsä kantaa, mukaan lukien auksotrofisia, prototrofisia ja lyyttisiä kantoja, $F^+$- ja $F^-$-kantoja, kantoja, jotka sisältävät λ-profaagin CI857-repressorisekvenssin, ja kantoja, joista on deletoitu deo-repressorit tai deo-geeni.

Esimerkkejä Escherichia coli-villityyppikannoista ovat prototrofi ATCC No. 12435, ja auksotrofi MC1061 (ATCC tulonumero 67361).

Esimerkkejä Escherichia coli-kannoista, jotka sisältävät λ-CI857-repressorisekvenssin, ovat auksotrofit A1645, joka

sisältää plasmidin pTVR 279-8 (ATCC No. 53216), A1637, joka sisältää plasmidin pTV 104(2) (ATCC No. 39384), ja A2097, joka sisältää plasmidin pSOD$\alpha$2 (ATCC No. 39786), ja the prototrofit A4255, joka sisältää plasmidin pFN 975-25 (ATCC No. 67832) ja biotiinista riippumaton A4346, joka sisältää plasmidin pHG44 (ATCC No. 53218).

Eräs esimerkki lyyttisestä Escherichia coli-kannasta on A4048, joka sisältää plasmidin pHG44 (ATCC No. 53217).

Esimerkkejä $F^-$-kannoista ovat Escherichia coli S$\phi$930 ($F^-$), joka sisältää plasmidin pMF 5534, joka on talletettu laitokseen ATCC tulonumerolla 67703, ja Escherichia coli W31100 ($F^-$), joka sisältää plasmidin pMFS 929 talletettuna laitokseen ATCC tulonumerolla 67705.

Esimerkkejä Escherichia coli-kannoista, joista on deletoitu deo-geeni tai deo-repressorit, ovat S$\phi$732, joka sisältää plasmidin pMF 2005 (ATCC No. 67362), S$\phi$540, joka sisältää plasmidin pJBF 5401 (ATCC No. 67359), ja S$\phi$930, joka sisältää plasmidin pEFF 920 (ATCC No. 67706) (katso EP-patenttihakemusta 0303972, julkaistu 22.2.1989).

Keksinnön mukaiset plasmidit voidaan lisätä sopiviin bakteeri-isäntäsoluihin, edullisesti Escherichia coliin. Eräs esimerkki sopivasta Escherichia coli-solusta on kanta A4255 ($F^+$) [ATCC tulonumero 67832], mutta plasmidien isäntäsoluina voidaan käyttää myös muita Escherichia coli-kantoja ja muita bakteereita. Tällaisia bakteereitä ovat mm. Pseudomonas aeruginosa ja Bacillus subtilis.

Kaikki edellä kuvatut Escherichia coli isäntäkannat voidaan "parantaa" tekniikan tasolla hyvin tunnetuilla menetelmillä niiden sisältämistä plasmideista, esimerkiksi etidiumbromidimenetelmillä, jotka kuvataan julkaisussa: R.P. Novick; Bacteriol. Rev. 33 (1969) 210.

Bakteerisolu voi sisältää FBD-sekvenssin, joka koodittaa FBD-polypeptidiä vektori-DNA-molekyylin kuten plasmidin rungossa. Vektori tai plasmidi konstruoidaan yhdistelmä-DNA-tekniikoilla niin, että FBD-polypeptidiä koodittava sekvenssi tuodaan molekyylissä sopivaan asemaan.

FBD-polypeptidien tuotannossa käytetyt plasmidit voivat sisältää joukon erilaisia promoottereita kuten λ-promoottorin tai deo-promoottoreita.

Plasmideja, joita voidaan käyttää FBD-polypeptidien tuotantoon, ovat seuraavat:

a) Plasmidi pFN 975-25, joka ekspressöi r31 kD FBD:tä ja joka on talletettu Escherichia coli-kannassa A4255 talletuslaitokseen the ATCC tulonumerolla 67832;

b) Plasmidi pFN 949-2, joka ekspressöi r20 kD FBD:tä ja joka on talletettu Escherichia coli-kannassa A4255 talletuslaitokseen the ATCC tulonumerolla 67831;

c) Plasmidi pFN 196-2, joka ekspressöi r12 kD FBD ja joka on talletettu Escherichia coli-kannassa A4255 talletuslaitokseen the ATCC tulonumerolla 68328;

d) Plasmidi pFN 197-10, joka ekspressöi modifioitua 12 kD FBD-polypeptidiä, ja joka on kuvattu tämän patenttihakemuksen kuviossa 11;

e) Plasmidi pFN 195-4, joka ekspressöi r31 kD-polypeptidiä fuusioituna sekvenssiin DGRGDS, ja joka on kuvattu tämän patenttihakemuksen kuviossa 13;

f) Plasmidi pFN 201-3, joka ekspressöi 12 kD FBD-polypeptidifragmenttia λ-$P_L$:n ja $C_{II}$-rbs:n kontrollin alla, ja joka on kuvattu tämän patenttihakemuksne kuviossa 26.

g) Plasmidi pFN 203-2, joka ekspressöi 12 kD FBD-polypeptidifragmenttia λ-$P_L$:n ja CII-rbs:n kontrollin alla, ja sisältää lisäksi transkription lopettajan, jota merkitään "ter," ja joka on kuvattu tämän patenttihakemuksen kuviossa 27 ja joka on talletettu Escherichia coli A4255:ssä talletuslaitokseen ATCC tulonumerolla 68606.

h) Plasmidi pFN 205-5, joka ekspressöi 64 kD polypeptidiä, joka käsittää 31-kD täysimittaisen FBD-polypeptidin fuusioituna fibronektiinisolunsitomisalueen(CBD) 33-kD fragmenttiin ja joka on kuvattu tämän patenttihakemuksen kuviossa 25.

i) Plasmidi pFN 208-13, joka ekspressöi 18,5-kD FBD-polypeptidifragmenttia, joka on kuvattu 23 tämän patenttihakemuksen kuviossa ja on talletettu Escherichia coli A4255:ssä talletuslaitokseen ATCC tulonumerolla 68456.

j) Mikä hyvänsä plasmidi, joka on johdettu edellä olevista plasmideista, ja joka sisältää edellä olevien plasmidien sisältämät FBD-sekvenssit; ja

k) Mikä hyvänsä plasmidi, joka sisältää edellä olevien plasmidien koodittamat FBD-sekvenssit.

Tämä keksintö aikaansaa kuvausaineen, joka käsittää polypeptidiä, joka on leimattu kuvattavalla merkkiaineella, jolloin tällaisella polypeptidillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja voi sitoutua fibriiniin. Aikaansaadaan myös koostumus, joka sisältää tehokkaan, kuvan muodostavan määrän tällaista kuvausainetta ja fysiologisesti hyväksyttävää väliainetta.

Polypeptidit, jotka on leimattu kuvattavalla merkkiaineella, voivat olla ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueen polypeptidifragmentteja; ne voidaan tuottaa yhdistelmä-DNA-tekniikkoja käyttämällä; tai niitä voivat koodittaa geenit,

jotka on syntetisoitu DNA-syntetisaattorissa. Keksinnön hakijat ovat esittäneet kolme esimerkkiä tällaisista polypeptideistä, jolloin edullisia suoritusmuotoja ovat 18,5-kD ja 12-kD polypeptidit. Kuten ammattimies ymmärtäisi, käsitteet "on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella" ottaa huomioon, ts. luonnollisesti esiintyvät alleeliset variaatiot ja yhdistelmä-DNA-variaatiot, kuten kohtasuunnatun mutageneesin. Nämä kaikki otetaan huomioon keksinnön hakijoiden "polypeptidillä," ainoan rajoituksen ollessa kyvyn sitoutua fibriiniin.

Kuvattava merkkiaine on ammattimiehen valikoitavissa. Edullisesti merkkiaine on radioaktiivista isotooppia, alkuainetta, joka on läpinäkymätön röntgensäteille, tai paramagneettinen ioni.

Radioaktiivisia isotooppeja käytetään yleisesti lääketieteessä, ja ne ovat ammattimiesten hyvin tuntemia. Nykyisin on edullista, että merkkiaine on indium-111, teknetium-99m, jodi-123, jodi-125, jodi-131, krypton-81m, ksenon-133 tai gallium-67, tai näiden seosta. Edullisimmin merkkiaine on teknetium-99m tai indium-111.

Havaittavissa oleva merkkiaine voi myös olla paramagneettinen ioni. Paramagneettiset ionit ovat myös lääketieteessä yleisesti käytettyjä. Esimerkkejä tällaisista merkkiaineista ovat mm. kelatoidut metalli-ionit kromi(III), mangaani(II), rauta(III), rauta(II), koboltti(II), nikkeli(II), kupari(II), praseodymium(III), neodyymi(III), samarium(III), gadolinium(III), terbium(III), dysprosium(III), holmium(III), erbium(III), ytterbium(III) tai näiden seokset.

Edullisesti kuvausaine käsittää 20-kD polypeptidin, joka vastaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 153 aminohapposekvenssi ja noin 20 muuta

aminohappoa; tai 18,5-kD polypeptidi, joka vastaa ihmisfibronektiinin fibriininsitomisalueen aminohapposekvenssiä ja jossa on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 154 aminohapposekvenssi; tai 12-kD polypeptidi, joka vastaa ihmisfibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä ja jolla on kuviossa 2 esitettyjen aminohappojen 1 - 109 aminohapposekvenssi. Olemme osoittaneet osittaisella aminohapposekvenssianalyysillä, että polypeptidit 12-kD ja 20-kD, samoin kuin aikaisemmin kuvattu 31-kD, sisältävät kaikki N-terminaalisen lisämetioniinin. Koska FBD:n kaikilla polypeptidifragmenteilla on identtiset N-terminaalinen sekvenssit, oletetaan, että myös polypeptideissä 18,5 kD, 45 kD ja 64 kD on N-terminaalinen lisämetioniini. Vaadittuun keksintöön kuuluvat kuitenkin myös polypeptidit, joissa ei ole N-terminaalista lisämetioniinia.

Tämä keksintö aikaansaa myös menetelmän fibriiniä sisältävän aineen, ts. veritulpan tai aterosklerootisen täplän kuvaamiseen, joka käsittää fibriiniä sisältävän aineen saattamisen kontaktiin edellä kuvatiun aineen kanssa sellaisissa olosuhteissa, että aine sitoutuu fibriiniä sisältävään aineeseen, ja sitoutuneen aineen kuvaamisen ja siten fibriiniä sisältävän aineen kuvaamisen.

Edelleen aikaansaadaan menetelmä fibriiniä sisältävän aineen kuvaamiseksi kohteessa, joka käsittää:

(a) edellä kuvatun aineen koostumuksen antamisen kohteelle olosuhteissa, jotka sallivat koostumuksessa olevan kuvausaineen pääsyn verivirtaan ja sitoutumisen verisuonissa läsnä olevaan fibriiniin;

(b) verisuonien sisälle sitoutuneen aineen kuvaamisen; ja täten

(c) fibriiniä sisältävän aineen kuvaamisen.

Edullisesti edellä olevissa menetelmissä fibriiniä sisältävän aineen kuvaamiseen käytetyn reagenssin polypeptidi on 20-kD polypeptidi, joka vastaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 153 aminohapposekvenssi; 20-kD polypeptidin sisältäessä alle noin 20 lisäaminohappoa; 18,5-kD polypeptidin vastatessa aminohapposekvenssiä, joka on läsnä ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 154 aminohapposekvenssi; tai 12-kD polypeptidi, joka vastaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 109 aminohapposekvenssi.

Edullisia edellä olevissa menetelmissä fibriiniä sisältävän aineen kuvaukseen kuvaukseen käytettäviä merkkiaineita ovat radioaktiiviset isotoopit, alkuaineet, jotka ovat läpinäkyviä röntgensäteille, tai paramagneettiset ionit. Edullisimpia merkkiaineita ovat radioaktiiviset isotoopit kuten indium-111, teknetium-99m, jodi-123, jodi-125, jodi-131, krypton-81m, ksenon-133 ja gallium-67.

Kuvaaminen voidaan suorittaa millä hyvänsä ammattimiehen tuntemilla menetelmillä. Näitä menetelmiä ovat ei-rajoittavasti mm. röntgen, CAT-pyyhkäisy, PET-pyyhkäisy, NMRI ja fluoroskopia. Edullisesti fibriiniä sisältävän aineen kuvaaminen edellä olevilla menetelmillä suoritetaan röntgenkameraa käyttämällä.

Edelleen aikaansaadaan plasmidi ekspressöimään polypeptidiä, jolla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja joka voi sitoutua fibriiniin, sisältäen DNA:ta, joka koodittaa polypeptidiä, ja DNA:ta, joka koodittaa sopivia säätelyelementtejä, jotka sijaitsevat suhteessa polypeptidiä koodittavaan DNA:han niin, että se aikaansaa polypeptidin ekspression sopivassa isäntäsolussa.

Keksinnön hakijat ovat antaneet kolme esimerkkiä fibronektiinin fibriininsitomisalueen polypeptidifragmenteista. Näihin luetaan mukaan polypeptidit r20 kD, r18,5 kD ja r12 kD. Näillä polypeptideillä on luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin osien sitoutumis- ja tarttumisominaisuudet. Tämän patenttihakemuksen patenttivaatimusten suojaalaa ei ole tarkoitettu rajoittuvaksi näihin kolmeen FBD-polypeptidifragmenttiin, jotka ovat vain esimerkkejä edullisista suoritusmuodoista.

Edullisissa suoritusmuodoissa polypeptide on noin 20-kD polypeptidi, joka vastaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä; noin 18,5-kD polypeptidi, joka vastaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä; tai noin 12-kD polypeptidi, joka vastaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä.

Edullisemmissa suoritusmuodoissa polypeptidi on 18,5-kD polypeptidi, joka vastaa fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 154 aminohapposekvenssi, 20-kD polypeptidi, joka vastaa aminohapposekvenssiä, joka on läsnä ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 153 aminohapposekvenssi; 20-kD polypeptidi, joka alle noin 20 lisäaminohappoa; tai 12-kD polypeptidi, joka vastaa aminohapposekvenssi, joka on läsnä ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 109 aminohapposekvenssi. Kuten edellä huomautettiin, polypeptideissä voi olla N-terminaalinen lisämetioniini. Tässä vaadittu keksintö sisältää kuitenkin myös polypeptidit ilman N-terminaalista lisämetioniinia.

Luonnollisesti esiintyvä ihmis-fibronektiini on sellaista millaisena se esiintyy ihmiskehossa (plasmassa).

Koko tässä patenttihakemuksessa käytettäessä oleellinen osa on ainakin viidesosa (1/5). Polypeptidillä, jolla on luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueen biologinen aktiivisuus, on sitoutumis- tai tarttumisominaisuudet, jotka ovat samanlaiset kuin luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella kun tällaisen aktiivisuuden tasoa määritetään tai mitataan.

Tässä keksinnössä eri funktionaalisten alueiden aminohapposekvenssi määritetään katkaisemalla alueita koodittavan cDNA:n restriktioentsyymeillä, eivätkä ne välttämättä vastaa alueiden aminohapposekvenssiä saatuna ja määritettynä fibronektiinin proteolyyttisellä sulatuksella.

Lisäksi keksinnön mukainen plasmidi sisältää sopivat säätelyelementit sijoitettuna suhteessa polypeptidiä koodittavaan DNA:han niin, että se aikaansaa polypeptidin ekspression sopivassa isäntäsolussa, kuten promoottoreiden ja operaattoreiden, esimerkiksi $\lambda$-$P_L O_L$, ribosomin sitoutumiskohtien, esimerkiksi $C_{II}$, ja repressorien. Muita sopivia säätelyelementtejä ovat esimerkiksi lac-, trp-, tac-, lpp- ja deo-promoottorit (EP-patenttijakemus 0303972, julkaistu 22.2.1989).

Sopivat säätelyelementit sijoitetaan suhteessa polypeptidiä koodittavaan DNA:han niin, että se aikaansaa polypeptidin ekspression sopivassa bakteeri-isäntäsolussa. Keksinnön edullisissa suoritusmuodoissa säätelyelementit sijoitetaan lähelle ja ylävirtaan polypeptidiä koodittavasta DNA:sta.

Edelleen aikaansaadaan plasmidi, jota merkitään pFN 949-2 ja on talletettu Escherichia coli-kannassa A1645 ATCC-tulonumerolla 67831. Plasmidi pFN 949-2 koodittaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueen 20-kD polypeptidifragmenttia käsittäen kuvion 2 aminohapot 1 - 153 ja N-terminaalisen lisämetioniinin ja alle 20 muuta aminohappoa.

Aikaansaadaan myös plasmidi, jota merkitään pFN 196-2 ja joka on talletettu Escherichia coli-kannassa A4255 ATCC-tulonumerolla 68328. Plasmidi pFN 196-2 koodittaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueen 12-kD polypeptidifragmenttia, käsittäen aminohapot 1 - 109.

Aikaansaadaan myös plasmidi, jota merkitään pFN 208-13, ja joka on talletettu Escherichia coli A4255:ssä ATCC-tulonumerolla 68456. Plasmidi pFN 208-13 koodittaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueen 18,5-kD polypeptidifragmenttia käsittäen kuvion 2 aminohapot 1 - 154, ja siinä voidaan olettaa olevan edellä kuvattu N-terminaalinen lisämetioniini.

Aikaansaadaan myös plasmidi, jota merkitään pFN 203-2,, ja joka on talletettu Escherichia coli A4255:ssä ATCC-tulonumerolla 68606. Plasmidi pFN 203-2 ekspressöi hmisen fibronektiinin fibriininsitomisalueen 12-kD polypeptidifragmenttia käsittäen kuvion 2 aminohapot 1 - 109 N-terminaalisen lisämetioniinin kanssa.

Aikaansaadaan myös plasmidi, jota merkitään pFN 205-5, ja joka ekspressöi 64-kD polypeptidiä, joka sisältää 31-kD täysimittaisen FBD-polypeptidin fuusioituna fibronektiini-CBD:n 33-kD fragmenttiin (kuvattu kuviossa 25).

Kuten edellä kuvattiin, voidaan olettaa, että kaikki keksinnön mukaisilla plasmideilla tuotetut polypeptidit sisältävät N-terminaalisen lisämetioniini.

Nykyisin edullisissa suoritusmuodoissa keksintö aikaansaa Escherichia coli-solun, joka sisältää plasmidin, jota merkitään pFN 975-25 ja jolloin solu on talletettu ATCC-tulonumerolla 67832; Escherichia coli-solun, joka sisältää plasmidin, jota merkitään pFN 949-2 ja jolloin solu on talletettu ATCC-tulonumerolla 67831; ja Escherichia coli-solun, joka sisältää plasmidin, jota merkitään pFN 196-2 ja jolloin solu

on talletettu ATCC-tulonumerolla 68328; Escherichia coli-solun, joka sisältää plasmidin, jota merkitään pFN 203-2 ja jolloin solu on talletettu ATCC-tulonumerolla 68606; ja Escherichia coli-solun, joka sisältää plasmidin, jota merkitään pFN 208-13 ja jolloin solu on talletettu ATCC-tulonumerolla 68456.

Keksintö aikaansaa menetelmän polypeptidin tuottamiseksi, jolla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja joka voi sitoutua fibriiniin, jossa menetelmässä solua, joka sisältää plasmidin, joka sisältää polypeptidiä koodittavaa DNA:ta, käsitellään niin, että DNA ohjaa polypeptidin ekspressiota, ja näin ekspressöity polypeptidi otetaan talteen solusta.

Edullisesti näin tuotettu polypeptidi on fibriininsitomisalueen 18,5-kD, 20-kD tai 12-kD polypeptidifragmentti.

Edelleen aikaansaadaan puhdistettu polypeptidi, joka on oleellisen vapaa muista ihmisperäisistä aineista, ja jolla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja joka voi sitoutua fibriiniin.

Edullisesti polypeptidi on 20-kD polypeptidi, joka vastaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 153 aminohapposekvenssi; 20-kD polypeptidi, joka sisältää alle noin 20 lisäaminohappoa; tai 18,5-kD polypeptidi, joka vastaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 154 aminohapposekvenssi; tai 12-kD polypeptidi, joka vastaa ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevaa aminohapposekvenssiä ja jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 109 aminohapposekvenssi. Kuten edellä mainittiin, polypeptideissä voi

olla myös N-terminaalinen lisämetioniini. Tässä vaadittuun keksintöön luetaan kuitenkin mukaan myös polypeptidit ilman N-terminaalista lisämetioniinia.

Nämä lyhyemmät FBD-polypeptidifragmentit, ts. 20-kD, 18,5-kD, ja 12-kD, ovat edullisia 31-kD FBD-polypeptidiin verrattuna. Ne on helpompi uudelleenlaskostaa, niiltä puuttuu bakteerinsitomisalue, ja niillä on 31-kD polypeptidiin verrattuna huomattavasti alentunut sitoutumisspesifisyys muille verisuonikomponenteille kuten endoteelisoluille, solunulkoiselle matriisille ja fibronektiinille, samalla kun niillä säilyy samanlainen fibriininsitomisaktiivisuus kuin 31-kD polypeptidillä.

Lisäksi keksintö aikaansaa tällaisen puhdistetun polypeptidin, joka on oleellisen vapaa muista ihmisperäisistä aineista, fuusioituna toiseen polypeptidiin, toisen polypeptidin käsittäessä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin solunsitomisalueen aminohapposekvenssin oleellisen osan.

Edullisesti, fuusioitu polypeptidi on 45-kD fuusioitu polypeptidi, jossa puhdistettu polypeptidi on 12-kD polypeptidi ja toinen polypeptidi, joka sisältää luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin solunsitomisalueen oleellisen osan, on 33-kD polypeptidi. Fuusioitu polypeptidi voi myös käsittää 31-kD puhdistetun polypeptidin ja toisen polypeptidin, joka sisältää aminohapposekvenssin DGRGDS. Toinen edullinen fuusioitu polypeptidi on 64-kD fuusioitu polypeptidi, jossa puhdistettu polypeptidi on 31-kD polypeptidi, ja toinen polypeptidi, joka käsittää luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin solunsitomisalueen luonnollisen osan, on 33-kD polypeptidi.

Keksintö aikaansaa myös plasmidin ekspressöimään edellä kuvattua 45-kD fuusioitua polypeptidiä, jota plasmidia merkitään pFN 202-5; plasmidin ekspressöimään edellä kuvattua fuusioitua 31-kD/GRGDS-polypeptidiä, jota plasmidia merki-

tään pFN 195-4; ja plasmidin ekspressöimään edellä kuvattua 64-kD fuusioitua polypeptidiä, jota plasmidia merkitään pFN 194-2.

Koko tässä patenttihakemuksessa käytettäessä "fuusioitu" tai "sitoutunut" ottaa huomioons polypeptidit, jotka ovat sitoutuneet kovalenttisesti, ei-kovalenttisesti, tai konjugoituneet. Polypeptidit voivat konjugoitua muiden kemiallisten ryhmien kautta, mukaan lukien aminohappo- tai polypeptidiristiliittäjien, joita käytetään tavanmukaisesti tekniikan tasolla ja ovat tämän keksinnön alan ammattimiesten hyvin tuntemia.

Tekniikan tasolla tunnetaan veritulppien havaitsemiseen lukuisia menetelmiä, kuten radioaktiivinen leimaus (isotooppien ydintekniikkaan perustuva käyttö), röntgensäteitä läpäisemätön leimaus (kuten CAT-pyyhkäisy), ja magneettiresonanssikuvaus (MRI). Keksinnön mukaisen menetelmän kanssa voidaan käyttää mitä hyvänsä näistä leimausmenetelmistä veritulpan havaitsemiseksi. Kussakin näistä havaitsemismenetelmistä polypeptidiä käytetään diagnostisena aineena veritulpan havaitsemiseksi.

Aikaansaadaan myös tapa laskostaa uudelleen ja hapettaa uudelleen polypeptidi, jossa on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella, mutta josta puuttuu luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin disulfidisidokset ja joka voi sitoutua fibriiniin, jossa tavassa polypeptidi saatetaan kontaktiin tiolin sisältävän yhdisteen kanssa disulfidin läsnä ollessa tai puuttuessa polypeptidin uudelleenlaskostamiseksi ja uudelleenhapettamiseksi.

Edullisesti tiolin sisältävä yhdiste on glutationi, tioredoksiini, ß-merkaptoetanoli tai kysteiini.

Edullisesti tiolin sisältävä yhdiste on ß-merkaptoetanoli,

ja disulfide muodostetaan in situ ilmaa lisäämällä.

Edullisesti polypeptidi on 18,5-kD polypeptidi, 20-kD polypeptidi, 12-kD polypeptidi tai 45-kD polypeptidi. 45-kD kimeerinen polypeptidi, joka koostuu 12-kD FBD:stä fuusioituna 33-kD CBD:hen, on uudelleenlaskostettu ja uudelleenhapetettu täsmälleen samaa menetelmää käyttämällä kuin pienemmät FBD-polypeptidit.

Uudelleenlaskostus- ja uudelleenlaskostusmenetelmä voi lisäksi käsittää polypeptidin käsittelyn denaturoivalla aineella. Edullisia denaturoivia aineita ovat guanidiinihydrokloridi ja urea.

Polypeptidi on edullisesti alhaisessa konsentraatiossa, kuten alle 1 000 µg/ml.

Tämä keksintö aikaansaa myös menetelmän puhdistetun, biologisesti aktiivisen polypeptidin talteen ottamiseksi, jolla polypeptidillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja joka voi sitoutua fibriiniin, joka menetelmä käsittää:

(a) bakteerisolussa polypeptidiä koodittavan DNA:n sisältävän plasmidin avulla ensimmäisen polypeptidin tuottamisen, jolla on polypeptidin aminohapposekvenssi mutta josta puuttuu disulfidisidos;

(b) solun rikkomisen tuottamaan lyysituotteen, joka sisältää ensimmäisen polypeptidin;

(c) lyysituotteen sentrifugoimisen ensimmäisen polypeptidin konsentroimiseksi;

(d) konsentroidun ensimmäisen polypeptidin erottamisen;

(e) erotetun, konsentroidun ensimmäisen polypeptidin liuottamisen;

(f) liuotetun ensimmäisen polypeptidin uudelleenlaskostamisen ja uudelleenhapettamisen biologisesti aktiivisen polypeptidin muodostamiseksi;

(g) uudelleenlaskostetun ja uudelleenhapetetun, biologisesti aktiivisen polypeptidin erottamisen;

(h) puhdistetun, uudelleenlaskostetun ja uudelleenhapetetun, biologisesti aktiivisen polypeptidin talteenoton; ja

(i) näin talteen saadun biologisesti aktiivisen polypeptidin puhdistamisen.

Edullisesti uudelleenlaskostus ja uudelleenhapetus käsittää polypeptidin saattamisen kontaktiin tiolin sisältävän yhdisteen kanssa disulfidin läsnä ollessa tai puuttuessa polypeptidin uudelleenlaskostamiseksi ja uudelleenhapettamiseksi. Edullisesti tiolin sisältävä yhdiste on glutationi, tioredoksiini, ß-merkaptoetanoli tai kysteiini.

Yhdessä edullisessa suoritusmuodossa tiolin sisältävä yhdiste on ß-merkaptoetanoli, ja disulfidi tuotetaan in situ ilmaa lisäämällä.

Edullisesti polypeptidi on 18,5-kD polypeptidi, 20-kD polypeptidi, 12-kD polypeptidi tai 45-kD polypeptidi. Kuten edellä mainittiin, 45-kD kimeerinen polypeptidi, joka koostuu 12-kD FBD:stä fuusioituna 33-kD CBD:hen, on uudelleenlaskostettu ja uudelleenhapetettu täsmälleen samaa menetelmää käyttämällä kuin pienemmät FBD-polypeptidit.

Menetelmä voi lisäksi käsittää polypeptidin saattamisen kontaktiin denaturoivan aineen, kuten guanidiinihydrokloridin tai urean kanssa.

Edullisesti polypeptidi on alhaisessa konsentraatiossa, kuten alle 1 000 µg/ml.

Edullisesti konsentroidun polypeptidin erottaminen vaiheessa (c) käsittää kromatografian, edullisesti hepariini-Sepharose-kromatografian.

Tämä keksintö aikaansaa myös menetelmän veritulpan muodostumisen estämiseksi kohteessa, joka on altis veritulpan muodostumiselle, jossa menetelmässä kohteelle annetaan polypeptidin (edellä kuvattujen polypeptidien tai fuusioitujen polypeptidien) määrä, joka on veritulpan muodostumisen estämiseen tehokas. Polypeptidi voi olla pelkistetty, tai vaihtoehtoisesti S-H-ryhmät voivat olla salvattuja (esimerkiksi karboksimetyloinnilla tai karboksamidometyloinnilla uudelleenhapettumisen estämiseksi).

Tämä keksintö aikaansaa myös edellä kuvatun polypeptidin sidottuna veritulppia liuottavaan aineeseen veritulppia liuottavien aineiden kohdistamiseksi. Veritulppia liuottavat aineet voivat olla kudosplasminogeeniaktivaattori (TPA), urokinaasi, streptokinaasi, prourokinaasi, anisoyloitu plasminogeeni/streptokinaasi-aktivaattori-kompleksi (Eminase™), TPA-analogeja tai proteaasi.

Keksinnön yhdessä suoritusmuodossa polypeptidillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella, voi sitoutua fibriiniin, sillä on molekyylipaino yli noin 6 kD mutta alle noin 20 kD, sillä on aminohapposekvenssi gln-ala-gln-gln tai met-gln-ala-gln-gln polypeptidin N-terminaalisessa päässä ja jolloin veritulppia liuottava aine on streptokinaasi.

Eräässä edullisessa suoritusmuodossa polypeptide on 12-kD polypeptidi ja veritulppia liuottava aine on streptokinaasi.

Lisäksi aikaansaadaan menetelmä veritulpan liukenemisen saavuttamiseksi, jossa menetelmässä kohteelle annetaan veritulppia liuottavaan aineeseen sidotun polypeptidin määrä, joka on veritulpan liukenemisen saavuttamiseen tehokas.

Keksintö aikaansaa myös menetelmän haavan omaavan kohteen hoitamiseksi, jossa menetelmässä kohteelle annetaan määrä puhdistettua polypeptidiä, joka on oleellisen vapaata muista ihmisperäisistä aineista, ja jolla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja voi sitoutua fibriiniin, polypeptidin yhteydessä, joka käsittää oleellisen osan luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin solunsitomisalueen, joka määrä on tehokas haavan hoitamiseen. Menetelmän yhdessä suoritusmuodossa solunsitomisalue-polypeptidi on 40-kD polypeptidi tai 33-kD polypeptidi.

Lisäksi aikaansaadaan menetelmä haavan omaavan kohteen hoitamiseksi, jossa menetelmässä kohteelle annetaan määrä puhdistetun polypeptidin fuusioitua polypeptidiä, joka on oleellisen vapaata muista ihmisperäisistä aineista, ja jolla on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella ja joka voi sitoutua fibriiniin, fuusioituna toiseen polypeptidiinn, joka käsittää oleellisen osan luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin solunsitomisalueen aminohapposekvenssin, joka määrä on tehokas kohteen hoitamiseen. Menetelmän yksi suoritusmuoto, fuusioitu polypeptide, voi olla 45-kD polypeptidi, jolloin polypeptidi on 12-kD polypeptidi ja toinen polypeptidi on 33-kD polypeptidi. Toisessa suoritusmuodossa fuusioitu polypeptidi voi olla 64-kD fuusioitu polypeptide, jolloin polypeptidi on 31-kD polypeptidi ja toinen polypeptidi on 33-kD polypeptidi.

Keksinnön mukaisilla menetelmillä hoidettu haava voi olla ihohaava, kuten leikkaushaava, ihon puutostilasta aiheutuva haava, ihosiirrehaava tai palovamma. Haava voi myös olla

silmän haava, jolloin silmän haava on sarveiskalvon epiteelin haava tai sarveiskalvon peruskudoksen haava. Lisäksi haava voi olla jännevaurio.

Esimerkit

Kaikki viittaukset kartta-asemiin vastaavat identtisesti numeroituja asemia pitkin kuviossa 2 kuvattua ihmis-fibronektiini-cDNA:n nukleotidisekvenssiä (katso myös kuviota 3, EP-patenttijulkaisusta 207751, julkaistu 7.1.1987, Baralle, F.E.).

Tämä patenttihakemus on suunnattu N-terminaalisen pään fibriininsitomisalueen (FBD) polypeptidifragmentteihin. Kokeelliset tulokset 31-kD polypeptidillä esitetään lyhyempien fragmenttien kanssa vertailemiseksi. Jotkin kuvatuista proteiineista ovat fuusioproteiineja, jotka käsittävät FBD-fragmentin liitettynä C-terminaalisesta päästään solunsitomisalueen(CBD) fragmentin N-terminaaliseen päähän.

cDNA-sekvenssistä, joka vastaa CBD:tä, jonka keksinnön hakijat ovat kloonanneet ja ekspressöineet, puuttuu 270 emäsparin ylimääräisen alueen (ED) segmentti, joka ulottuu nukleotidista 4811 nukleotidiin 5080, mukaan luettuna, Baralle'n kartalla (katso kuviota 2). Siten cDNA-sekvenssi, jonka sanotaan ulottuvan nukleotidista 3317 nukleotidiin 5566 Baralle'n kartalla, sisältää vain 1980 nukleotidia, koska siitä puuttuu ED-segmentin 270 nukleotidia, ts. nukleotidista 4811 nukleotidiin 5080, mukaan luettuna; tämä alue tunnetaan tekniikan alalla myös ED-A-alueena. Koska nukleotidi 5081 on muuttunut G:stä A:ksi, on aminohappo 1690 muuttunut alaniinista treoniiniksi. Samalla lailla polypeptidi, jota tuo DNA-fragmentti ekspressöi, koodittuisi aminohaposta 1102 aminohappoon 1851 Baralle'n kartalla, mutta siitä puuttuisi 90 ED-alueen koodittamaa aminohappoa, ts. aminohapot 1600 - 1689 mukaan luettuna, ja siten se sisältäisi vain 660 aminohappoa. Tämä pätee kaikille tässä patenttihakemuksessa

kuvatuille CBD-fragmenteille, jotka yltävät ED-alueen yli. (Alueelta, joka tunnetaan tekniikan tasolla ED-B-alueena, puuttuvat sekä Baralle'n sekvenssi että keksinnön hakijoiden cDNA.)

Keksinnön hakijat konstruoivat asemassa 3317 esitetyn EcoRI-katkaisukohdan kloonausmenettelytavan aikana EcoRI-linkkereitä käyttäen. Tämä GAATTC-sekvenssi asemissa 3313 - 3318 poikkeaa yhden nukleotidin suhteen vastaavasta Baralle-sekvenssistä GATTC. Tämä lisää yhden ainoan nukleotidimuutoksen C:stä A:ksi nukleotidin 3315 kohdalla. Tämä muuttaa vastaavan aminohapon numero 1100 Thr:stä Asn:ksi.

Esimerkki 1

Fibronektiini-cDNA-kirjasto

Valmistettiin cDNA-kirjasto λ gt11:ssä poly A+ mRNA:sta, joka eristettiin ihmisen maksasta julkaistujen menetelmien mukaisesti (13,14). cDNA-fragmentit kloonatrtiin EcoRI-linkkereitä käyttämällä, ja cDNA-kirjasto seulottiin fibronektiini(FN)-positiivisten plasmiden suhteen seuraavia synteettisiä DNA-koettimia käyttäen.

Koettimet solunsitomisaluetta (CBD) varten:

| Koetin | Nukleotidit |
|---|---|
| (3')CACTCTATAATGTCCTAGTGAATGCCTCTTTGTCCTCC | (4355-4392) |
| (3')AGAATCTCCTTCTGTCTTTTGTCCAGAACTAAG | (3967-3999) |
| (3')CCGGTTGTTAGTTGTCAAAGACTACAAGGCTCCCTGGACC | (4200-4239) |

Koettimet N-terminaalista fibriininsitomisaluetta (FBD) varten:

| | |
|---|---|
| (3')GGGGGTCGGAGGGATACCGGTGACACAGTGTCTTAA | (817-850) |

(3')CGACGGGTGCTCCTTTAGACGTGTTGGTTACTTCCCCAGTAC (1310-1340)

Tunnistettiin ja eristettiin sarja FN-cDNA-klooneja, jotka kattavat koko fibriinin-, kollageenin-, hepariinin- ja solunsitomisalueet (kuvio 9). cDNA-fragmentit alikloonattiin pBR322:n EcoRI-kohtaan.

Vaihtoehtoisesti FN:n mRNA katkeaa, ja sen vuoksi kirjallisuudessa on kuvattu erimittaisia cDNA'ita. Keksinnön hakijoiden cDNA:ssa, joka vastaa solunsitomisaluetta, on 270 emäsparin deleetio emäksestä 4811 emäkseen 5080 FN:n fysikaalisella kartalla (täydellinen katkaisematon cDNA).

Esimerkki 2

Fibriininsitomisalue(FBD)-polypeptidien ekspressio ja puhdistus

A. Osittaisen FBD 20-kD polypeptidin ekspressio

Esimerkissä 1 kuvatulla tavalla saadut ja kuviossa 9 kuvatut FN-cDNA-kloonit eivät sisältäneet DNA:ta, joka koodittaa FN-molekyylin aminohappoja 1 - 190. Nämä aminohapot ovat osa FBD:tä. DNA, joka vastaa nukleotidejä 14 - 472 ja koodittaa aminohappoja 1 - 153 (kuvio 2A), konstruoitiin liittämällä 7 kemiallisesti syntetisoitujen nukleotidien paria (kuviot 3 ja 4). Synteettinen DNA-fragmentti suunniteltiin sisältämään ATG-aloituskodonin 5'-päässä, samoin kuin sopivat restriktiokohdat erilaisten ekspressiovektoreiden lisäämiseksi. Jotta mahdollistettaisiin FBD:tä koodittavan DNA-sekvenssin manipulointi nukleotidi numero 19, tymidiini (T), muutettiin adeniiniksi (A), poistaen siten DdeI-restriktiokohdan aminohapposekvenssiä muuttamatta. (Nukleotidimuutoskohtaa merkitään tähdellä kuviossa 3A esitetyssä linkkerissä #1.) Kuviossa 4 kuvataan eri vaiheet edellä olevan synteettisen DNA-fragmentin kloonaamiseksi pBR322 plasmidivektoriin, joka on sulatettu EcoRI:llä ja BamHI:llä. Saatua plasmidia merkittiin nimellä pFN 932-18. Plasmidista pFN 932-18 oleva DNA-fragmentti, joka koodittaa fibronektiinin 153 ensimmäis-

tä N-terminaalinen aminohappoa, insertoitiin pTV 301:een, λ-$P_L$-ekspressiovektoriin, NdeI- ja BglII-kohtien väliin korvaten DNA-sekvenssin, joka koodittaa ihmisen kasvuhormonia (hGH) plasmidissa pTV 301 (kuvio 5).

Tulokseksi saatu plasmidi, pFN 949-2, talletettiin kansainväliseen talletuslaitokseen the American Type Culture Collection tulonumerolla 67831. Plasmidia pFN 949-2 käytettiin Escherichia coli-prototrofin A4255 transformoimiseen. Näiden transformoitujen Escherichia coli-solujen keksittiin ekspressöivän osittaista FBD-polypeptidiä määriä, jotka käsittivät noin 5 % solun kokonaisproteiineista. Polypeptidillä on liikkuvuus noin 20 kD pelkistetyillä SDS-polyakryyliamidigeeleillä kokomerkkien liikkuvuudella määritettynä. Polypeptidi sisältää fibronektiinin ensimmäiset 153 aminohappoa, joita seuraa 4 aminohappoa, joita koodittaa synteettinen linkkeri, ja sitten useita aminohapppoja, jotka ovat tulosta läpikirjoittautumisesta pBR322-vektoriin TAA-lopetuskodonin puuttumisesta johtuen, ts. yhteensä 153 aminohappoa ynnä alle 20 lisäaminohappoa, N-terminaalisella lisämetioniinilla. Polypeptidiä kutsutaan koko tässä selityksessä r20 kD polypeptidiksi tai r20 kD FBD:ksi.

B. "Täydellisen" polypeptidin ekspressio

Jotta saataisiin aminohapot 1 - 262 sisältävän koko FBD-polypeptidin ekspression konstruoitiin seuraavat plasmidit:

1. TAA-lopetuskodonin insertio 3'-päähän

Synteettinen oligonukleotidi, joka sisälsi TAA-lopetuskodonin ja BglII-kohdan, jolla oli seuraava sekvenssi:

5' CTGTTTAATAAGCA
3' GACAAATTCGTCTAG

liitettiin FN-cDNA-kloonista p931-5 eristetyn EcoRI/PvuII-fragmentin 3'-päähän ja pBR322-vektoriin, joka oli sulatettu EcoRI:llä ja BamHI:llä kuviossa 6 kuvatulla tavalla. Saatu

plasmidi sai nimen pFN935-12.

2. FBD:n karboksiterminaalisen alueen alikloonaaminen λ-$P_L$-ekspressiovektoriin

EcoRI/HincII-DNA-fragmentti, joka koodittaa FBD:n karboksiterminaalista aluetta, eristettiin plasmidista pFN935-12 ja liitettiin plasmidiin pTV 194-80, joka oli sulatettu EcoRI:llä ja SmaI:llä, kuten kuvataan yhdessäsiirretyssä PCT-patenttijulkaisussa WO9007577 (kuvio 46). Saatu plasmidi sai nimen pFN 946-12.

3. FN:n nukleotidien 468 - 599 vastaavan DNA:n synteesi ja kloonaus

Kolme paria kemiallisesti syntetisoituja nukleotideja liitettiin plasmidista pFN932-18 eristettyyn EcoRI/DdeI-FN-fragmenttiin (kuvio 4) pUC19-vektori-DNA:n (ostettu yhtiöstä GIBCO BRL Co.) läsnä ollessa, joka oli sulatettu EcoRI:llä ja XbaI:llä edellä viitatussa PCT-patenttijulkaisussa yksityiskohtaisesti kuvatulla tavalla (kuvio 47). Saatu plasmidi sai nimen pFN 948-4.

4. Täydellistä FBD-aluetta koodittavan plasmidin konstruointi

Plasmidin konstruoimiseksi, joka koodittaa koko FBD:tä, aminohaposta 1 aminohappoon 262, EcoRI/XbaI-DNA-fragmentti, joka koodittaa FN:ää, eristettiin plasmidista pFN948-4 ja insertoitiin plasmidiin pFN 946-12, joka oli sulatettu EcoRI:llä ja XbaI:llä edellä mainitussa PCT-patenttijulkaisussa kuvatulla tavalla (kuvio 48). Saatu plasmidi sai nimen pFN-957. Tämä plasmidi sisältää täydellisen koodisekvenssin FBD:tä varten, mutta se ei ekspressöi FBD-polypeptidiä, koska siitä puuttuu ribosominsitoutumiskohta (RBS).

5. FBD:n ekspressio λ-$P_L$-promoottorin ja cII-RBS:n alla

NdeI/HindIII-fragmentti, joka sisälsi FBD-koodialueen ja $T_1T_2$-transkription lopettajat, eristettiin plasmidista pFN-957 ja insertoitiin plasmidiin pTV 301, joka oli sulatettu

NdeI:llä ja HindIII:llä kuten kuvataan edellä mainitussa PCT-patenttijulkaisussa (kuvio 49). Tulokseksi saatu plasmidi, joka sai nimen pFN 962-3, ohjaa FBD-polypeptidin ekspressiota λ-$P_L$-promoottorin ja cII-ribosominsitomiskohdan kontrollin alla. Escherichia coli-kannat A1645 ja A4255, jotka oli transformoitu tällä plasmidilla, ekspressöivät vain pieniä FBD-polypeptidimääriä. FBD-polypeptidin ekspressio oli havaittavissa vain "Western blot"-analyysillä käyttämällä ihmisen plasmaperäistä FN:ää suunnattuja polyklonaalisia vasta-aineita käyttäen.

6. FBD-polypeptidin ekspressio λ-$P_L$-promoottorin ja ß-laktamaasipromoottorin ja ribosominsitoutumiskohdan alla

Koska plasmidilla pFN 962-3 saadun FBD-polypeptidin ekspression taso oli alhainen, lisäsimme DNA-fragmentin, joka koodittaa ß-laktamaasipromoottoria ja ß-laktamaasi-RBS:ää (PBLA). DNA-fragmentti, joka koodittaa PBLA:ta, eristettiin plasmidista pBLA11 (ATCC tulonumero 39788) ja insertoitiin plasmidiin pFN 962-3, joka oli sulatettu NdeI:llä, täytetty Klenow-entsyymillä ja sulatettu EcoRI:llä (katso edellä mainittua PCT-patenttijulkaisua). Saatu plasmidi, joka sai nimen pFN 975-25, talletettiin laitokseen the American Type Culture Collection ATCC-tulonumerolla 67832. Tätä plasmidia käytettiin Escherichia coli-prototrofin A4255 ($F^+$) transformointiin.

Näiden Escherichia coli-solujen havaittiin ekspressöivän "täydellistä" FBD-polypeptidiä tasoilla, jotka käsittävät noin 5 - 8 % solun kokonaisproteiinista. Polypeptidi liikkui SDS-PAGE-geeleillä pelkistävissä olosuhteissa näennäisellä molekyylipainolla 31 kD, siten sitä kutsutaan nimellä 31-kD polypeptidi tai r31 kD FBD.

C. Fermentointi- ja kasvatusolosuhteet

r31 kD FBD-polypeptidiä ekspressöivää kloonia fementoitiin rikkaassa väliaineessa (hiivauute ja kaseiinihydrolysaatti), joka sisälsi ampisilliinia. Kasvatus suoritettiin 30 °C:ssa.

Ekspressio saatiin, kun oli indusoitu 2 tunnin ajan 42 °C:ssa, ja seuraavaksi saatiin bakteerisolukakku, joka sisälsi r31 kD FBD-polypeptidin. Samalla lailla kloonia, joka ekspressöi r20 kD FBD:tä, fermentoitiin, ja saatiin bakteerisolukakku, joka sisälsi r20 kD FBD-polypeptidin.

D. Yhdistelmä-DNA-fibriininsitomisalue(r31 kD)-polypeptidin uudelleenlaskostus ja puhdistus
Menetelmä koostuu kolmesta vaiheesta:

1. Bakteerikakun raakakäsittely.
2. Uudelleenlaskostus/uudelleenhapetus.
3. Puhdistus.

1. Raakakäsittely
Kakku rikotaan ensin 5 tilavuudessa 50 mM Tris-HCl/50 mM Na-EDTA, pH 8 (puskuri 1); sitten pelletti käsitellään 1,2 tilavuudella puskuria 1, joka sisälsi 100 mg/l lysotsyymiä (2 tunnin asekoitus 37 °C:ssa). Tulokseksi saatuun suspensioon lisätään Triton X 100:aa (1 %:iin), ja 30 min jälkeen huoneenlämpötilassa suspensio sentrifugoidaan, ja pelletti suspendoidaan uudelleen ja pestään kahdesti vedellä. Kaikki nämä vaiheet suoritetaan rikkomalla pelletin ja sentrifugoimalla, ja 31-kD pysyy pelletissä, kuten SDS-PAGE-geeleillä osoitetaan.

Pesty pelletti suspendoidaan 14 tilavuuteen 10 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/2 mM PMSF/2mM 6-aminokaproaattia, pH 7,5 (puskuri A) ja käsiteltiin sitten peräkkäin puskurilla A, joka sisältää: 1 % dekyylisulfaattia, 1 % dekyylisulfaattia/5 % glyserolia, ja 5 % glyserolia. Voiimeinen käsittely tapahtuu puskurilla A ilman lisäaineita.

2. Uudelleenlaskostus/uudelleenhapetus
Periaate: Pelletin liuottaminen 6 M guanidiini·HCl:ään - GuCl - tiolipelkistysreagenssin kuten glutationin GSH läsnä ollessa ja uudelleenlaskostaminen/uudelleenhapettaminen

alhaisemmalla GuCl-konsentraatiolla hapetettua glutationi-GSSG:tä lisäämällä.

Pesty pelletti edellä olevasta vaiheesta 1 liuotetaan 150 - 700 tilavuuteen 6 M GuCl/3 mM GSH puskurissa A. GuCl:n konsentraatiota alennetaan vaiheittain, ts., ensin 2 M, sitten 1 M ja 0,5 M, pitäen kaikkien muiden komponenttien konsentraation vakiona, lukuunottamatta tilavuutta, joka tässä vaiheessa saatetaan 500 - 1000-kertaiseksi suuremmaksi kuin pelletin. Yhdellä keskivälin GuCl-konsentraatioista, ts. välillä 0,5 ja 2 M, aloitetaan uudelleenlaskostus lisäämällä 0,3 mM GSSG:tä ja inkuboimalla huoneenlämpötilassa 24 - 48 tuntia. Sitten uudelleenlaskostettua 31 kD:tä dialysoidaan puskuria A vastaan ilman lisäaineita.

3. Puhdistus

Konsentrointi: Suuri tilavuus uudelleenlaskostettua 31 kD:tä sentrifugoidaan ensin liukenemattoman pelletin opoistamiseksi, joka ei sisällä 31 kD:tä, ja dialysoidaan sitten Tris-HCl:ää vastaan, pH 7,8, ennen konsentrointia ja alustavaa puhdistusta hepariini-Sepharose-kolonnilla.

Parannettuja menettelytapoja FBD:n polypeptidifragmenttien uudelleenlaskostukseen/uudelleenhapetukseen ja puhdistukseen kuvataan esimerkeissä 5 ja 10.

Esimerkki 3

r31 kD, r20 kD, r18,5 kD ja r12 kD fibriininsitomisaluepolypeptidifragmenttien farmakodynamiikka

Hyytymän (veritulpan) kuvan intensiteettiä ja resoluutiota ohjaa radiofarmaseuttisen aineen sisääntulonopeuden ja sen veripuhdistumanopeuden välinen vuorovaikutus. r31 kD fibriininsitomisalueen metabolisen käyttäytymisen arvioimiseksi, ja sen vertaamiseksi fibronektiinin (FN) kanssa r31 kD fibriininsitomisalue ja plasman fibronektiini jodattiin molemmat $^{125}$I:llä ICl-menetelmällä (24) ja injisoitiin rottiin laskimonsisäisesti. Tulokset esitetään kuviossa 7, joka

edustaa $^{125}$I-r31 kD FBD:n ja $^{125}$I-FN:n farmakokineettistä käyttäytymistä. Otettiin verinäytteet kuvassa esitettyinä ajankohtina.

Kuviossa 7 osoitetaan, että näiden kahden radioaktiivisen molekyylin puhdistumanopeudet ovat erilaiset, ja 5 tunnin kuluttua vain 3 % r31 kD FBD:stä mutta 20 % FN:stä vastaavasti pysyi verenkierrossa.

Joitain rotista pidettiin henkilökohtaisssa metabolisissa häkeissä, ja kertynyt virtsa ja ulosteet kerättiin kohdilla 7 tuntia ja 24 tuntia. Noin 30 % injisoidusta $^{125}$I-r31 kD-radioaktiivisuudesta erittyi virtsaan ensimmäisten 7 tunnin aikana, ja yli 90 % erittyi 24 tunnin jälkeen. Kaikki virtsan radioaktiivisuus oli trikloorietikkahappoliukoista, mikä ilmaisee proteolyyttisen hajoamisen. Analyysi erilaisilla elimillä (munuaiset, vatsa, maksa, keuhkot, kohtu, munasarjat, lisämunuainen, paksusuoli, sykkyräsuoli, iho, aivot, silmä, lihas, virtsarakko, sydän, perna, henkitorvi, aortta ja onttolaskimo) ei paljastanut mitään erityistä kertymistä, ja radioaktiivisuuden häviämisen kinetiikka noudatti samanlaista mallia kuin veren. Elimistä useimmissa spesifinen radioaktiivisuus (cpm/g kudosta) oli alhaisempi kuin seerumin.

Tulokset ilmaisevat, että FN:n 31-kD aminoterminaalinen eksogeeninen yhdistelmä-DNA-polypeptidi hajoaa kohtuullisesti ja erittyy kehossa. Farmakokineettinen käyttäytyminen ei ole ensimmäisen kertaluokan kinetiikan mukaista, mikä voi viitata siihen, että polypeptidi on kohtuullisesti jakaantunut muihin kudoksiin ja kehon osastoihin kuin vereen. Tämä on ilmenee havainnosta, että hajoamisaste ei kasva ajanjaksona 4 - 24 tuntia, heijastaen siten polypeptidin vähitellen tapahtuvaa vapautumista kehon osastoista. Metaboliittien yksinomainen ja suhteellisenvarhainen ilmaantuminen virtsaan osoittaa, että polypeptidi erittyy hyvin munuaisten kautta. Materiaalin maksaan kertymisen puuttuminen voi ilmaista,

että tämä elin ei ole pääasiallinen hajoamispaikka, eikä liity detoksifikaatioon.

r31 kD FBD:n suhteellisen lyhyt puoliintumisaika on myös tärkeä sen mahdolliselle käytölle veritulppien diagnostisessa kuvauksessa. Yhdistelmä-DNA 31 kD FBD (r31 kD) voidaan leimata radioaktiivisesti tai muulla tavalla ja lisätä sittenvereen veritulppienkuvaustarkoitukseen.

Molekyylin lyhyempi puoliintumisaika on tärkeää myös kun sitä käytetään hyytymän muodostumisen estoon. Vastakohtana hepariinilla, nykyisin suositulla terapeuttisella aineella, on haittana hyvin pitkä puoliintumisaika.

Samanlainen koe suoritettiin käyttämällä plasman fibronektiinin jodattua 31 kD fibriininsitomisaluetta, ja havaittiin samanlainen radioaktiivisuuden farmakokineetiikka ja jakaantuminen.

31-kD polypeptidi saatiin katkaisemalla plasman FN:n seuraavalla tavalla: plasman FN puhdistettiin gelatiini-Sepharose-kolonnilla, josta se eluoitiin ja säilytettiin 1 M guanidiniumhydrokloridissa. Tämän jälkeen 206 mg FN:ää, sen jälkeen kun se oli dialysoitu 10 mM Tris·HCl:ää vastaan, sulatettiin 0,01 % TPCK-trypsiinillä 37 °C:ssa 5 min ajan. Tryptinen sulate lisättiin DE52-kolonnin päälle (6 ml), ja 1/5 läpi virranneesta fraktiosta (50 ml) lisättiin CM-Sepharose-kolonniin (3 ml) ja eluoitiin NaCl-gradientilla (0 - 0,5 M). Noin 80 % polypeptidistä otettiin talteen suolagradientissa (huippu kohdalla noin 220 mM), ja suolan poistamiseksi suoritetun dialyysin jälkeen noin 1/2 polypeptidista lisättiin hepariini-Sepharose-kolonniin (1,5 ml) ja eluoitiin 0,5 M NaCl:llä. Noin 75 % polypeptidistä otettiin talteen tästä fraktiosta, ts., noin 1 mg (noin 40 % teoreettisesta saannosta). Tämä fraktio oli >90-% puhdasta 31-kD polypeptidiä, ja se jodattiin edellä kuvatulla menetelmällä. Parannetussa suoritusmuodossa CM-Sepharose-vaihe jätetään pois, ja hepa-

riini-Sepharose-vaihe suoritetaan suoraan DE52-kolonnin jälkeen.

Huomaa, että plasman 31-kD FBD sisältää FN:n emsimmäiset 259 aminohappoa, kun taas 31-kD yhdistelmä-DNA-FBD sisältää FN:n ensimmäiset 262 aminohappoa ja N-terminaalisen lisämetioniinin.

r20 kD, r18,5 kD ja r12 kD fibriininsitomisaluepolypeptidien farmakokinetiikka

Samanlaiset kokeet suoritettiin käyttämällä leimattuja r20 kD, r18,5 kD ja r12 kD fibriininsitomisaluepolypeptidejä, jotka tuotettiin esimerkeissä 2, 4, 5 ja 10 kuvatuilla tavoilla. Näiden polypeptidien farmakokinetiikan havaittiin olevan hyvin samanlainen kuin r31 kD polypeptidin.

Esimerkki 4

Muiden fibriininsitomisalue(FBD)-polypeptidien ekspressio ja fermentointi

Esimerkissä 2 kuvattiin osittaisen r20 kD FBD:n ja täysimittaisen r31 kD FBD:n ekspressio, ja yhdessäsiirretyn PCT-patenttijulkaisun WO90/07577 esimerkissä 24 esitettiin parannettu menetelmä 31 kD FBD:n uudelleenlaskostamiseen ja puhdistamiseen. Nyt kuvataan plasmidien konstruointi FBD:n muiden polypeptidifragmenttien ekspressiota varten.

A. r12 kD FBD-polypeptidin ekspressio

Plasmidi pFN 975-25, ATCC 67832, ekspressöi fibronektiinin täysimittaista r31 kD FBD:tä, ja siitä konstruoitiin kuviossa 10 esitetyllä tavalla plasmidi pFN 196-2, joka ekspressöi osittais-FBD:tä. Tämä plasmidi transformoitiin Escherichia coli-kantaan A1645, ja sitten Escherichia coli-kantaan A4255 ja talletettiin A4255:ssä talletuslaitoksessa the ATCC tulonumerolla 68328. Nämä transformoidut solut havaittiin hyviksi osittais-FBD-polypeptidin ekspressöijiksi määrissä, jotka käsittivät noin 5 % solun kokonaisproteiinista. Polypeptidin liikkuvuus on noin 14,4 kD SDS-polyakryyliamidigee-

leillä pelkistävissä olosuhteissa kokomerkkiaineiden liikkuvuuden perusteella määritettynä. Polypeptidi käsittää fibronektiinin ensimmäiset 109 aminohappoa. Metioniinilisätähde on läsnä lopullisen polypeptidin N-terminaalisessa päässä. Koko tässä selityksessä tätä polypeptidiä kutsutaan r12 kD polypeptidifragmentiksi tai r12 kD FBD:ksi.

B. Modifioidun 12 kD (12 kD') osittais-FBD-polypeptidin ekspressio

Plasmidia pFN 975-25 (ATCC 67832), joka ekspressöi täysimittaista r31 kD FBD:tä, käytettiin konstruoitaessa kuviossa 11 esitetyllä tavalla plasmidi pFN 197-10, joka ekspressöi modifioitua r12 kD polypeptidiä (r12 kD'). Fibronektiini-FBD-sekvenssiä modifioitiin NdeI-kohdan muodostamiseksi välittämästi nukleotidin 340 jälkeen. Tämä plasmidi transformoitiin Escherichia coli-kantaan A1645 ja sen jälkeen Escherichia coli-kantaan A4255. Nämä transformoidut solut havaittiin hyviksi modifioidun r12 kD osittais-FBD:n ekspressöijiksi määrissä, jotka käsittivät noin 5 % solun kokonaisproteiinista. Polypeptidillä on modifioimattoman 12 kD FBD:n kanssa samanlainen liikkuvuus määritettynä pelkistetyillä SDS-polyakryyliamidigeeleillä. Polypeptide käsittää fibronektiinin ensimmäiset 109 aminohappoa, joita seuraavat lisäaminohapot histidiini ja metioniini. Metioniinilisätähde on läsnä lopullisen polypeptidin N-terminaalisessa päässä. Tätä polypeptidiä kutsutaan r12 kD'-polypeptidiksi tai r12 kD' FBD:ksi.

C. 33-kD solunsitomisalueeseen fuusioidun modifioidun r12 kD' FBD:n ekspressio

Plasmidia pFN 197-10, joka sisältää NdeI-kohdan modifioidun 12 kD FBD:n 3'-terminaalisessa päässä, käytettiin konstruoimaan plasmidin, jota kutsutaan nimellä pFN 202-5, joka koodittaa modifioitua 12-kD FBD:tä fuusioituna 33-kD solunsitomisalueeseen (CBD). Tämä konstruointi suoritettiin kuviossa 12 esitetyllä tavalla, jolloin 33-kD CBD-fragmentti otettiin plasmidista pFN 137-2 (talletettu talletuslaitokseen ATCC

tulonumerolla 67910). Plasmidi pFN 202-5 transformoitiin Escherichia coli-kantaan A1645 ja sitten Escherichia coli-kantaan A4255, ja se on hyvä ekspressöija (8 % kokonaisproteiinista). 45-kD polypeptidi koostuu 12 kD' FBD:stä fuusioituna 33-kD CBD:hen (FBD:n ensimmäiset 109 aminohappoa, minkä jälkeen seuraavat aminohappotähteet histidiini ja metioniini, minkä jälkeen seuraa CBD alkaen seriinillä. Metioniinilisätähde on läsnä lopullisen polypeptidin N-terminaalisessa päässä).

D. Aminohapposekvenssiin DGRGDS fuusioidun 31-kD FBD-polypeptidin ekspressio

Sekvenssin asp-gly-arg-gly-asp-ser (DGRGDS) karboksiterminaaliseen päähän fuusioidun 31-kD FBD-polypeptidin ekspression saavuttamiseksi tehtiin seuraava konstruktio. Plasmidi pFN 975-25, joka ekspressöi 31-kD FBD:tä, sulatettiin PvuII:lla ja HindIII:lla ja liitettiin synteettiseen linkkeriin kuviossa 13 esitetyllä tavalla. Tulokseksi saatu plasmidi, jota kutsutaan nimellä pFN 195-4, käytettiin transformoimaan Escherichia coli-kantaa A1645 ja sitten Escherichia coli-kantaa A4255. Nämä solut havaittiin hyviksi 31-kD DGRGDS-polypeptidin ekspressöijiksi, tasoilla noin 8 % solun kokonaisproteiinista. Tämän polypeptidin sekvenssi kuvataan kuvion 13 kuvauksessa.

E. Fuusioidun 31-kD FBD/33-kD CBD:n ekspressio

Jotta saataisiin ekspressio "täysimittaisesta" r31 kD FBD-polypeptidistä fuusioituna r33 kD CBD:hen tehtiin seuraava konstruointi.

Plasmidi pFN 975-25, joka ekspressöi 31-kD FBD:tä, sulatettiin PvuII:lla ja HindIII:lla, ja tulokseksi saatu suuri fragmentti liitettiin synteettiseen linkkeriin ja r33 kD solunsitomisalueeseen, joka saatiin plasmidista pFN 137-2 NdeI- ja HindIII-sulatuksen jälkeen (kuten kuviossa 14 esitetään). Tulokseksi saatu plasmidi, jota merkitään pFN 194-2, koodittaa r31 kD FBD:tä liitettynä 33-kD CBD:hen. Plasmi-

di pFN 194-2 transformoitiin Escherichia coli-kantaan A1645 ja sitten Escherichia coli-kantaan A4255, ja tulokseksi saadut solut ekspressöivät alhaisia tasoja 64-kD polypeptidiä, joka käsittää 31-kD FBD:n fuusioituna 33-kD CBD:hen. Tämän polypeptidin sekvenssi kuvataan kuvion 14 kuvauksessa.

Fermentointi- ja kasvatusolosuhteet
Kloonia, joka ekspressöi r12 kD FBD-polypeptidiä, fermentoitiin rikkaassa väliaineessa (hiivauute ja kaseiinihydrolysaatti), joka sisälsi ampisilliinia. Kasvatus suoritettiin 30 °C:ssa. Ekspressio saavutettiin kun oli indusoitu 42 °C:ssa 2 tunnin ajan, ja seuraavaksi saatiin bakteerisolukakku, joka sisälsi r12 kD FBD-polypeptidin. Samalla lailla saatiin solukakku, joka sisälsi muut edellä kuvatut proteiinit.

F. Muut plasmidikonstruktiot
1. 18,5-kD FBD-polypeptidifragmentti: Edellä kuvatulla tavalla, (esimerkki 2A) 20-kD FBD-fragmentti, jota plasmidi pFN 949-2 (ATCC 68456) ekspressöi, sisältää jopa 20 vektorin pBR 322 lisäaminohappoa johtuen läpiluvusta FN-geenin jälkeen sopivasti sijaitsevan TAA-transkriptionlopetuskodonin puuttuessa. Jotta saataisiin autenttisempi "3-sorminen" FBD-polypeptidifragmentti kuin esimerkissä 2A kuvattu 20-kD fragmentti, konstruoitiin plasmidi, joka koodittaa 18,5-kD FBD-polypeptidiä.

Konstruointi esitetään kuviossa 23 ja kuvataan kuvioiden kuvauksessa. Tulokseksi saatu plasmidi, jota kutsutaan nimellä pFN 208-13, ekspressöi 18,5-kD FBD-polypeptidifragmenttia $P_L$-promoottorin ja ß-laktamaasiribosominsitoutumiskohdan kontrollin alla. Plasmidi pFN 208-13 talletettiin talletuslaitokseen ATCC E. coli A4255:ssä tulonumerolla 68456. Tämä plasmidi ekspressöi fibronektiinin ensimmäisiä 154 aminohappoa N-terminaalisella lisämetioniinilla.

2. 12-kD FBD-polypeptidifragmentin parannettu ekspressöija:

Plasmidi pFN 196-2 (ATCC 68328), joka ekspressöi 12-kD FBD-polypeptidifragmenttia (2 "sormea") λ-$P_L$-promoottorin ja ß-laktamaasin ribosominsitoutumiskohdan kontrollin alla, kuvattiin edellä. 12-kD fragmentin ekspressiotason edelleen parantamiseksi plasmidi pFN 203-2 konstruoitiin kuvioissa 26 ja 27 esitetyllä ja kuvion kuvauksessa kuvatulla tavalla. Plasmidi pFN 203-2 ekspressöi 12-kD fragmenttia λ-$P_L$-promoottorin, CII-ribosominsitoutumiskohdan ja 36 emäsparin trp-transkriptionlopetussekvenssin kopntrollin alla. Plasmidi pFN 203-2 talletettiin talletuslaitokseen ATCC E. coli A4255:ssä tulonumerolla 68606. Nämä transformoidut solut havaittiin hyviksi 12-kD FBD-polypeptidifragmentin ekspressöijiksi määrissä, jotka käsittivät noin 12 - 18 % solun kokonaisproteiinista.

3. Fuusioidun 31-kD FBD/33-kD CBD-polypeptidin hyvä ekspressio:
EDellä kuvattiin plasmidi pFN 194-2, joka on 64-kD fuusiodun FBD/CBD-polypeptidin alhaisen tason ekspressöija λ-$P_L$-promoottori ja ß-laktamaasiribosominsitoutumiskohdan kontrollin alla. Konstruoitiin plasmidi sallimaan 64-kD polypeptidin korkean tason ekspression λ-$P_L$-promoottorin, CII-ribosominsitoutumiskohdan ja 36 emäsparin trp-transkriptionlopetussekvenssin kontrollin alla. Tämä plasmidi, jota kutsuttiin nimellä pFN 205-5, konstruoitiin kuviossa 25 esitetyllä ja kuvioiden kuvauksessa kuvatulla tavalla.

Kaikkien näiden ekspressioplasmidien (1 - 3 yllä) fermentointi- ja kasvatusolosuhteet olivat oleellisesti muiden FBD-polypeptidien tuotannolle kuvatut (katso esimerkkiä 2C). Puhdistus ja uudelleenlaskostus kuvattiin esimerkissä 5 ja esimerkissä 10.

Esimerkki 5

Fibronektiinin 20-kD ja 12-kD yhdistelmä-DNA-fibriininsitomispolypeptidien uudelleenlaskostus ja puhdistus.
r20 kD- ja r12 kD-polypeptidien uudelleenlaskostus- ja puh-

distusmenetelmä koostuu kolmesta vaiheesta:

1. Bakteerikakun raakakäsittely.

2. Uudelleenlaskostus/uudelleenhapetus.

3. Puhdistus.

1. Raakakäsittely

1.1 Pelletin pesu ja uutto:
Bakteerisolukakku, joka saatiin tavalla, joka esimerkissä 2 kuvattiin r20 kD-polypeptidille ja kuten esimerkissä 4 kuvattiin r12 kD-polypeptidille, rikotaan ja pestään oleellisesti kuten r31 kD polypeptidi (katso yhdessä siirrettyä PCT-patenttijulkaisua WO90/07577, s. 121 ja eteenpäin); sekä r20 kD- että r12 kD-polypeptidille käytettyyn uuttomenetelmään tehtiin kuitenkin muutoksia. Seuraava on esimerkki r20 kD polypeptidin bakteerisolukakulla suoritetusta pesu- ja uuttomenettelystä; r12 kD polypeptidi uutetaan samalla tavalla.

1.2 Menettelytapa:
Bakteerikakku, joka sisältää r20 kD polypeptidin, tuotettiin esimerkissä 2 kuvatulla tavalla fermentoimalla Escherichia coli-kantaa A4255, joka sisälsi plasmidin pFN 949-2. Osa tästä bakteerikakusta (14,8 g) suspendoitiin 10 tilavuuteen 50 mM Tris·HCl:ää, 50 mM EDTA (puskuri B), pH 7,5. Suspensiota homogenisoitiin 15 - 30 s ajan keskinkertaisella nopeudella, sonikoitiin kolmesti 4 min ajan pulssittaen, ja sentrifugoitiin 30 min ajan nopeudella 15 000 r/min. Pelletti suspendoitiin uudelleen 2,4 tilavuuteen (36 ml) puskuria B. Lisättiin lysotsyymiä (0,1 mg/ml), ja suspensiota inkuboitiin vesihauteessa 2 tunnin ajan 37 °C:ssa. Lisättiin Triton X-100:aa lopulliseen konsentraatioon 1 %, sekoitettiin 30 min ajan huoneenlämpötilassa ja sentrifugoitiin. Pelletti suspendoitiin uudelleen kolmesti 148 ml:aan vettä (ts. 10 kertaa alkuperäisen pelletin tilavuus), homogenisoi-

tiin, sekoitettiin 30 min ajan huoneenlämpötilassa ja sentrifugoitiin. Lopullinen pelletti painoi noin 1,5 g, ts. vain 10 % alkuperäisestä painosta; Kuitenkin sekä r20 kD- että r12 kD-polypeptidi pysyy pelletissä, kuten SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla osoitettiin. Pesty ja uutettu pelletti pidettiin pakastettuna -20 °C:ssa edelleenkäsittelyyn asti.

2. Uutetun pelletin liuotus ja uudelleenlaskostus

2.1 Tässä tapauksessa uudelleenlaskostukseen/uudelleenhapetukseen käytetty käytetyt reagenssit ja menettelytapa ovat erilaisia kuin r31 kD polypeptidille käytetty. r20 kD tai r12 kD polypeptidin uutettu pelletti liuotetaan 6 M guanidiini·HCl:ään (GuCl) 50 mM ß-merkaptoetanolin läsnä ollessa, ja 10-kertaisen laimennuksen jälkeen, annetaan hapettua uudelleen ilmassa.

2.2 Menettelytapa:

Pakastettu r20 kD pelletti (1,5 g) liuotetaan ja homogenisoidaan 10 tilavuudessa 10 mM Tris·HCl, 5 mM EDTA (puskuri C), pH 8,0, joka sisälsi lisäksi 6 M guanidiini·HCl:ää. Näyte pelkistettiin lisäämällä 57 µl laimentamatonta ß-merkaptoetanolia (lopullinen konsentraatio: 50 mM) ja sekoitettiin 30 min ajan ilmalta suojattuna, ts. suljetussa astiassa. Sitten se tiputetaan nopeudella noin 5 ml/min 10 tilavuuteen (148 ml) puskuria C, pH 8,0 ja annetaan hapettua sekoittaen jatkuvasti ja varovasti avoimessa astiassa 48 - 72 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Vaihtoehtoisesti hapetus suoritettiin suljetussa astiassa 0,3 mM GSSG:n läsnä ollessa. Vaikka tässä vaiheessa oli jo tapahtunut jonkin verran polypeptidin saostumista, suspensiota, mukaan lukien sakkaa, dialysoitiin 24 tuntia 15 tilavuutta vastaan puskuria C, pH 8,5, vaihtaen puskurin kolmesti. Sitten dialysaatti alistettiin sentrifugoinnille 45 min ajan nopeudella 15 000 r/min (22 500 x g) siuurinopeuksisessa Beckman-sentrifugissa, joka oli varustettu JA-17-roottorilla. Tämä poistaa useita r20 kD:n tai r12 kD:n kontaminoivista proteiineista ja aggregaa-

teista, jotka ovat muodostuneet uudelleenhapetuksen aikana.

3. Puhdistus ja karakterisointi

Koska hepariininsitoutumiskohdan sijainti fibriininsitomisalueella ei ollut tunnettu, ei sen vuoksi voitu tietää etukäteen sitoutuisivatko uudet lyhyemmät r20 kD ja r12 kD polypeptidit hepariini-Sepharoseen. Olemme kuitenkin havainneet, että lyhyemmät molekyylit sitoutuivat itse asiassa hepariini-Sepharoseen.

Havaitsimme, ettei uudelleenhapetettujen r20 kD- tai r12 kD-polypeptidien puhdistamiseksi ollut tarvetta fenyyli-Sepharose-kolonnille, kuten r31 kD:n tapauksessa. Itse asiassa materiaali voitiin puhdistaa suoraan hepariini-Sepharosella, mutta saavutettiin huomattava parannus, kontaminanttien, väärin laskostuneiden molekyylien ja dimeerien poistamisen suhteen, kun näyte kromatografoitiin Q-Sepharose-kolonnilla ennen kromatografointia hepariini-Sepharose-kolonnilla. Joissain tapauksissa polypeptidi konsentroitiin Pellicon-järjestelmällä (Millipore Corp.) käyttäen membraaneja, joilla oli sopivat katkaisurajapisteet, ts. 10 kD r20 kD polypeptidille ja 3 kD r12 kD polypeptidille, ennen Q-Sepharose-kolonniin lisäämistä. Hepariini-Sepharose-kolonnia käytetään myös molempien polypeptidien konsentrointiin. Seuraava on esimerkki puhdistusmenettelystä, jota käytettiin r20 kD polypeptidin tapauksessa.

3.1. Q-Sepharose-kromatografia:

Kolmasosa uudelleenhapetetusta r20 kD:stä (47 ml) lisättiin 10-ml Q-Sepharose Fast Flow-kolonniin, joka oli tasapainotettu ennalta puskurissa C, pH 8,5 virtausnopeudella 1,2 ml/min. Läpivirtausfraktio kerättiin ja säästettiin (70 ml). Polypeptidit, jotka tarttuivat kolonniin, eluoitiin puskuri C:llä, pH 8,5, joka sisälsi 0,5 M NaCl, ja kolonni regeneroitiin 0,5 M NaOH:lla.

3.2 Hepariini-Sepharose-kromatografia:
Läpivirtaus Q-Sepharose-kolonnista lisättiin 10-ml hepariini-Sepharose-kolonniin, joka oli tasapainotettu ennalta puskurissa, pH 8,5, virtausnopeudella 0,5 ml/min. Läpivirtausfraktio sisälsi enimmäkseen kontaminoivia aineita ja väärin laskostunutta r20 kD-polypeptidiä. Puhdistettu (>95-% puhdas) r20 kD-polypeptidi eluoitiin puskurissa C, pH 8,5, joka sisälsi 0,5 M NaCl, ja kolonni regeneroitiin samassa puskurissa, joka sisälsi lisäksi 6 M guanidiini·HCl:ää. Esitetään edustavia puhdistustaulukoita polypeptideille r20 kD (Taulukko A) ja r12 kD (Taulukko B).

3.3 Karakterisointi
Sekä r20 kD- että r12 kD-polypeptidin bakteerikakun supernatanteista, samoin kuin seuraavien kolonnifraktioiden eristä määritettiin polypeptidi ja analysoitiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla; niiden eluutioprofiilit saatiin Superose 12-kolonnilla, joka oli kiinnitetty joko FPLC:hen tai HPLC:hen. Nämä profiilit uudelleenlaskostuksen eri vaiheissa, samoin kuin puhdistuksen, esitetän r20 kD:lle (kuvio 21) ja r12 kD:lle (kuvio 22). Puhdistetut r20 kD- tai r12 kD-polypeptidit eluoituvat ainoina terävinä vyöhykkeinä. Nämä profiilit vahvistavat tulokset, jotka nähtiin SDS-PAGE-geeleillä ei-pelkistävissä olosuhteissa; sekä 20 kD- että r12 kD-polypeptidien näytteiden vyöhykkeet ovat ei-hajanaisia ilmaisten yhden ainoan molekyylimuodon. r20 kD:n tapauksessa ei-pelkistetyn polypeptidin vyöhyke kulkee (kuten r31 kD-polypeptidin tapauksessa) nopeammin kuin pelkistyneen muodon; tämä on samanlainen vaikutus kuin r31 kD-polypeptidin tapauksessa nähty. Tällaista eroa ei kuitenkaan nähdä r12 kD-polypeptidin tapauksessa. Lisää yksityiskohtia FBD-polypeptidien karakterisoinnista esitetään esimerkissä 11.

Nämä FBD-polypeptidit ovat käytettävissä radioleimaukseen niiden käyttämiseksi radiofarmaseuttisissa aineissa veritulppien ja ateroskleroottisten vaurioiden kuvaukseen.

Edut pienempien FBD-polypeptidien (r20 kD ja r12 kD) käytöstä edellä mainittuihin taroituksiin vastakohtana suuremman r31 kD-polypeptidin käytölle on, että olemme huomattavan työn jälkeen kehittäneet yksinkertaisemman menetelmän pienempien molekyylien valmistamiseksi, ts. menetelmät, jotka kuvataan edellä r20 kD- ja r12 kD-polypeptidien uudelleenlaskostukseen ja puhdistukseen, ovat nopeampia ja helpompia kuin menetelmä r31 kD-polypeptidin uudelleenlaskostukseen ja puhdistukseen. Lisäksi nämä menetelmät antavat tulokseksi suuremman saannon kuin r31 kD-polypeptidin menetelmä, ja lyhyemmille FBD-polypeptidifragmenteille voidaan saavuttaa polypeptidin korkeampi konsentraatio (jopa 10 mg/ml).

Esimerkissä 10 kuvataan parannettu suoritusmuoto tästä menetelmästä FBD-polypeptidifragmenttien uudelleenlaskostamiseksi ja puhdistamiseksi.

Taulukko A: r20 kD FBD:n puhdistus

| Vaihe | Tilavuus (ml) | Proteiinikons. (mg/ml) | Kokonaisproteiini (mg) | Puhtaus[a] (%) | FBD:n määrä (mg) | Saanto (%) | Puhdistusaste |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Liuotettu ja pelkistetty pelletti | 14,8 | 12,4 | 183,5 | 35 | 64,2 | 100 | 1 |
| Hapetettu supernatantti | 148 | 0,72 | 106,5 | 45 | 48,0 | 74,7 | 1,3 |
| Hapetettu supernatantti (1/3) | 47 | | 33,8 | | 15,2 | | |
| Q-Sepharose läpivirtaus | 70 | 0,20 | 14,0 | 80 | 11,2 | 54,9 | 2,3 |
| Hepariini-Sepharose 0,5 M NaCl | 9 | 0,71 | 6,1 | 98 | 6,0 | 29,4 | 2,8 |

[a] Arvioitu joko SDS-PAGE-geeleista pelkistävissä olosuhteissa tai Sepharose 12-eluutioprofiileista.

Tämä on edustava puhdistustaulukko r20 kD polypeptidin uudelleenlaskostusta ja puhdistusta varten, käsiteltynä esimerkin 5 kappaleissa 2 ja 3 kuvatulla tavalla käsiteltynä.

1082298

Taulukko B: r12 kD FBD:n puhdistus

| Vaihe | Tilavuus (ml) | Proteiinikons. (mg/ml) | Kokonaisproteiini (mg) | Puhtaus[a] (%) | FBD:n määrä (mg) | Saanto (%) | Puhdistusaste |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Liuotettu ja pelkistetty pelletti | 100 | 6,66 | 666 | 10 | 66,6 | 100 | 1 |
| Hapetettu[b] supernatantti | 500 | 0,20 | 100 | 58 | 58,0 | 87,1 | 5,8 |
| Q-Sepharose läpivirtaus | 500 | 0,13 | 65 | 80 | 52 | 78,1 | 8,0 |
| Hepariini-Sepharose 0,5 M NaCl | 14 | 0,75 | 10,5 | 98 | 10,3 | 15,4 | 9,8 |

[a] Arvioitu joko SDS-PAGE-geeleista pelkistävissä olosuhteissa tai Sepharose 12-eluutioprofiileista.

[b] Konsentroitu Pellicon-järjestelmällä.

Tämä on edustava puhdistustaulukko r12 kD polypeptidin uudelleenlaskostusta ja puhdistusta varten, käsiteltynä esimerkin 5 kappaleissa 2 ja 3 kuvatulla tavalla käsiteltynä.

108298

Esimerkki 6

r31 kD, r20 kD ja r12 kD fibriininsitomisaluepolypeptidien biologinen aktiivisuus

r31 kD FBD:n biologinen aktiivisuus kuvattiin yhdessäsiirretyssä PCT-patenttijulkaisussa WO90/07577, s. 134 ja eteenpäin liittyen sen sitoutumiseen fibriinihyytymään in vivo ja in vitro, bakteereihin sitoutumiseen ja solunulkoiseen matriisiin sitoutumiseen. Tässä esimerkissä esitetään lisää r31 kD polypeptidiin liittyviä tuloksia, ja esitetään 20 kD- ja 12 kD FBD-polypeptidien biologinen aktiivisuus.

Tässä esimerkissä yhdistelmä-DNA-fibriininsitomisalueiden sitoutuminen fibriinihyytymiin mitattiin seuraavalla tavalla:

$^{125}$I-rFBD:n (r31 kD, r20 kD tai r12 kD) sitoutuminen ennalta muodostettuun fibriinihyytymään (2-vaiheinen reaktio II)

Vaihe 1

Fibriinihyytymän muodostuminen:

Tämä voidaan tehdä yhdellä kahdesta tavasta:

Joko

(a) inkuboimalla 37 °C:ssa 20 µl sitraattikäsiteltyä ihmisen kokoverta 5 mM $CaCl_2$:n kanssa, 1 yksikön/ml kanssa trombiinia ja PBS:n kanssa lopullisessa tilavuudessa 250 µl. Reaktio lopetetaan 45 min kuluttua sentrifugoimalla ja pesemällä pelletti (kahdesti) 1 ml:lla PBS:ää; tai

(b) inkuboimalla 37 °C:ssa 20 µl ei-sitraattikäsiteltyä ihmisen kokoverta ("naiivia" verta). Reaktio lopetetaan 150 min kuluttua sentrifugoimalla ja pesemällä kuten kohdassa (a).

Vaihe 2

$^{125}$I-FBD-polypeptidin sitoutuminen ennalta muodostettuun fibriinihyytymään

Hyytymiä inkuboidaan 37 °C:ssa lopullisessa tilavuudessa 250 µl PBS:ää $^{125}$I-rFBD-polypeptidin kanssa. Muut ainesosaset voidaan lisätä kullekin kokeelle ilmaistulla tavalla. Sitoutumisreaktio lopetetaan 45 min kuluttua sentrifugoimalla ja pesemällä kolmesti PBS:llä. Putkista, jotka sisälsivät $^{125}$I-rFBD-fibriinipelletin, mitattiin radioaktiivisuus gammalaskimessa.

Tulokset

A. $^{125}$I-leimatun r31kD FBD:n metabolinen stabiilisuus rotissa: ex-vivo-sitoutuminen fibriiniin versus TCA-ei-liukoisuus

Kuten kuvion 18 kuvauksessa kuvattiin, rotat injisoitiin laskimonsisäisesti r31 kD FBD:llä, joka oli leimattu $^{125}$I:llä, ja aikavälein oletut verinäytteet lisättiin Na-sitraattiin. Erät verta käsiteltiin seuraavalla tavalla: joko (a) käsiteltiin 20-% TCA:lla ja mitattiin TCA:han liukenematon radioaktiivisuus; tai (b) inkuboitiin ennalta muodostetun hyytymän kanssa (käyttäen 20 µl kokoverta kontrollirotasta); $^{125}$I-31 kD FBD:n sitoutuminen ennalta muodostettuun hyytymään mitattiin edellä kuvatun 2-vaiheisen reaktion II olosuhteissa.

Radioaktiivisuus mitattiin gammalaskurissa, ja kunkin näytteen aktiivisuus laskettiin %-osuutena reaktioseoksessa läsnä olevasta kokonaisradioaktiivisuudesta.

Kuviossa 18 esitetyt tulokset ilmaisevat hyvän korrelaation r31 kD:n fyysisen sammumisen (mitattuna TCA-ei-liukoisuuden alenemisella) ja funktionaalisen sammumisen (mitattuna r31 kD:n ennalta muodosatettuun verihyytymään ex-vivo-sitoutumisen alenemisena) välillä. Vertailevien tutkimusten alkuvaiheessa havaitaan kuitenkin eroja; 30 min kohdalla funktionaalinen sammuminen on useita kertoja suurempi kuin fysikaalinen sammuminen. Nämä tulokset, jotka viittaavat paljon nopeampaan funktionaalisen stabiilisuuden alenemiseen kuin fysikaaliseen hajoamiseen, voidaan selittää, koska pääasiallinen kohta FBD:n kovalenttiselle reaktiolle fibriinihyyty-

män kanssa on glutamiinitähde, joka sijaitsee FBD-molekyylin äärimmäisessä aminoterminaalisessa päässä aminohapon no. 3 kohdalla; tämä glutamiinitähde, joka sijaitsee 20 aminohapon jaksossa tyypin 1 homologiarakenteen ulkopuolella, ei ole suojattu hajoamiselta tertiäärisellä rakenteella, mikä on tyypillistä FBD-alueen loppuosalle.

B. r31 kD:n fibriiniin sitoutumisen spesifisyys: transglutaminaasin vaikutus

Plasman fibronektiinin fibriininsitomisalueen kovalenttinen sitoutuminen fibriiniin verihyytymässä johtuu pääasiassa fibronektiinin aminohapon no. 3 (glutamiini) reaktiosta fibriinin kanssa; tätä sitoutumisreaktiota kontrolloi entsymaattisesti transglutaminaasientsyymi, joka tunnistaa spesifisesti tämän glutamiinitähteen sisältävän aminohapposekvenssin.

Seuraava koe suoritettiin sen tutkimiseksi, onko transglutaminaasi osallisena r31 kD yhdistelmä-DNA-FBD:n sitoutumisessa hyytymiin. Kaikki tässä patenttihakemuksessa kuvatuissa kokeissa käytetystä eksogeenisestä transglutaminaasista on marsun maksan transglutaminaasia (Sigma).

Seuraavien molekyylien 0,3-$\mu$M liuoksen sitoutuminen ennalta muodostettuun fibriinihyytymään, joka oli peräisin 20 $\mu$l:sta ihmisen kokoverta, mitattiin transglutaminaasin läsnä ollessa ja puuttuessa käyttämällä edellä kuvattua 2-vaiheista reaktiota II: $^{14}$C-putreskiini/r31 kD FBD, $^{125}$I-r31 kD FBD ja $^{125}$I- naudan yhdistelmä-DNA-kasvuhormoni (kontrolli). $^{14}$C-putreskiini/r31 kD-proteiinikompleksi, jossa glutamiinitähde asemassa 3 on salvattu kovalenttisella reaktiolla $^{14}$C-putreskiinilla, valmistettiin seuraavalla tavalla:

Liuosta, joka sisälsi 3 $\mu$M r31 kD FBD, 10 mM $CaCl_2$, 0,015 yksikköä/ml transglutaminaasia ja 60 $\mu$M $^{14}$C-putreskiinia (spesifinen aktiivisuus 100 mc/mmol), inkuboitiin 37 °C:ssa 5 tuntia. 31 kD FBD:hen liittyneen $^{14}$C-putreskiinin määrä

mitattiin TCA-saostuksella tämän reaktioliuoksen erästä, ja se osoitti $^{14}$C-putreskiinin 2,8 - 3 $\mu$M liuoksen yhtäsuuren määrän menemisen r31 kD proteiiniin; tämä osoittaa, että yli 90 % glutamiinista FBD:n asemassa no. 3 reagoi kovalenttisesti $^{14}$C-putreskiinin kanssa. $^{14}$C-putreskiini-r31 kD-materiaalia varastoitiin 0 °C:ssa ja käytettiin muutaman päivän sisällä enempää käsittelemättä. r31 kD FBD ja kontrolli-yhdistelmä-naudan kasvuhormonianalogi-DNA (bGH), joka valmistettiin EPO-patenttijulkaisussa 131843 kuvatulla tavalla, leimattiin $^{125}$I:llä käyttämällä esimerkissä 3 kuvattua ICl-menetelmää.

Tulokset

Saatiin 2-vaiheisessa reaktiossa II transglutaminaasin läsnä ollessa ja puuttuessa sitoutunut radioaktiivisuuden määrä, ja laskettiin transglutaminaasin läsnä ollessa ja puuttuessa sitoutuneen radioaktiivisuuden suhde kullekin testatulle polypeptidille. Tämä suhde poikkeaa dramaattisesti kun koskematonta 31 kD FBD:tä verrataan putreskiini-FBD:hen ("salvattuun" FBD:hen) tai kontrolli-bGH:hen. Kahdessa viimeksi mainitussa tapauksess aktiivisuuden suhde on lähes 1, mikä osoittaa, ettei transglutaminaasi vaikuta sitoutumiseen, ja hyytymässä läsnä oleva kokonaisradioaktiivisuus on 10 - 15 % reaktiossa olevasta kokonaisradioaktiivuudesta). Koskemattoman 31 kD FBD:n tapauksessa suhde on dramaattisesti korkeampi kuin 1 (eri kokeissa suhde vaihteli välillä 1,8 - 7 veren ja transglutaminaasin laadusta ja tuoreudesta riippuen), ja hyytymässä läsnä oleva kokonaisradioaktiivsuus on 40 - 70 % reaktiossa olevasta kokonaisradioaktiivisuudesta), ts. transglutaminaasi lisäsi r31 kD-polypeptidin sitoutumista hyytymään suuresti.

Nämä tulokset osoittavat asemassa numero 3 olevan salpaamattoman glutamiinin suuren tehokkuuden r31 FBD-polypeptidin sitoutumiseen fibriinihyytymään transglutaminaasin läsnä ollessa.

Muut kokeet ovat osoittaneet, että transglutaminaasin lisääminen 2-vaiheiseen reaktioon II lisää r20 kD ja r12 kD polypeptidien sitoutumista hyytymään, verrattavissa r31 kD:llä havaittuun vaikutukseen.

C. r31 kD FBD/fibriini-kompleksin karakterisointi SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla

Jotta määritettäisiin r31 kD:n fibriinihyytymään sitoutumisella muodostuneen kompleksin koko suoritettiin seuraava kokeiden sarja. Hyytymät oli johdettu joko 20 µl:sta ihmisen kokoverta (A) tai 250 µl:sta ihmis-fibrinogeenin 0,8 µM liuosta (B). Joissain fibrinogeenikokeista putkiin lisättiin yhdessä fibrinogeenin kanssa hammaslääketieteelliset silmukat (dental coils) (esimerkissä 7 kuvatulla tavalla).

$^{125}$I-r31 FBD:n sitoutuminen fibriinihyytymään mitattiin käyttämällä edellä kuvattua 2-vaiheista reaktiota II, kun läsnä oli 0,15 µM $^{125}$-r31 kD FBD:tä ja 5 mM $CaCl_2$:ta. Reaktio päätettiin 3-kertaisella PBS-pesulla. Alla kuvattujen erilaisten käsittelyjen jälkeen pelletti sentrifugoitiin, ja 15-µl erät supernatanttia (ts., liukoista materiaalia) ajettiin elektroforeettisesti polyakryyliamidigeeleillä, jotka erottavat molekyylipainon >$10^6$ omaavan materiaalin molekyylipainoon >$10^5$ ja alhaisemman molekyylipainon omaavista materiaaleista. Tuotettiin autoradiogrammi, josta näkyvät seuraavat seikat: transglutaminaasin läsnä ollessa esiintyy r31 kD/-fibriini-kompleksin suurimolekyylipainoisia muotoja, jotka kestävät keittämistä voimakkaan ionisen detergentin SDS ja S-S-sidoksia pelkistävän ß-merkaptoetanolin läsnä ollessa.

Lisäksi kun keittämisreaktioon sisällytetään 4 M ureaa, niin hyvin suuren molekyylipainon omaavat muodot (>$10^6$) muuttuvat kvantitatiivisesti keskivertomolekyylipainoisiksi muodoiksi (>100 000), kuten odotetaan suurimolekyylipainoisten fibriinihyytymien hydrofobisesti sitoutuneilta aggregaateilta. Vapaan r31 kD polypeptidin määrä hyytymissä on normaalisti pieni; tämä on materiaali, joka vapautuu vain fosfaatti/suo-

la-puskurin kanssa keitettäessä. Keskivertomolekyylipainoisten muotojen kesto urealla tapahtuvaa lisäkäsittelyä kohtaan tukee kovalenttisen sidoksen läsnäoloa $^{125}$I-r31 kD:n ja fibriinin välissä.

D. Fibronektiinin ja hepariinin vaikutus $^{125}$I-r31 kD:n sitoutumiseen ennalta muodostettuihin fibriinihyytymiin

(i) Fibronektiinin (FN) vaikutus

Ihmisen plasma sisältää oleellisia tasoja FN:ää (300 µg/ml), joka voisi mahdollisesti kilpailla $^{125}$I-r31 kD-polypeptidin kanssa sitoutumisesta ennalta muodostettuihin hyytymiin. Tällainen kilpailu voi vaikuttaa hyytymän radioleimaukseen ja seuraavaan kuvausprosessiin. FN:n vaikutuksen tutkimiseksi $^{125}$I-r31 kD:tä (0,15 µM) lisättiin yhdessä puhdistetun FN:n (1 µM) kanssa ennalta muodostettuun hyytymään PBS:ssä. Vaikka FN:ää lisättiin molaarinen ylimäärä 7 suhteessa $^{125}$I-r31 kD:hen, viimeksi mainitun polypeptidin sitoutuminen häiriintyi vain hieman (20-% inhibitio). Havainto, ettei ylimääräinen FN kilpaile $^{125}$I-r31 kD:n kanssa, sitoutuminen voitaisiin selittää kahdella tavalla: kohtien lukumäärä ristiliittymistä varten hyytymän pinnalle on suurempi kuin sekä FN:n että $^{125}$I-FBD:n sijoittamiseen tarvitaan, tai FBD:n affiniteetti hyytymään on paljon suurempi kuin FN:n. Uskomme useisiin havaintoihin perustuen, että sekä ylimääräiset sitoutumiskohdat että $^{125}$I-r31 kD:n korkeampi affiniteetti mahdollistaa sen sitoutumisen hyytymään FN:n plasmakonsentraatioiden läsnä ollessa.

(ii) Hepariinin vaikutus

Jotkin radioskintigrafiset aineet kuten $^{111}$In-leimatut verihiutaleet ja leimattu fibrinogeeni ovat tehottomia terapeuttisen hepariinin läsnä ollessa. Sen vuoksi oli tärkeää analysoida hepariinin vaikutus $^{125}$I-r31 kD:n menemiseen hyytymiin. Tulokset osoittivat, ettei hepariinilla ollut merkittävää vaikutusta r31 kD FBD:n sitoutumiseen ennalta muodostettuihin hyytymiin. Muut kokeet osoittivat, että sama hepariinimäärä haittasi dramaattisesti r31 kD:n sitoutumista

fibriinihyytymään sen muodostumisen aikana, ts., reaktiossa I.

E. Vertailu erilaisten yhdistelmä-DNA-FBD-polypeptidien ja plasman FBD:n sitoutmisesta ennalta muodostettuihin hyytymiin

Jotta verrattaisiin erilaisten yhdistelmä-DNA-FBD-polypeptidien (r31 kD, r20 kD ja r12 kD) ja plasman 31 kD FBD:n ennalta muodostettuihin hyytymiseen sitoutumisen vertaamiseksi suoritettiin sarja kokeita käyttäen 2-vaiheista reaktiota II kuviossa 19 kuvatulla tavalla. Tulokset osoittavat, että plasman 31 kD sitoutuu samalla tasolla kuin r31 kD, kun taas r20 kD- ja r12 kD-polypeptidit sitoutuvat molemmat noin puolella suuremman (31 kD) molekyylin tasosta. r20 kD- ja r12 kD-polypeptidien sitoutumisen taso on edelleen riittävän korkea osoittamaan radioleimattujen r20 kD- ja r12 kD-polypeptidien mahdollisuuden radiofarmaseuttisina aineina veritulpan kuvaukseen. Samanlaiset kokeet r31 kD-DGRGDS-polypeptidiä käyttämällä (esimerkki 4, D ja kuvio 13) osoitti, että se sitoutuu suunnilleen samalla tasolla kuin r31 kD.

F. $^{125}$I-r12 kD:n sitoutuminen tuoreisiin tai pakastettuihin hyytymiin

Jotta tutkittaisiin hyytymien pakastamisen merkitystä ennen sitoutumiskokeissa FBD-polypeptidien kanssa käyttämistä suoritettiin seuraava koe. Fibriinihyytymiä käytettiin joko tuoreena tai -70 °C:ssa varastoinnin jälkeen 2-vaiheisessa reaktio II-sitoutumiskokeessa $^{125}$I-r12 FBD:n kanssa, joka valmistettiin esimerkissä 5 kuvatulla tavalla.

Koe suoritettiin kuvion 15 kuvauksessa kuvatulla tavalla transglutaminaasin läsnä ollessa tai puuttuessa. Kuviossa 20 osoitetaan, että pakastamisella on vähäinen jos lainkaan vaikutusta hyytymien kykyihin sitoa r12 kD FBD:tä. Normaalisti pakastetut hyytymät, joihin ei ole lisätty transglutaminaasiam, tuottavat samanlaiset sitomistulokset kuin tuoreet hyytymät transglutaminaasin läsnä ollessa; sitoutumis-

reaktioon ei ole vaikutusta, kun eksogeenistä transglutaminaasia lisätään pakastettuihin hyytymiin, johtuen luultavasti endogeenisen transglutaminaasin vapautumisesta pakastetuista punaisista verisoluista.

Kuten kappaleessa B yllä huomautettiin, reaktiossa II on laaja vastealue eksogeenisen transglutaminaasin lisäykselle.

G. Olosuhteet $^{125}$I-r31 kD FBD:n sitoutumiselle ennalta muodostettuihin hyytymiin

Olosuhteiden tutkimiseksi $^{125}$I-r31 kD:n sitoutumiselle ennalta muodostettuihin hyytymiin suoritettiin seuraava kokeiden sarja. $^{125}$I-r31 kD-polypeptidin sitoutuminen ennalta muodostetuihin hyytymiin sitraattikäsitellystä tai "naivista" verestä tutkittiin käyttäen 2-vaiheisen reaktion II menetelmää, ja erilaisten ainesosasten (kalsium, hirudiini, transglutaminaasi) läsnä ollessa tai puuttuessa. Tulosten malli "sitraattikäsiteltyä" verta tai "naiveja" vesihyytymiä käytettäessä on samanlainen, vaikka r31 kD-polypeptidin sitoutuminen on suurempaa sitraattikäsiteltyyn vereen.

Hirudiini (Sigma) on jokaisen trombiininvälitteisen reaktion spesifinen inhibiittori, ja sen vuoksi hirudiinia lisättiin jotta tutkittaisiin trombiinin vaikutusta sitoutumisreaktioon (vaihe 2). Hirudiinilla ei havaittu lainkaan vaikutusta, ja sen vuoksi trombiinilla ei ole vaikutusta r31 kD-polypeptidin hyytymään sitoutumiseen. Sama hirudiinimäärä estää kuitenkin sitoutumisen täysin, kun se lisätään vaiheessa 1, jossa fibrinogeenista muodostuu fibriiniä, kuten odotettiin.

Nämä rtulokset osoittavat myös, että eksogeeninen transglutaminaasi lisää r31 kD FBD:n sitoutumista hyytymiin ja lisäksi että tämä transglutaminaasireaktio riippuu kalsiumionien läsnäolosta. Koska käytetty eksogeeninen transglutaminaasi on kudostransglutaminaasia (aktiivisessa muodossaan), odotamme, että seerumin transglutaminaasi, tekijä XIII, jonka on läpikäytävä aktivoituminen trombiinilla teki-

jän XIIIa muodostaakseen, on hyvin herkkä hirudiini-inhibitiolle.

H. Olosuhteet $^{125}$I-r31 kD FBD:n sitoutumiselle solunulkoiseen matriisiin (ECM)

$^{125}$I-r31 kD:n sitoutuminen endoteelisolujen (ECM) solunulkoiseen solumatriisiin osoitettiin yhdessäsiirretyssä PCT-patenttijulkaisussa WO9007577, s. 144. Sitoutumista karakterisoitiin nyt edelleen tutkimalla 0,3 $\mu$M $^{125}$I-r31 kD FBD:n sitoutumista ECM:ään eksogeenisen transglutaminaasin läsnä ollessa ja puuttuessa; lisäksi sitoutumista transglutaminaasin läsnä ollessa tutkittiin kun läsnä oli kutakin hepariinia, fibronektiinia tai spermidiiniä.

Näiden kokeisden tulokset osoittavat, että r31 kD FBD:n sitoutuminen ECM:ään kasvaa transglutaminaasia lisättäessä. Hepariinilla ei ole merkittävää vaikutusta sitoutumiseen, kun taas spermidiini, tunnettu transglutaminaasi-inhibiittori, estää sitoutumisen. Myös kollageeni estää sitoutumisen, mikä viittaa kollageenin mahdolliseen osallistumiseen akseptorimolekyylinä endoteelisolujen matriisilla. Fibronektiinillä on vähän vaikutusta sitoutumisreaktioon.

Nämä tulokset antavat lisä'tukea radioleimattujen yhdistelmä-DNA-FBD-polypeptidien mahdolliselle käytölle radiofarmaseuttisina aineina alkavan täplän muodostumisen kuvaamiseen paljastetuissa verisuonissa.

Esimerkissä 9 kuvataan lisäkokeita, jotrka osoittavat fibronektiinin FBD:n erilaisten polypeptidifragmenttien biologisen aktiivisuuden.

Esimerkki 7

Yhdistelmä-DNA-$^{125}$I-31 kD FBD:n ja sen fragmenttien vastaanotto ruostumattomasta teräksestä olevalla silmukalla indusoiduilla laskimoveritulpilla rotissa

Ruostumattomasta teräksestä olevalla silmukalla indusoidun

laskimoveritulpan mallia rotissa käytettiin tutkittaessa leimattujen r31 kD, r20 kD ja r12 kD FBD-polypeptidien vastaanottoa. Käytetty malli on kuvattu julkaisuss: Maffrand et al.; Thrombosis and Haemostasis 59 (1988) 225-230.

Kokeen yksityiskohdat

A. $^{125}$I-31 kD:n vastaanoton tutkiminen ruostumattomasta teräksestä olevalla silmukalla indusoidulla laskimoveritulpalla

Wistar-peräisiä naaraspuolisia rottia (200 - 250 g) nukutettiin ketamiini·HCl:llä plus ksylatsiini·HCl:llä. Tehtiin keskilinjan vatsan aukaisu, ja paljastettiin alempi onttolaskimo. Ruostumattomasta teräksestä oleva lankasilmukka (hammaslääketieteellinen tahnankuljettaja, hienous no. 31, 21 mm pitkä) sijoitettiin laskimon onteloon kohtaan juuri liitoskohdan alapuolelle, ja aukko ommeltiin. Kukin yksittäinen sijoitettu laite punnittiin yksittäin, ja jokainen paino merkittiin muistiin. 3 tuntia leikkauksen jälkeen eläimet saivat i.v.-injektiona 1 ml 0,9 % NaI-liuosta kilpirauhasen jodivaraston kyllästämiseksi. 1 tunti myöhemmin rotat saivat i.v.-injektiona $^{125}$I-r31 kD FBD:tä (5 x 106 cpm; 100 µg/kg). r31 kD-polypeptidi leimattiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Ajankohtana 24 tuntia leimatun polypeptidin annon jälkeen verta otettiin sydämen lävistyksellä, ja rotat tapettiin. Silmukan sisältävä laskimosegmentti poistettiin huuhtoen kaiken jäännösveren huolellisesti pois. Yhdessä ryhmässä segmentit, joissa oli silmukka, punnittiin sellaisenaan ja otettiin radioaktiivisuuden mittaukseen ("Veritulppa in situ"-ryhmä). Toisessa ryhmässä laskimoleike avattiin pitkittäissuunnassa, ja silmukat, joissa oli veritulpat, poistettiin varovasti, punnittiin, ja radioaktiivisuus mitattiin. Veren radioaktiivisuustasot mitattiin ääreisverta käyttämällä.

Tulosten laskeminen:

Näissä kahdessa ryhmässä vähennettiin kunkin silmukan alkupaino sen lopullisesta painosta, ja spesifinen radioaktiivi-

suus kussakin tapaksessa laskettiin jakamalla cpm-arvo nettopainolla. Laskettiin myös aäreisverinäytteiden spesifinen aktiivisuus.

Tulokset:
Kohdalla 24 tuntia radioaktiivisuuden tasot veressä olivat noin 5 000 - 10 000 cpm/g, kun taas eristetyssä veritulpassa spesifinen radioaktiivisuus oli noin 300 000 cpm/g, ts. 30 - 60-kertaisesti suurempi (katso kuviota 16). Kun veritulpan sisältävän laskimon koko segmentti otettiin analyysiin, ja laskettiin nk. "spesifinen radioaktiivisuus"-arvo, tuloksesi saadut arvot olivat 4 - 5 kertaa korkeampia kuin veressä, ilmaisten täten, että verihyytymien gammakamerakuvauksessa in vivo voidaan saavuttaa hyvä signaali/kohina-suhde leimattua r31 kD FBD:tä käyttämällä.

Tässä mallissa tutkittiin hepariiniesikäsittelyn vaikutusta. Tämän tyyppinen koe on välttämätön, koska potilaita, jotka ovat mahdollisia ehdokkaita veritulppakuvaukselle, hoidetaan tavallisesti tällä veren hyytymistä estävällä aineella. Tämän kysymyksen tutkimiseksi ryhmä rottia käsiteltiin hepariinilla (500 yksikköä/rotta laskimonsisäisesti) 10 min ennen leimatun polypeptidin antoa. Tämä hepariinikäsittely ei vaikuttanut leiman vastaanottoon, mitattuna 24 tuntia myöhemmin.

Nämä tulokset osoittavat, että veritulppakuvaus FN:n FBD:tä käyttäen voidaan suorittaa hepariinin läsnä ollessa.

B. Yhdistelmä-DNA-12-kD, 20-kD ja 31-kD-FBD-polypeptidien vertailu ruostumattomasta teräksestä olevalla silmukalla indusoidun laskimoveritulpan mallissa
Nämä kolme yhdistelmä-DNA-polypeptidiä leimattiin $^{125}I$:llä esimerkissä 3 kuvatulla tavalla ja käytettiin edellä kuvatussa rottamallissa. Tulokset, jotka esitetään kuviossa 17, ilmaisevat että kukin näistä kolmesta molekyylistä sijaitsi spesifisesti hyytymissä verrattuna vereen, spesifisiä radio-

aktiivisuuksia vertaamalla; hyytymien spesifinen radioaktiivisuus vaikutti olevan suurempi pitemmillä molekyyleillä kuin lyhyemmillä polypeptideillä (143 000, 78 500 ja 63 000 cpm/g hyytymää r31 kD, r20 kD ja r12 kD-polypeptideille, vastaavasti), mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkittäviä. Spesifisen radioaktiivisuuden arvot verelle (24 tunnin kuluttua) olivat samalla lailla suhteessa molekyylin kokoon (7 040, 5 016 ja 3 300 cpm/g r31 kD, r20 kD ja r12 kD-polypeptideille, vastaavasti) ja voisi heijastaa näiden molekyylilajien veripuhdistumanopeuksien eroja. Siten hyytymä:veri-spesifisen radioaktiivisuuden laskelmat antoivat tulokseksi arvot, jotka olivat hyvin samanlaisia näille kolmelle eri polypeptidille, ja olivat noin 20. Nämä tulokset viittaavat siihen, että kaikki kolme FBD-lajia (tai muut FBD:n fragmentit) voisivat toimia veritulppakuvauksessa.

Esimerkki 8

Fibriininsitomisaluepolypeptidien leimaaminen ateroskleroottisten vaurioiden ja veritulppien kuvausta varten

Tässä patenttihakemuksessa kuvatut fibriininsitomisaluepolypeptidit (polypeptidit r31 kD, r20 kD ja r12 kD), tai muita FBD-polypeptidifragmentteja, voidaan leimata radioaktiivisesti radiomerkkiaineen kuljettamiseksi veritulppaan sen havaitsemisen sallimiseksi gammakamerakuvauksella. Tässä patenttihakemuksessa kuvataan esimerkissä 3 näiden kolmen polypeptidin leimaaminen jodi-125:llä ($^{125}I$), jolla on pitkä puoliintumisaika 60 päivää.

Toista radioaktiivista jodia on jodi-131 ($^{131}I$), jota voidaan käyttää FBD-polypeptidien leimaamiseen tunnetuilla menetelmillä kuten on kuvannut Uehara et al (1). Myös $^{131}I$:llä on kuitenkin suhteellisen pitkä puoliintumisaika 8 päivää.

Ihanteellisesti radiofarmaseuttinen aine ateroskleroottisten vaurioiden ja veritulppien kliiniseen kuvaukseen pitäisi tuottaa positiiviset tulokset ensimmäisten muutaman tunnin aikana injektion jälkeen (33). Tällaista testiä varten voi-

taisiin käyttää lyhytikäisempää radioleimausta. Viimeaikaiset tutkimukset ovat viitanneet siihen, että indium-111 ($^{111}$In) tai teknetium-99m ($^{99m}$Tc) voivat olla sopivampia radiomerkkiaineina, koska niillä on puoliintumisajat 67 tuntia ja 6 tuntia, vastaavasti (32); toinen lyhytikäinen alhaisen energian omaava leima on jodi-123 ($^{123}$I), jonka puoliintumisaika on 13,3 tuntia.

FBD-polypeptidien leimaaminen $^{99m}$Tc:llä voidaan suorittaa tunnettuja menetelmiä käyttäen (21, 33, 34, 35). $^{99m}$Tc on hyvin sopiva diagnostinen yksifotoninen radionuklidi johtuen lyhyestä puoliintumisajastaan, havaisemistasosta 140 KeV gammalaskurilla, pölymäisen säteilyn puuttumisesta ja huokeasta, helposta saatavuudesta. Nämä attribuutit sallivat annosten 30 mCi rutiininomaisen annon, jotka antavat tulokseksi korkeat fotonivuotasot, helpottaen vaurion havaitsemista tietokonekäyttöisellä yksifotonisen emission tomografialla (32, 35).

Muita radioleimoja, joita voidaan käyttää FBD-polypeptidien leimaamiseen, ovat mm. krypton-81m ($^{81m}$Kr) ja ksenon-133 ($^{133}$Xe), jolla on puoliintumisaika 5,3 päivää, kuten esitetään katsauksessa Knight (4). Toinen mahdollinen radioleima on gallium-67 ($^{67}$Ga), joka kuvataan julkaisussa Yamamoto (36); $^{67}$Ga:n puoliintumisaika on 78 tuntia.

Olemme leimanneet polypeptidit r31 kD, r20 kD, r18,5 kD ja r12 kD, ja plasman 31-kD fragmentin $^{111}$In:n avulla käyttämällä menetelmää, joka kuvataan ihmisen seerumin albumiinille julkaisussa: Hnatowich, D.J., Layne, W.W. ja Childs, R.L.; J. Appl. Radiat. Inst. 33 (1982) 327. Alustavat kokeet ovat osoittaneet, että leimatut FBD-polypeptidit sitoutuvat ennalta muodostettuihin veritulppiin in vitro, mitattuna 2-vaiheisella reaktiolla II (esimerkki 6) ja veritulppiin in vivo mitattuna esimerkissä 7 kuvatulla mallilla, ja antaen 24 tunnin kuluttua korkean veritulppa:vesi-suhteen alueella 80 - 200.

12-kD ja 18,5-kD proteiinien radioleimaus

Suoritettiin FBD:n 12-kD ja 18,5-kD polypeptidifragmenttien DTPA-modifiointi, oleellisesti julkaistujen menetelmien mukaisesti (Hnatowich, D.J. Layne, W.W. ja Childs, R.L. (1982) Int. J. Appl. Radiat-Isot. 33 327-332; Knight, L.C. Kollman, M, Maurer, A.H. ja Budzynski, A.Z (1987) Biochim, Biophys. Acta 924 45-53), käyttämällä DTPA:n syklistä anhydridiä. Erät kuivaa kloroformiliuosta, joka sisälsi lasketut määrät DTPA-ekvivalentteja, haihdutettiin ja saatettiin reagoimaan proteiinien kanssa joko fosfaatti- tai bikarbonaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (pH 7,4 ja 8,0 ± 0,2, vastaavasti). Ylimääräinen (hydrolysoitu) DTPA poistettiin perinpohjaisella dialyysillä. Leimaaminen suoritettiin väliainevapaalla $^{111}$In:llä, HCl-liuoksessa, joka oli säädetty natriumasetaatilla neutraaliin pH-arvoon noin 6. Yhdessä kokeessa (PBS:ssä) esimerkissä 5 kuvatulla tavalla tuotettu 12-kD polypeptidi leimattiin, ja tämä tuotti veritulppa:veri-suhteen (rottamallissa) 86 (katso olla), käytettiin DTPA:n laskettua molaarista ylimäärää - 12-kD proteiiniin verrattuna - suuruudeltaan 5 (12-kD proteiinissa on läsnä 5 lysyyli-$\epsilon$-aminoryjmää ja 1 $\alpha$-aminoryhmä). $^{111}$In:llä leimattaessa vapaan (sitoutumattoman) $^{111}$In:n arvioitiin olevan alle 15 % (TLC:n mukaan).

Toisessa kokeiden sarjassa (BBS:ssä), käytettiin 1:1-suhdetta DTPA-anhydridin ja joko 12-kD- tai 18,5-kD-proteiinin välillä.

12-kD:n molekyyliä kohden lisättyjen DTPA-tähteiden lukumäärän arvioimiseksi DTPA-modifioitu proteiini (ennen ylimääräisen DTPA:n erottamista) leimattiin $^{111}$In:llä (Knight et al., katso edellä). Lisättyjen DTPA-tähteiden lukumäärän havaittiin olevan 0,12 12-kD:n molekyyliä kohden. DTPA-leimatuilla 12- ja 18,5-kD proteiineilla oli identtiset Superose 12 (geelisuodatus)-eluutioprofiilit kontrollimodifioimattoman proteiinina (retentioajat 19,17 min ja 18,29 min, vastaavasti, kontrolliarvot esitetään taulukossa E). $^{111}$In:-

llä leimaamisen jälkeen, ylimääräisen DTPA:n erottamisen jälkeen vapaan (sitoutumattoman) $^{111}$In:n havaittiin olevan 28 ja 29 % 12- ja 18,5-kD proteiineille, vastaavasti, mikä antoi tulokseksi veritulppa:veri-suhteet (rottamallissa) 27 ja 25, vastaavasti.

NMRI-, ultraääni- ja röntgenkuvaus metallikelaateilla kuvataan US-patenttijulkaisussa 4647447. Lisäksi mainitaan vasta-aineen liittäminen metallikelaattien kanssa palstalla 7, rivi 42. On myös kuvattu monoklonaalinen vasta-aineet, jotka on leimattu polymeerisillä paramagneettisilla kelaateilla, ja niiden käyttö NMRI-menetelmissä [Shreve, P. et al., Magnetic Resonance in Medicine 3: 336-340 (1986); ja Brady, T. et al. in Proceedings of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, Second Annual Meeting, Soc. of Magnetic Resonance in Medicine, Inc., San Francisco, s. 10, 1983 viitejulkaisu Koutcher, J. et al., J. Nucl. Med. 25: 506-513 (1984)].

Esimerkki 9

Muita kokeita, jotka osoittavat erilaisten FBD-polypeptidien biologisen aktiivisuuden

FBD-polypeptidien r31 kD, r20 kD, r12 kD biologinen aktiivisuus on kuvattu esimerkissä 6. Tässä esimerkissä esitetään muita tuloksia, jotka havaittiin käyttämällä FBD-polypeptidifragmentteja; näitä ovat 12-kD, joka on saatu esimerkeissä 4 ja 5 kuvatulla tavalla, ja 18,5-kD, joka on konstruoitu, hapetettu/uudelleenlaskostettu ja puhdistettu esimerkeissä 4 ja 10 kuvatulla tavalla.

I. Fibriinihyytymään sitoutuminen

Hyytymän muodostaminen ja FBD:n sitominen suoritettiin tavalla, joka kuvataan alla modisioidussa versiossa esimerkissä 6 kuvatusta 2-vaiheisesta reaktiosta II. Jotta vältettäisiin aggregoitumistuotteet ja FBD-polypeptidien saostuminen, lopullinen sentrifugointivaihe jätetään pois, ja hyytymä siirretään uuteen putkeen ja pestään sitten perinpohjin.

a. "Ennalta muodostetun hyytymän" hyydyttäminen

Reaktioseokset (300 µl), jotka valmistettiin gammalaskurin silikonisoituihin muovipulloihin (7-ml), sisältäen 150 µl seosta I [0,2 x Tyrode'n puskuri ("1 X Tyrode'n puskuri": 1 mM Hepes pH 7,35; dekstroosia 0,2 %; 27 mM NaCl; 0,76 mM $NaH_2PO_4$; 0,54 mM KCl; 0,2 mM $MgCl_2$), 3 U/ml trombiinia (Sigma), 0,6 % BSA (Sigma), 15 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl, 20 mM $NaHCO_3$, pH 8,0] ja 150 µl tuoretta sitraattikäsiteltyä ihmisen kokoverta.

Työohje: Inkubointi 37 °C:ssa 3 tunnin ajan. Seerumi poistetaan tyhjössä, ja putket, jotka sisältävät fibriinihyytymänm, pidetään pakastettuna -70 °C:ssa. Ennalta muodostettuja hyytymiä voidaan käyttää useiden kuukausien ajan.

b. FBD:n sitominen "ennalta muodostettuun hyytymään"

Pulloihin, jotka sisälsivät "ennalta muodostettuja hyytymiä" (sulatettu huoneenlämpötilassa), lisää 300 µl 150 mM NaCl, 20 mM $NaHCO_3$, pH 8,0, joka sisältää: 1 x Tyrode'n puskuria; 0,6 % BSA; 5 mM $CaCl_2$ ja 0,15 µM $^{125}$I-FBD. Sitomisreaktio suoritetaan (0,03 % natriumjodiasetaatin puuttuessa tai läsnä ollessa voidaan lisätä tähän seokseen endogeenisen transglutaminaasin, tekijän XIIIa aktiivisuuden estämiseksi) 37 °C:ssa 18 tunnin ajan. Sitten hyytymä siirretään silikonisoituun pulloon, pestään kolmesti 1 ml:lla "pesupuskuria" 20 mM $NaHCO_3$, 1 % BSA, 1 mM PMSF, 2 mM EDTA), ja lasketaan gammalaskurissa.

Kuviossa 30 esitetään tulokset, joissa plasman ja yhdistelmä-DNA 31 kD:tä verrataan yhdistelmä-DNA 18,5 kD, 12 kD, 45 kD (12 kD FBD fuusioituna 33-kD CBD:hen, tuotettu kuviossa 12 esitetyllä tavalla) ja 33-kD CBD:hen. Kaikki FBD-polypeptidifragmentit sitoutuivat hyvin samanlaisessa asteessa, kun taas CBD-polypeptidi sitoutui vain hyvin alhaisessa asteessa. Transglutaminaasi(tekijä XIII)-inhibiittori jodiasetaatin lisäyksen aiheuttama 50 - 75-% inhibitio osoittaa, että transglutaminaasi on aktiivinen sitoutumisreaktiossa. Sen

vaikutuksen puute 33-kD CBD:n hyytymään sitoutumiseen osoittaa, että CBD:n hyytymään sitoutumista välittää erilainen, mahdollisesti ei-spesifinen mekanismi. Kuten aikaisemmin on osoitettu yhdessäsiirretyssä PCT-patenttijulkaisussa WO90/07577 (s. 138, rivit 1-24), FBD on kovalenttisesti sitoutunut fibriinihyytymään. Transglutaminaasin osallistuminen osoitetulla tavalla ja $^{125}$I-FBD/fibriini-kompleksin biokemiallinen karakterisointi osoittaa, että ainakin 70 % FBD-polypeptidistä on fibriiniin kovalenttisesti liittynyttä.

II. Sitoutuminen vesisuonikomponentteihin

Spesifisen fibriiniin sitoutumisen lisäksi FBD-polypeptideillä nähdään myös määrätyssä määrin ei-spesifistä sitoutumista muihin verisuonen komponentteihin, joiden kanssa ne joutuvat kontaktiin. Esimerkkejä verisuonikomponenteista ovat endoteelisolut (EC), solunulkoinen matriisi (ECM), ja jopa itse fibronektiini (FN). Tämä ei-spesifinen sitoutuminen on yksi tekijöistä, jotka määräävät taustatason diagnostista kuvausmenettelyjä suoritettaessa. Mitä vähäisempi ei-spesifinen sitoutuminen on, sitä tehokkaampi kuvaus on ja sitä vähemmän radioaktiivista reagenssia tarvitsee yhteensä lisätä potilaaseen. Sen vuoksi suoritettiin kokeita 12-kD FBD-fragmentin ja 31-kD FBD-polypeptidin verisuonikomponentteihin ei-spesifisesti sitoutumisen vertaamiseksi.

1-ml erät 0,3 $\mu$M $^{125}$I-12-kD:tä tai $^{125}$I-31-kD:tä (5 x $10^5$ cpm/$\mu$g ja 7,5 x $10^5$ cpm/$\mu$g PBS:ssä, joka sisälsi 0,1 % BSA:-ta, vastaavasti), lisättiin rinnakkaismäärityksin 35-mm petrimaljoihin (Falcon), jotka sisälsivät: yhteenkasvaneita (confluent) endoteelisoluja ("EC"), solunulkoista matriisia ("ECM"), (Eldor et al., Blood 65:1477 (1985)) tai immobilisoitua ihmis-fibronektiiniä ("FN"), (1 ml PBS:ää levyä kohden sisälsi 50 $\mu$g/ml FN, inkuboitu 4 °C:ssa yön yli ja sitten inkuboitu 2 tuntia huoneenlämpötilassa 1 ml:n kanssa PBS:ää, joka sisälsi 1 % BSA:ta salpaamiseksi). Kun ilmaistaan "+TG", levyt sisälsivät myäs transglutaminaasia tasolla 0,02 U/ml (Sigma). Testilevyjä inkuboitiin 60 min ajan 37

°C:ssa $CO_2$-inkubaattorissa, pestiin kolmesti 1 ml:lla "pesuliuosta" (PBS, joka sisälsi 2 mM PMSF ja 2 mM (EDTA). Sitten sitoutunut radioaktiivisuus uutettiin inkuboimalla 60 min ajan "uuttoliuoksen" kanssa (pesuliuosta, joka sisälsi 1 % deoksikolaattia, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2 mM NME ja 2 mM jodietikkahappoa). Sitten liuos siirretään putkiin ja radioaktiivisuus mitataan gammalaskurissa.

Kuviossa 28 yhteenvetona esitetyt tulokset osoittavat, että 12-kD FBD-polypeptidi sitoutuu vain heikosti vesisuonikomponenteihin endoteelisolut, solunulkoinen matriisi ja fibronektiini 31-kD FBD-polypeptidin sitoutumiseen verrattuna.

III. Bakteriaalinen sitoutuminen

Fibronektiinin osallistuminen tarttumiseen haavoihin, ja gram-positiivisten bakteerien laajan joukon invaasio haavoille on hyvin osoitettu (18). Autenttisen, plasmasta peräisin olevan FN:n fibriininsitomisalueen on osoitettu olevan suurella affiniteetilla vuorovaikutuksessa bakteerien pinnan spesifisten reseptorien kanssa. Kohdissa, joissa Staphylococcus aureus tyypillisesti alkaa infektion, on runsaasti FN:ää, esimerkiksi verihyytymissä ja subendoteelissä. Lisäksi eksogeeninen FN lisää bakteerien tarttumista näihin kohtiin. FN sitoutuu S. aureus'iin kyllästettävien, spesifisten pintaproteiinireseptorien kautta. Scatchard-analyysi on paljastanut suuren affiniteetin reseptorit, joilla on sitoutumisvakio 5 x $10^{-9}$ M, ja 100 - 20 000 reseptoria/bakteeri (19). FN-reseptorien ekspressio korreloi kliinisten isolaattien invasiivisuuden ja patogeenisyyden kanssa. FN-reseptorien poistaminen S. aureus'ista mekaanisesti, tai kasvattamalla bakteereita antibioottien läsnä ollessa alentaa niiden kykyä tarttua FN:ään. Koska FN on kahdenarvoinen molekyyli, joka sisältää monia funktionaalisia alueita, joilla on bakteriaalisen sitomisen lisäksi solunsitomis- ja kollageeninsitomisaktiivisuuksia, se voi ankkuroida bakteerit haavaan solunulkoisen matriisin erilaisten komponenttien kautta, samoin kuin FN-reseptorin

kautta kudossoluissa.

Toinen lähestymistapa FN:n ja S. aureus'in välisen vuorovaikutuksen ymmärtämiseksi on estää S. aureus'in sitoutuminen endoteelisoluihin FBD-polypeptidifragmenteilla.

31-kD FBD-polypeptidin sitoutuminen S. aureus'iin on kuvattu aikaisemmin (yhdessä siirretty PCT-patenttijulkaisu WO9007577, s. 146-153). Samanlaiset kokeet kuvaavat alla osoittivat että vastakohtana 31-kD FBD-polypeptidille 12-kD ja 18,5-kD FBD-polypeptidifragmentit eivät sitoneet S. aureus'ta, eivätkä inhiboineet S. aureus'ta sitomiskokeissa. 20-kD polypeptidi inhiboi kuitenkin S. aureus'in sitoutumisen (katso kuviota 8); tämä voi johtua (ei-autenttisten) C-terminaalistenlisäaminohappojen lisäämisestä (katso esimerkkiä 2), mikä voi vaikuttaa sen aktiivisuuteen suoraan tai epäsuorasti jonkin spesifisen uudelleenlaskostuksen kautta.

Seuraavat kappaleet estetään 31-kD FBD-polypeptidin vertaamiseksi muiden FBD-polypeptidifragmenttien kanssa sekä suoran S. aureus'iin sitoutumisen suhteen, että S. aureus'in endoteelisoluihin sitoutumisen eston suhteen.

Materiaalit ja menetelmät

A. Leimatun FN:n tai FBD:n sitoutuminen bakteereihin

1. Suora sitoutuminen liuoksessa

Erilaisia konsentraatioita $^{125}$I-r31 kD FBD:tä tai $^{125}$I-FN:ää lisättiin 5 x $10^8$ S. aureus-bakteeriin PBS-liuoksessa, joka sisälsi lisäksi 0,1 % Tween ja 1 % BSA. Lopulline tilavuus oli 1 ml. Kokonaisradioaktiivisuus reaktiossa määritettiin käyttämällä 20-µl erää, joka otettiin välittömästi bakteereiden lisäämisen jälkeen.

Seosta inkuboitiin 2 tuntia 20 °C:ssa keinuttaen.

Sitoutumisen määrä määritettiin poistamalla 100 µl inkubointiseosta ja lisäämällä 0,5 ml PBS:n päälle, joka oli lasket-

tu 3 ml:n päälle 10 % Percoll-0,15 M NaCl 5-ml silikonisoidussa putkessa. Sitten tätä sentrifugoitiin nopeudella 1 350 x g (4 000 r/min SW-kauharoottorissa (bucket rotor)) 15 min ajan 20 °C:ssa. Supernatantti inettiin pois, ja pelletistä määritettiin radioaktiivisuus.

2. Kilpailu leimaamattoman FN:n, FBD:n ja liittyvien molekyylien kanssa

Noudatettu menettelytapa oli identtinen yllä olevan menettelytravan kanssa paitsi, että käytettiin 3 µg/ml $^{125}$I-p31 kD:tä, ja kilpailevan molekyylin (FN tai FBD) spesifinen määrä lisättiin myös alkusitoutumisseokseen.

3. Radioaktiivisesti leimattujen bakteerien sitoutuminen immobilisoituun FN:ään

Muovipulloka päällystettiin 0,3 ml:lla 50 µg/ml FN:ää, tai 1 %:lla BSA:ta.

Putkia inkuboitiin ravistaen 4 °C:ssa yön yli. Sitten putket pestiin kolmesti 5 ml:lla PBS:ää. Sitten lisättiin 0,3 ml 1-% BSA:ta PBS:ssä, ja putkia inkuboitiin edelleen ravistellen 2 - 3 tuntia 20 °C:ssa (vapaiden kohtien salpaamiseksi).

Epäsuorissa sitoutumiskokeissa bakteereita esi-inkuboitiin inhibiittorin kanssa 4 °C:ssa 2 tunnin ajan.

Bakteereita (4 x $10^6$ pfu/ml, 3 pfu/cpm) lisättiin pulloihin kuvien selityksissä ilmaistut konsentraatiot. Määritysseoksen lopullinen tilavuus oli 0,3 ml PBS. Seosta sekoitettiin hitaasti 4 °C:ssa 90 - 120 min ajan.

Sitten putket dekantoitiin ja pestiin kolmesti 5 ml:lla PBS:ää.

Lisättiin 5 ml tuikelaskurinestettä kun määritettiin 3H-leimattujen bakteerien sitoutumista.

B. S. aureus'in endoteelisoluihin sitoutumisen estäminen FBD-fragmenteilla

I. S. aureus'in jodaus

S. aureus SA113:a (ATCC tulonumero 35556) kasvatettiin tryptisessä soijaliemessä (Difco Laboratories, USA) 37 °C:ssa käyttäen 1-l fermentorikasvatusta. Bakteereja kerättiina logaritmisen faasin puolivälissä, kun optinen tiheys saavutti 2,30 OD (660 nm:llä). Bakteeripelletti suspendoitiin uudelleen 500 ml:aan PBS:ää, joka sisälsi 5 mM PMSF:ää, ja pestiin kolmesti. Sitten solut suspendoitiin 100 ml:aan PBS:ää, jossa oli 1 mM PMSF ja 5 mM NEM (N-etyylimaleimidi, Sigma E-3876), lämpöinaktivoitiin 88 °C:ssa 20 min ajan kiinnittämistä varten, jäähdytettiin jäävedessä, ja varastoitiin sitten pienissä erissä -20 °C:ssa. Ennen käyttöä bakteerikonsentraatio säädettiin tasolle 5 x $10^9$ PFU/ml. 100 µCi erä Bolton-Hunter-reagenssiä (Amersham) proteiinin jodausta varten haihdutettiin lasiputkessa jäässä. Haihdutettuun reagenssiin lisättiin bakteerisuspensiota (1 ml), ja sekoitettiin varovasti jäässä 10 min ajan. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 1 ml 0,2M glysiiniä 50 mM kaliumfosfaattipuskurissa pH 8,5. Sitten reaktioseos suspendoitiin 20 ml:aan PBS:ää, joka sisälsi 1 mM PMSF:ää. Kun oli sentrifugoitu nopeudella 3 000 r/min 10 ajan 5 °C:ssa, pesuvaihe toistettiin kahdesti. Lopullinen pelletti suspendoitiin 2,2 ml:aan PBS:ää, joka sisälsi 1 mM PMSF:ää, ja varastoitiin -20 °C:ssa. Spesifinen aktiivisuus oli yleensä 20 - 100 PFU/cpm.

II. Endoteelisolujen kasvatus

Naudan aortan endoteelisoluja $A_5P_7$ (saatu A. Eldorilta, Hadassa Hospital, Jerusalem) pidettiin kudosviljelmässä aikaisemmin kuvatulla tavalla (Ogawa S.K. et al 1985 Infect. Immunol. 50: 218-224). Kasvatusväliaine sisälsi DMEM/+1 % D-glukoosia ja 10 % FCS (molemmat yhtiöstä Biological Industries, Kibbutz Beth-Haemek, Israel), jota oli täydennetty L-glutamiinilla ja gentamysiinillä (7 mM ja 5 mg/ml, vastaavasti, molemmat yhtiöstä Sigma Chemicals).

Soluja pidettiin 37 °C:ssa ja 5,5 % $CO_2$:ssa 150-ml kudosviljelypulloissa (Falcon).

Valmistettiin yhteenkasvaneita 1-solukerroksia sitoutumiskokeita varten joko 24-kaivoisilla kudosviljelylevyillä tai 35-mm kudosviljelylevyillä (Corning Glassware, Corning N.Y.). Kaivoja ja levyjä esi-inkuboitiin 30 min ajan 0,5 ml:n tai 1 ml:n kanssa täydellistä väliainetta, vastaavasti, ennen solususpension lisäämistä. Tyypillisessä kokeessa kaivot ja levyt siirrostettiin 5 x $10^4$ ja $10^5$ solulla, vastaavasti, ja käytettiin 3 - 4 päivän jälkeen kun viljelmä oli kasvanut yhteen.

III. $^{125}$I-S. aureus'in sitoutuminen endoteelisoluihin

Tämä menettelytapa on oleellisesti edellä mainitussa viitteessä kuvattu (Ogawa et al. 1985). Erä leimattua S. aureus'ia, joka on valmistettu edellä kuvatulla tavalla, laimennettiin PBS:llä tasolle $10^8$/ml. 3,5 µl leimattuja bakteereita lisättiin seokseen, joka sisälsi 200 µl DMEM +10 % FCS, 33 µl 150 mM NaCl sisältäen 20 mM $NaHCO_3$, 17 µl PBS:ää tai testattavaa kilpailijaa, ja inkuboitiin sitten 2 tuntia varovasti sekoittaen. Sitten bakteerit lisättiin edellä kuvatulla tavalla esikasvatettujen endoteelisolujen yhteenkasvaneille 1-kerroksille. Endoteelisolut pestiin suolaliuoksella välittömästi ennen määrityksen suorittamista. Seosta inkuboitiin 4 °C:ssa 1 tunti varovasti sekoittaen tai 2 tuntia 37 °C:ssa 5 % $CO_2$:ssa sekoittamatta. Sitoutumattonat leimatut bakteerit poistettiin pesemällä kolmesti kylmällä PBS:llä, joka sisälsi 2 mM PMSF ja 2 mM EDTA. Sitten sitoutuneet leimatut bakteerit uutettiin ravistaen huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan PBS:ssä, joka sisälsi 1 % deoksikolaattia, 20 mM Tris HCl pH 8,3, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2 mM NEM, ja 2 mM jodietikkahappoa. Uuttaminen toistettiin kerran, ja yhdistetty uute laskettiin gammalaskurissa.

Tulokset

A. Bakteereiden sitoutuminen $^{125}$I-FN:ään tai FBD:hen liuoksessa

1. Suora sitoutuminen

Suoritettiin kokeita jotta määritettäisiin $^{125}$I-FN:n tai $^{125}$I-rFBD:n sitoutuminen S. aureus-bakteereihin suspensiossa. Erilaisia määriä radioaktiivista FN:ää tai r31 kD-tä lisättiin 5 x $10^8$ bakteeriin, joita inkuboitiin 2 tuntia, ja sentrifugoitiin sitten 10-% Percoll/suolaliuoksen päällä. Tarkkailtiin pelletin radioaktiivisuutta.

Tulokset osoittivat $^{125}$I-rFBD:n (r31 kD) sitoutumisen kasvun bakteereihin suspensiossa verrattuna $^{125}$I-FN:n sitoutumiseen.

Tämä $^{125}$I-rFBD:nlisääntynyt sitoutuminen S. aureus'iin verrattuna $^{125}$I-FN:n sitoutumiseen S. aureus'iin voi johtua yhdenarvoisen alueen suuremmasta affiniteerista verrattuna koskemattomasta plasmasta peräisin olevan FN:n kahdenarvoiseen multialueeseen.

Samanlaisissa kokeissa, jotka suoritettiin 12-kD ja 18,5-kD FBD-fragmenteilla, ei havaittu minkäänlaista sitoutumista.

2. Kilpailu "natiivin" leimaamattoman FN:n, FBD:n ja liittyvien molekyylien kanssa

Kiinteää määrää $^{125}$I-p31 kD:tä (3 $\mu$g/ml) inkuoitiin 5 x $10^8$ bakteerin kanssa erilaisten FBD-molekyylien kasvavien määrien läsnä ollessa kilpailijoina.

Tulokset osoittavat, että "natiivi" FN, samoin kuin oikein laskostuneet p31 kD tai r31 kD FBD esivät $^{125}$I-p31 kD:n sitoutumisen S. aureus'iin samalla lailla, osoittaen, että yhdistelmä-DNA 31 kD on yhtä aktiivista kuin luonnolliset plasmaperäiset molekyylit. Yhdistelmä-DNA:n tai plasmaperäisen FBD:n pelkistetyt ("scrambled") muodot estivät kuitenkin vain minimaalisesti $^{125}$I-FBD:n sitoutumista bakteereihin, ilmaisten, että oikea laskostuminen on sitoutumiselle vältämätöntä. Lisäksi r18,5 kD ja r12 kD FBD-polypeptidit sa-

moin kuin CBD-polypeptide (FN:n 33-kD solunsitomisalue) ei kilpaillut $^{125}$I-pFBD:n kanssa S. aureus'iin, osoittaen, osoittaen johtopäätöksenä, että vain täydellisellä 31-kD FBD-alueella on bakteriaalista sitomisaktiivisuutta, kun taas lyhyemmät FBD-fragmentit eivät sido bakteereita.

B. Leimatun S. aureus'in sitoutuminen immobilisoituun FN:ään

Jotta arvioitaisiin rFBD:n (r31 kD) kykyä puuttua bakteerien tarttumiseen solunulkoiseen matriisiin haavoissa kehitettiin kilpailumääritys. Tässä määrityksessä mitattiin S. aureus'in tarttuminen muovipinnalle, joka on päällystetty FN:llä, ja FBD:n puuttumista sitoutumiseen.

Tulokset osoittavat, että S. aureus'in tarttuminen FN-päällystettyihin muovipulloihin estyi kun S. aureus'ta oli esiinkuboitu FN:n, pFBD:n (31 kD) tai rFBD:n (31 kD) kanssa. Eston laajuus näillä molekyyleillä oli samanlainen. Ei-sukulais-proteiini, BSA, jossa ei ollut S. aureus-sitomiskohtia, ei aiheuttanut lainkaan radioaktiivisesti leimatun S. aureus'in FN-päällystetyille muovipulloille tarttumisen estoa.

Samanlaisissa kokeissa, jotka suoritettiin 12-kD FBD-fragmenteilla, ei havaittu S. aureus'in immobilisoidulle FN:lle sitoutumisen estoa.

C. S. aureus'in endoteelisoluihin sitoutumisen esto

Kuviossa 29 esitetään S. aureus'in endoteelisoluihin kiinnittymisen esto FBD-fragmenteilla edellä kuvatulla tavalla. 31-kD:llä nähdään dramaattinen ja annoksesta riippuva vaikutus S. aureus'in sitoutumiseen endoteelisoluihin. 18,5-kD:llä eikä 12-kD:llä ei kuitenkaan ollut lainkaan inhiboivaa vaikutusta, osoittaen, ettei FBD:n sitoutumiskohta S. aureus-reseptorille ei esiinny 12-kD ja 18,5-kD fragmenteissa. Tämä on hämmästyttävä tulos, koska tämä on ensimmäinen osoitus siitä, että fibronektiinin FBD:n bakteriaalinen sitomisalue voidaan erottaa S. aureus-sitomisalueesta.

Yhteenveto ja johtopäätös

Taulukossa C esitetään yhteenvetona ja vertaillaan erilaisten edellä kuvattujen FBD-polypeptidifragmenttien aktiivisuuksia.

Taulukko C: Erilaisten FBD-polypeptidifragmenttien aktiivisuuksien ja sitoutumisspesifisyyden vertailu

| **Aktiivisuus** | **31-kD** | **18,5-kD** | **12-kD** |
|---|---|---|---|
| Fibriininsitominen | Suuri | Suuri | Suuri |
| Sitoutuminen verisuonen komponentteihin | Suuri | Alhainen | Alhainen |
| Bakteriaalinen sitoutuminen | Kyllä | Ei | Ei |
| S. aureus'in sitoutumisen esto endoteelisoluihin | Kyllä | Ei | Ei |

Täten nähdään, että 18,5-kD ja 12-kD FBD-polypeptidifragmenteilla on suuri kovalenttisen sitoutumisen spesifisyys fibriinille, yhdessä kapeammalla aktiivisuuksien kirjolla ja alhaisemmalla spesifisyydellä muille ligandeille kuten verisuonten komponenteille ja baktereille, kuin 31-kD. Tämä on veritulpankuvausaineelle edullinen ominaispiirre, joka varmistaa, että diagnostisella reagenssilla on suuri affiniteetti fibriiniä sisältäville veritulpille, säilyttäen samalla alhaiset taustatasot. Esimerkissä 13 esitetään tästä in vivo-esimerkki.

Esimerkki 10

Parannettu menetelmä lyhyempien FBD-polypeptidien fragmenttien uudelleenlaskostukseen/hapetukseen ja puhdistukseen

Yhdistelmä-DNA FBD-proteiinit r31 kD ("5 sormea"), 18,5 kD (autenttisempi versio "3 sormesta" kuin aikaisemmin kuvattu 20-kD) ja r12 kD ("2 sormea") ekspressöidään E. colissa ja uudelleenlaskostetaan/uudelleenhapetetaan, ennen niiden puhdistusta homogeeniseksi (puhtaus >98 %). Täydelle 31-kD

FBD-polypeptidille (5-sorminen) ja lyhyemmille 12-kD ja 18,5-kD FBD-polypeptidifragmenteille (2- ja 3-sormiset) käytetyt uudelleenlaskostus/uudelleenhapetus-menetelmät ovat erilaiset, ja ne on kuvattu edellä esimerkeissä 2 ja 5. Esimerkin 5 menetelmän on keksitty olevan sovellettavissa kaikille 2- ja 3-sormisille FBD-proteiineille, jotka on tähän mennessä uudelleenlaskostettu, mutta ei 5-sormiselle proteiinille 31-kD, edes kun pelkistys (jota seuraa uudelleenhapetus) suoritetaan puhdistetusta plasmasta peräisin olevalla 31-kD:llä, ts. proteiinin "avaaminen" ja uudelleenlaskostaminen. Tätä menettelytapaa on hiljattain parannettu uudelleenlaskostusprosessin periaatteeseen vaikuttamatta, ja parannettu menettelytapa on keksitty soveltuvaksi 12-kD, 18,5-kD ja 20-kD polypeptideille, ja 45-kD FBD/CBD-hybridipolypeptidille (12 kD-33 kD), muttei 31-kD polypeptidille.

Menetelmä on oleellisesti esimerkissä 5 kuvatunlainen. Seuraava kuvaus liittyy 12-kD polypeptidiin, ja samanlaiset tulokset saatiin 18,5-kD FBD-polypeptidille ja 45-kD FBD/-CBD-hybridipolypeptideille; nämä polypeptidit ekspressöitiin plasmideilla pFN 203-2 (kuvio 27), pFN 208-13 (kuvio 23) ja plasmidilla pFN 202-5 (kuvio 12), vastaavasti.

Bakteerikakku tuotettiin esimerkissä 2 kuvatulla tavalla fermentoimalla E. coli-kantaa A4255, joka sisälsi plasmidin pFN 203-2 (kuviossa 27 kuvatulla tavalla).

A. Bakteerikakun raakakäsittely:
Pelletin pesu ja uutto suoritettiin samalla lailla kuin kaksi- ja kolmisormisten FBD-proteiinien (katso esimerkkiä 5). Bakteerikakku suspendoitiin 20 tilavuuteen 50 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, pH 7,4. 15 min sekoituksen jälkeen suspensio rikottiin ajamalla sen kahdesti Dynomill kD 5 kuulamyllyn läpi nopeudella 50 l/tunti. Rikottu suspensio sentrifugoitiin (1 4000 x g Cepa 101-sentrifugissa syöttönopeudella 80 l/tunti. Pelletti suspendoitiin edellä olevassa puskurissa lopulliseen tilavuuteen, joka oli 10-kertainen bakteeri-

kakun alkuperäisen kuivapainoon nähden. Suspensio saatettiin 37 °C:seen ja lisättiin lysotsymiä (2 500 U/ml). 2 tuntia sekoituksen jälkeen 37 °C:ssa lisättiin Triton X-100 (1 %), ja inkubointia sekoittaen jatkettiin 30 min ajan huoneenlämpötilassa. Sitten suspensio laimennettiin yhtäsuurella tilavuudella deionisoitua vettä, sonikoitiin W 370-sonikoijalla ja sentrifugoitiin nopeudella 14 000 x g samoissa olosuhteissa kuin edellä. Pelletti pestiin kahdesti suspendoimalla sen uudelleen deionisoituun veteen lopulliseen tilavuuteen, jola oli 16-kertainen bakteerikakun alkuperäiseen kuivapainoon nähden, ja sekoittamalla 15 min ajan huoneenlämpötilassa pH-arvossa 7,4. Sekoittamisen jälkeen suspensio sonikoitiin W 370-sonikoijalla ja sentrifugoitiin 14 000 x g:llä samoissa olosuhteissa kuin edellä. Pestyä ja uutettua pellettiä, joka sisältää FBD-polypeptidin inkluusiokappaleita, pidetään pakastettuna -20 °C:ssa edelleenkäsittelyyn asti.

B. Uudelleenlaskostus/uudelleenhapetus:
Tulokseksi saadut pestyt inkluusiokappaleet (100 g:n edustaessa 19,2 g kuivapainoa) liuotettiin 5 tilavuuteen 10 mM Tris HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 1 mM fenyylimetaanisulfonyylifluoridia (PMSF), 10 mM ϵ-aminokaprinihappo, joka sisälsi lisäksi 6 M guanidiini·HCl:ää (lopullinen tilavuus 600 ml). Näyte pelkistettiin lisäämällä 2,27 ml ß-merkaptoetanolia (lopullinen konsentraatio: 50 mM) ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa ilmalta suojaten, ts. suljetussa astiassa 90 min ajan. Pelkistunyt proteiini uudelleenhapetettiin (proteiinikonsentraatiolla 0,81 mg/ml) 0,54 M guanidiini·HCl:ssä seuraavalla tavalla: 6 l hapetuspuskuria (10 mM Tris HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF 10 mM ϵ-aminokaprinihappoa, joka sisälsi lisäksi 0,3 mM hapetettua glutationia (GSSG), lisättiin pelkistetyn proteiinin liuos sekoittaen samalla nopeudella 150 ml/min. Hapetusmenetelmää jatkettiin 65 tunnin ajan huoneenlämpötilassa suljetussa astiassa, sekoittaen samalla jatkuvasti ja varovasti. Uudelleenhapetetun proteiinin liuos suodatettiin Whatman no. 3-suodatinpaperin läpi saostumien poistamiseksi, ja konsentroitiin sitten 10-ker-

taisesti Pellicon-tangentiaalivirtausultrasuodatusyksiköllä, joka oli varustettu 3 kD MW-katkaisurajamembraanilla ja diasuodatettiin samalla membraanilla guanidiini·HCl:n, ß-merkaptoetanolin ja GSSG:n poistamiseksi. Lisäsaostuma, joka muodostui yön yli 4 °C:ssa seisoessa, poistettiin sentrifugoimalla 22 500 x g:llä 45 min ajan. (18,5-kD ja 45-kD polypeptideille ultrasuodatus ja diasuodatus suoritettiin 10 kD:n molekyylipainon katkaisurajamembraanilla.)

C. Puhdistus:
Konsentroitu ja kirkastettu liuos (700 ml) lisättiin Q-Sepharose-kolonniin (2,5 x 28,5 cm), joka oli tasapainotettu 10 mM Tris·HCl:ssä, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF 10 mM ϵ-aminokapronihapossa, pH 8,0. Kolonnin läpivirtaus, joka sisälsi 45-kD proteiinin, lisättiin 170 - 350-mg erissä hepariini-Sepharose-kolonniin (2 x 6,5 cm), joka oli tasapainotettu 10 mM Tris·HCl:ssä, pH 8,0, 5 mM EDTA. Kun sitoutumaton proteiini oli pesty tällä puskurilla, sitoutunut proteiini eluoitiin samalla puskurilla, joka sisälsi lisäksi 500 mM NaCl. Eluaatit yhdistettiin ja pidettiin pakastettuna -20 °C:ssa.

Kuten edellä mainittiin, tätä menettelytapaa sovellettiin vähäisin muutoksin sekä 18,5-kD polypeptidille että 45-kD FBD/CBD-hybridipolypeptidille. Tulokset molemmilla näistä polypeptideistä olivat hyvin samanlaiset kuin 12-kD polypeptidillä saadut.

Puskurin käyttö, joka sisältää ainakin 0,5M NaCl:lää hepariini-Sepharosesta eluointiin ja varastointi havaittiin välttämättömäksi polypeptidien stabiilisuuden varmistamiseksi, joilla polypeptideillä oli muuten taipumus menettää aktiivisuutensa nopeasti; tämä koskee erityisesti 31-kD polypeptidiä.

Esimerkki 11
FBD-polypeptidifragmenttien karakterisointi
I. Menettelytavat

Tämän patenttihakemuksen mukaisilla menetelmillä tuotetut FBD-polypeptidifragmentit arvioitiin ja verrattiin joukossa karakterisointitestejä seuraavilla tekniikan tasolla tunnetuilla menetelmillä.

1. SDS-PAGE +ME (ME = ß-merkaptoetanoli): 12,5 % akryyliamidilaattageeleille lisätään proteiinia, joka on aikaisemmin käsitelty keittämällä 5 min ajan näytepuskurissa, joka sisältää 1 % SDS pelkistävissä olosuhteissa (+ 1 % ME). Elektroforeesi suoritettiin 20 µg:lla riviä kohden, ja geelit värjättiin Coomassie Brilliant Blue-sinisellä. Mitatut parametrit ovat: a) liikkuvuus, joka voidaan molekyylipainomerkkeihin (94, 67, 43, 30, 20,1 ja 14,4 kD) vertaamalla ilmaista näennäisenä molekyylipainona tutkitulle proteiinille; b) homogeenisyys tai puhtaus, joka voidaan vahvistaa pääasiallisen ja vähäisempien vyöhykkeiden suhteellisista intensiteeteistä.

2. SDS-PAGE -ME:
12,5 % akryyliamidilaattageeleille lisätään proteiinia, joka on aikaisemmin käsitelty 5-min keittämisellä näytepuskurissa, joka sisältää 1 % SDS:ää ei-pelkistävissä olosuhtessa (- ME). Elektroforeesi suoritetaan 20 µg:lla riviä kohden, ja geelit värjättiin Coomassie Brilliant Blue-sinisellä. Mitatut parametrit ovat: a) liikkuvuus, joka voidaan molekyylipainomerkkeihin (94, 67, 43, 30, 20,1 ja 14,4 kD) vertaamalla ekspressöidä näennäisenä molekyylipainona tutkitulle proteiinille; b) homogeenisyys tai puhtaus, joka voidaan vahvistaa pääasiallisen ja vähäisempien vyöhykkeiden suhteellisista intensiteeteistä - erityisesti, näissä olosuhteissa, voidaan arvioida disulfidilla liittyneiden dimeerien määriä.

3. Geelisuodatus Superose 12:lla:
Proteiinin näennäinen molekyylipaino ja homogeenisyys arvioitiin eluutioprofiileista, jotka saatiin Superose 12-kolonnilla (HR10/30, Pharmacia Fine Chemicals), joka oli kiinni-

tetty joko FPLC-laitteeseen, joka oli varustettu nestekromatografiakontrolloijalla LCC-500 ja piirturilla (Pharmacia Fine Chemicals), tai HPLC-järjestelmään (Waters Associates), joka koostui 2 pumpusta (malli 501), injektorista (malli U6K) ja automatisoidusta gradienttikontrolloijasta (malli 580), joka oli varustettu vaihdeltavan aallonpituuden detektorilla Spectro-Monitor 3000 (LDC/Milton Roy) ja Chromato-integraattorilla (Merck-Hitachi, malli 2000). Kolonni kalibroitiin seuraavien molekyylipainostandardien mukaan, joiden retentioajat määritettiin: naudan seerumialbumiini (67 kD), ovalbumiini (43 kD), kymotrypsinogeeni (25 kD) ja ribonukleaasi (13,7 kD). Virtausnopeus oli 0,8 ml/min, käyttäen vakioajopuskuria, ts. 150 mM NaCl 20 mM Tris·HCl, pH 7,8 - 8,0. Tarkkailtiin kahta parametriä: retentioaikaa ja puolikorkeusvyöhykkeenleveyttä.

4. UV-spektroskopia:
Spektrit saatiin huoneenlämpötilassa BBS:ssä tai PBS:ssä konsentraatioilla 0,2 - 1 mg/ml Philips UV/Vis-pyyhkäisyspektrofotometrillä malli PU8720 (kaistanleveydellä 2 nm), joka oli varustettu printterillä/piirturilla. Spektrit mitattiin Pye Unicam UV-piidioksidisoluissa, joissa oli 10 mm reitinpituus. Tarkkaitiin sekä absorptiokerrointa, ts. $\epsilon_{1\%}$ spektrin $\lambda_{max}$-arvolla, että suhdetta absorbanssien välillä kohdissa $\lambda_{max}$ ja $\lambda_{min}$.

5. Sisäinen fluoresenssi:
Tiedot saatiin Jasco-spektrofluorometrillä, malli FP-770, 25 °C ± 0,1 °C:ssa. Viritysaallonpituus oli 280 nm, ja sekä viritys- että emissiorako oli asetettu 5 nm:lle. Proteiinien konsentraatio määrityksessä oli 8 - 25 µg/ml joko PBS:ssä tai tuoreessa BBS:ssä, pH 7,5. Molemmissa mitatuissa parametreissä on selvä pH-riippuvuus, ts., $\lambda_{max}$-arvossa (spektrin maksimin aallonpituus) ja spesifinen intensiteetti (fluoresenssi-intensiteetti spektrin maksimilla normalisoituna proteiinikonsentraatiolla yksikössä mg/ml).

6. Aminohappokoostumus:
Tämä testi suoritetaan Stein & Moore'n tutkitulla aminohappoanalyysimenetelmällä. Proteiinin hydrolysointi suoritetaan kuivatulla proteiinilla Speed Vac-sentrifugissa (Savant) käsittelyn jälkeen: 6,0 N HCl:ää lisätään, 1 ml/mg proteiinia; ilma korvataan typellä peräkkäisillä tyhjiinimemisillä ja typpihuuhteluilla. Putki suljetaan ja kuumennetaan 22 tuntia 110 ± 0,1 °C:ssa. Nykyisin käytetty menetelmä on oleellisesti yhdenmukaisia ohjeiden kanssa, jotka esitetään julkaisussa the USP Drafts of Biotechnology-Derived Products, 1989 USP Convention, Inc.. <954> s. 96-98. Käytetty analysoija on Biotronic LC 5000, sarjanumero 515-01. Tällä menetelmällä arvioitu parametri on tähteiden lukumäärä kussakin aminohapossa, lukuunottamatta Cys ja Trp.

7. Hepariini-Sepharose kromatografia:
Näytteitä jopa 200 µl injisoitiin analyyttiseen hepariini-Sepharose-kolonniin (5,5 x 0,5 cm), joka oli kiinnitetty HPLC-järjestelmään (Waters Associates), joka koostui 2 pumpusta (malli 501), injektorista (malli U6K) ja automatisoidusta gradienttikontrolloijasta (malli 580), joka oli varustettu vaihdeltavan aallonpituuden detektorilla Spectro-Monitor 3000 (LDC/Milton Roy) ja Chromato-integraattorilla (Merck-Hitachi, malli 2000). Kolonni tasapainotettiin ennalta 10 mM Na-fosfaattia, pH 6,5, 75 mM NaCl virtausnopeudella 0,5 ml/min ja pestiin 5 min ajan samassa puskurissa. Proteiinit arvioitiin lineaarisella gradientilla 75 - 500 mM NaCl puskurissa 37,5 minuutissa. Arvioitiin kahta parametriä, retentioaikaa (ret. time), joka on suhteessa suolakonsentraatioon, jossa proteiini eluoituu, ja puolikorkeuskaistanleveys (half-ht. b.w.), joka määrittää huipun homogeenisyyden.

8. Käänteisfaasi-HPLC-kromatografia:
Näytteet injisoitiin analyyttiseen Waters Cls Bondapak-käänteisfaasikolonniin (30 x 0,39 cm), joka oli kiinnitetty HPLC-järjestelmään kuten kappaleessa 1.7. Kolonni tasapaino-

tettiin etukäteen 80 % $H_2O$:ssa, 0,1 % TFA/20 % asetonitriili, 0,08 % TFA virtausnopeudella 1 ml/min, ja pestiin 5 min ajan samoilla liuottimilla. Proteiinit eluoitiin lineaarisella gradientilla 40 %:iin $H_2O$ - 0,1 % TFA: 60 % asetonitriili - 0,08 % TFA 40 minuutissa. Kahta parametriä arvioitiin, retentioaikaa ja puolikorkeuskaistanleveyttä, joka määrittää huipun homogeenisyyden.

9. Tryptiset kartat:
200 µg näytteitä eri eristä sulatettiin 10 min ajan 37 °C:ssa eri trypsiini-paino/paino-suhteilla, yksikössä %: 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 & 10,0. Reaktio pysäytettiin 5 mM PMSF:llä, ja 30 min kuluttua jäässä, käsiteltiin samoilla puskureilla ±ME (katso kappaleita 1.1. & 1.2.) ja ajettiin run 20-% akryyliamidilevygeeleillä kuten edellä. Vyöhykemallien ekvivalenssiaste määritettiin Coomassie Brilliant Blue-sinisellä värjäämisen jälkeen.

10. Ellmannin menetelmä tiolin määrittämiseksi proteiineissa:
Määritys suoritetaan denaturoiduilla proteiineilla, jotta mahdollistettaisiin tioliryhmien täysi paljastus.

Kantaliuokset:
1. Guanidiini·HCl (puhtainta saatavilla olevaa) 7,2 M 10 mM Tris·HCl:ssä, pH 8 (GuCl); 2. DTNB (Ellman'nin reagenssi) 5 x $10^{-3}$ M 100 mM K-fosfaattipuskurissa, pH 7.

Menetelmä:
Proteiininäyte, joka sisälsi 10 - 100 µM tioliryhmiä, tehdään 0,15 ml:ksi; DTNB-nollakoe, (ts. ilman lisättyä proteiinia); 0,75 ml GuCl 7,2 M lisätään antamaan lopullisen konsentraation 6 M. 15 - 30 min huoneenlämpötilassa inkuboinnin jälkeen proteiiniliuosten 0-koe luetaan 412 nm:llä. Sitten lisätään 100 µl DTNB:tä lopulliseen konsentraatioon 5 x $10^{-4}$ M. 30 min huoneenlämpötilassa inkuboinnin jälkeen näytteet luetaan 412 nm:lla DTNB-nollakoetta vastaan. Konsentraatio

lasketaan käyttämällä $\epsilon$ = 13 600 $M^{-1}cm^{-1}$, ts. 100 $\mu$M tioliryhmiä antaa absorbanssiarvon 1,36.

11. Saostus/adsorptio

Eppendorf-putket, jotka sisältävät pakastettua $^{125}$I-FBD:tä, saavat sulaa huoneenlämpötilassa, ja sekoitettiin sitten pyörteittäen. Poistettiin kaksi 5-$\mu$l erää radioaktiivisuuden tarkkailua varten. Kun käytetään korkean spesifisen aktiivisuuden $^{125}$I-FBD:tä, laimennokset silikonisoiduissa putkissa suolarikkaalla puskurilla (0,6 M NaCl - 20 mM, $NaHCO_3$ pH 8 - 9) pitäisi suorittaa ennen laskemista. Sitten kantaliuos sentrifugoidaan huippunopeudella Eppendorf-sentrifugissa, ja supernatantti poistetaan toiseen silikonisoituun putkeen. Lasketaan jälleen kaksi 5-$\mu$l erää. Ennen ja jälkeen sentrifugoinnin saatujen radioaktiivisuuksien välinen erotus on "saostumis-%".

Kun $^{125}$I-FBD:tä pidetään pakastettuna (-70 °C:ssa) silikonisoiduissa putkissa jarunsassuolaisessa (0,6 M NaCl) puskurissa, proteiini on melko stabiilia. Havaitsimme vain vähäistä $^{125}$I-FBD:n saostumista 0 - 7 % 2 viikon aikana. Kuitenkin pidettäessä silikonisoimattomissa putkissa ja vähäsuolaisessa (150 mM NaCl) puskurissa, $^{125}$I-FBD:n saostuminen saattoi olla jopa 60 - 80 % 2 - 3 päivän aikana. Näissä olosuhteissa sekä saostuminen että adsorptio putkeen ovat oleellisia.

12. FBD:n reaktio $^{14}$C-putreskiinin kanssa

Reaktio mittaa FBD:n Gln #3:n saatavuutta tekijän XIIIa transglutaminaasireaktiolle).

Menetelmä:

Reaktioseokset (100 $\mu$l) silikonisoiduiissa Eppendorf-putkissa sisältävät: 10 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris·HCl (pH 7,5), 5 mM DTT, 120 $\mu$M $^{14}$C-putreskiiniä (Sigma), 6 $\mu$M FBD ja 0,05U/ml marsun maksan transglutaminaasia (Sigma). Huoneenlämpötilassa 0, 15, 30 ja 60 min inkuboinnin jälkeen erät (10 $\mu$l)

lisättiin putkiin, jotka sisältävät 200 µl pysäytysreagenssia (0,4 mg/ml BSA, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM $NaHCO_3$, pH 8,0) 0 °C:ssa (jäissä). Kylmää 20 % TCA:ta (250 µl) lisätään, ja 10 min inkuboinnin jälkeen jäässä lisätään vielä 3 ml kylmää 20-% TCA:ta, ja putken sisältö suodatetaan lasikuitusuodattimella (Whatman GF\C). Suodattimet pestään kolmesti kylmällä 20-% TCA:lla ja kerran 70-% etanolilla. TCA:lla saostuvaa radioaktiivista materiaalia tarkkailtiin betalaskurilla. FBD:n Gln #3:n saatavuus transglutaminaatioon laskettiin perustuen $^{14}C$-putreskiinin spesifiseen aktiivisuuteen ja FBD:n konsentraatioon reaktioseoksessa; 5 %:n kokonaisradioaktiivisuuden sisältyminen vastaa 100-% saatavilla oloa.

13. Itseassosioituminen

Reaktio suoritetaan 300 µl:ssa 150 mM NaCl-20mM $NaHCO_3$, pH 8,0, joka sisältää myös: 0,1x Tyrode'n puskuria; 0,6 % BSA; 5 mM $CaCl_2$; 0,15 µM $^{125}I$-FBD; 6 µl transglutaminaasia (0,02U/ml) - katso kappaletta 12.

Reaktioseoksia inkuboitiin 37 °C:ssa 18 tunnin ajan, minkä jälkeen seurasi reaktioliuoksen tyhjiinimu, pesu kolmesti 1 ml:lla "pesupuskuria", ja radioaktiivisuuden mittaus gammalaskurissa.

II. Tulokset

Kaikki FBD-proteiinit sisältävät ylimääräisen metioniinin aminoterminaalisessa päässä, ja pyroglutamaattitähteen sijasta, joka on p31 kD:n suojattu N-terminaalinen pää (joka on saatu translaation jälkeisellä modifikaatiolla koodatusta Gln:stä), niiden N-terminaalista Met-tähdettä seuraa Gln-tähde. FBD-proteiinien positiivinen tunnistus varmistettiin myös geelien "Western blot"-analyysillä - kehittäen anti-20 kD:llä. 45-kD tunnistettiin tunnistamalla sen täplät solunsitomisalueen sekä anti-20 kD:llä että anti-33 kD:llä.

FBD-fragmentteja ja 45-kD FBD/CBD-hybridejä karakterisoitiin

edelleen joukolla:

a) fysiko-kemiallisia testejä, kuten edellä kuvataan 31 kD:hen verrattuna (katso taulukoita C ja D).

b) biokemialliset ja biologiset testit in vitro: Gln #3:n saatavilla olo transglutaminaasi-katalysoidulle vaihtoamidoinnille (katso taulukoita C ja D); ja itseassosioituminen. Sitoutuminen ennalta muodostettuihin fibriinihyytymiin kuvataan esimerkissä 9.

c) biologiset testit in vivo: sitoutuminen laskimon veritulppiin rotissa kuvataan esimerkissä 13.

Taulukossa D esitetään yksityiskohtaisesti parametrit, jotka määritetään FBD-polypeptidien ja FBD/CBD-hybridin kemiallisella ja fysikokemiallisella karakterisoinnilla. 12-kD, 18,5-kD ja 45-kD polypeptidit tuotettiin plasmideilla pFN 203-2, pFN 208-13 ja pFN 202-5, vastaavasti.

Taulukossa E esitetään tosiasialliset mitatut arvot määritetyille FBD-polypeptideille.

Taulukko D. FBD-proteiinien karakterisointiparametrit

| Menetelmä | Parametrit |
|---|---|
| 1. SDS-PAGE +ME | molekyylipaino (vertaa merkkiaineet); puhtaus & homogeenisyys |
| 2. " -ME | molekyylipaino (vertaa merkkiaineet); puhtaus & homogeenisyys |
| 3. Geelisuodatus (Superose 12) | retentioaika; puolikorkeus kaistanleveys |
| 4. UV-spektroskopia | absorptiokerroin-$\lambda_{max}$-1%; absorbanssisuhde $\lambda_{max}/\lambda_{min}$ |
| 5. Sisäinen fluoresenssi | spesifinen intensiteetti (I/prot. kons.); $\lambda_{max}$ |
| 6. Aminohappokoostumus | tähteiden lukumäärä - ekvivalenssi teoreettiseen arvoon |
| 7. Hepariini-Sepharose | retentioaika; puolikorkeus kaistanleveys |
| 8. RP-HPLC | retentioaika; puolikorkeus kaistanleveys |
| 9. Ellman | Vapaat tiolit |
| 10. Reaktio 14C-putreskiinin kanssa | %-osuus teoreettisesta sitoutumisesta - edustaen Gln #3:n saatavillaoloa transglutaminaasista riippuvalle vaihtoamidoinnille (<0,5-% sitoutuminen entsyymin puuttuessa). |

Taulukko E: FBD-proteiineille mitatut arvot

| Proteiini | r18,5 kD | r12 kD | r45 kD | r31 kD |
|---|---|---|---|---|
| 1. SDS-PAGE +ME | 18,5 kD; ≥98-% | 14,2 kD; ≥98-% | 42 kD; ≥90-% | 31 kD; ≥98-% |
| 2. " -ME | 17,7 kD; ≥98-% | 14,4 kD; ≥98-% | 41 kD; ≥90-% | 28 kD; ≥98-% |
| 3. Geelisuodatus (Superose 12) | 18,29 min; 3 mm | 19,05 min; 2,5 mm | 16,56 min; 2 mm | 17,41 min; 3 mm |
| 4. UV-spektroskopia | 19,2; 1,84 | 13,5; 2,02 | ei tehty | 17,7; 1,55 |
| 5. Sisäinen fluoresenssi | 340 nm; 10,3 | 339 nm; 14,4 | ei tehty | 3,43 nm; 18,1 |
| 6. Aminohappo-koostumus | ekvivalentti teoreettisen arvon kanssa | ekvivalentti teoreettisen arvon kanssa | ei tehty | ekvivalentti teoreettisen arvon kanssa |

1082298

Taulukko E: FBD-proteiineille mitatut arvot (jatkoa)

| Proteiini | r18,5 kD | r12 kD | r45 kD | r31 kD |
|---|---|---|---|---|
| 7. Hepariini-Sepharose | 32,77 min; 8 mm | 31,14 min; 8 mm | 34,00 min; 8,5 mm | 36,50 min; 9 mm |
| 8. RP-HPLC | 23,02 min; 1 mm | 21,50 min; 1 mm | ei tehty | 23,76 min; 2 mm |
| 9. Ellman | ≤0,2 % | ≤0,2 % | ei tehty | ≤1 % |
| 10. Reaktio 14C-putreskiinin kanssa | 86,0 % | 100,0 % | ei tehty | 91 % |

Esimerkki 12

Ohjattu veritulppien sulatus FBD/SK-komplekseja käyttämällä

I. Johdanto

Yksinkertaiset ja tehokkaat fibriiniohjatut veritulppia liuottavat aineet ovat farmaseuttisen teollisuuden tärkeä päämäärä. Lähestymistapamme tällaisen lääkkeen kehittämiseen perustuu havaintoon, että fibronektiinin (FBD) N-terminaalinen fibriininsitomisalue voidaan ristiliittää spesifisesti fibriinihyytymiin tekijällä XIIIa. Koska juuri muodostunet veritulpat ovat ainoa ympäristö, joka on rikastunut aktivoidulla tekijällä XIII, FBD:llä voi olla edullinen sitoutuminen uusiin veritulppiin vanhoihin verrattuna, ja siitä tulee lopullinen kohdistusvehiikkeli. Olemme sen vuoksi muodostaneet kemiallisella ristiliittymisellä kimeerisiä FBD/streptokinaasi-konjugaatteja ja analysoineet niiden aktiivisuutta hyytymän liuottamisessa.

Kudosplasminogeeniaktivaattori (TPA) ja streptokinaasi (SK) tunnetaan parhaina sydänverisuonihoidossa käytettyjä fibrinolyyttisiä aineita. TPA ja SK hajottavat molemmat fibriiniä, mutta niiden vaikutustapa on erilainen. TPA:lla on fibriiniselektiivistä plasminogeenin aktivointia. TPA:n selektiivisyys johtuu fibriinin sitoutumiskohtien läsnäolosta molekyylin aminoterminaalisella alueella. TPA sitoutuu fibriiniin $K_d$-arvolla 0,16 $\mu$M. Fibriiniin sitouduttuaan sen $K_m$ plasminogeeniaktivaatioprosessille laskee arvosta 83 $\mu$M arvoon 0,18 $\mu$M, antaen tulokseksi plasminogeenin tehokkaan entsymaattisen muutoksen plasmiiniksi.

SK on vuorovaikutuksessa plasminogeenin kanssa muodostaen aktivaatiokompleksin, joka voi katalysoida plasmiinin muodostumista. Tämä vuorovaikutus ei riipu fibriiniin sitoutumisesta. Aktivoitu SK/plasminogeeni-kompleksi verivirrassa voi katalysoida verenkierrossa olevan plasminogeenin systeemistä muutosta plasmiiniksi. Aktivoitua plasmiinia inhiboi etusijassa $\alpha_2$-antiplasmiini. Kun inhibiittorikapasiteetti on käytetty loppuun, plasmiini hajottaa vapaata fibrinogeeniä,

fibriiniä ja joitain muita plasmaproteiineja. Tulokseksi saatu fibrinogenolyysi aiheuttaa normaalien koagulaatiomekanismiensortumista, lisäten siten verenvuodon vaaraa.

Johtuen TPA:n affititeetista fibriiniin sen oletetaan olevan edullinen fibrinolyyttisenä aineena suhteessa SK:hon, joka ei sido fibriiniä. TPA:ta ja SK:ta verrattiin aikaisemmin niiden terapeuttisen tehokkuuden suhteen useissa suurimittakaavaisissa kliinisissä ihmiskokeissa. Kertyneiden tietojen mukaan SK on useimmille potilaille suositeltava aine (Scrip no. 1597, s. 22-23, 8.3.1991). Pääasiallinen kiinnostus on edelleen parannetun fibrinolyyttisen aineen kehittäminen, jolla on kasvanut fibriiniselektiivisyys. Haluttujen molekyylien suunnitteluun käytetään sekä kemiallista ristiliittämistä että yhdistelmä-DNA-menetelmiä. On konstruoitu useita kimeerisiä plasminogeeniaktivaattorimolekyylejä, jotka sisältävät erilaisia suuren affiniteetin fibriininsitomisalueita useista plasmaperäisistä proteiineista tai monoklonaalisia anti-fibriini-vasta-aineita TPA:n katalyyttiseen alueeseen sitoutuneena. Useat farmaseuttiset yhtiöt analysoivat näitä molekyylejä niiden terapeuttisen tehokkuuden suhteen.

Aktivoitu tekijä XIII (transglutaminaasi) katalysoi fibriinimolekyylien ristiliittymistä veren hyytymisen viimeisessä vaiheessa, lisäten siten hyytymän mekaanista stabiilisuutta. Kuten esimerkissä 6B kuvataan, myös koskematon plasman fibronektiini (FN) ristiliittyy fibriiniin tekijän XIIIa vaikutuksesta.

Kuten esimerkeissä 2 ja 4 kuvattiin, kaksinnön hakijat ovat kloonanneet ja ekspressöineet FN:n FBD-polypeptidifragmentit (12 kD, 18,5 kD, 20 kD ja 31 kD). Näitä polypeptidejä on tutkittu in vitro ja in vivo niiden kyvyn suhteen sitoutua kovalenttisesti fibriinihyytymiin ja veritulppiin tekijän XIIIa läsnä ollessa (Esimerkki 6, 9, 13). Päätimme käyttää hyväksi tätä FBD-molekyylien sisäistä kykyä liittyä kova-

lenttisesti fibriiniin ja luoda kemiallista ristiliittymistä käyttäen (tai yhdistelmä-DNA-menetelmillä) kimeerisiä FBD/-SK-molekyylejä SK:n kohdistamiseksi veritulppiin, vähentäen siten verenvuotovaaraa.

II. FBD:n ja SK:n kemiallinen derivatisointi ja ristiliittäminen

FBD-polypeptidejä ja fragmentteja, jotka ulottuvat FN:n aminoterminaalisen alueen yli, derivatisoitiin N-sukkinimidyyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaatilla (SPDP) - heterobifunktionaalisella ristiliittäjällä.

SPDP reagoi alkalisessa pH-arvossa primääristen amiinien kanssa lisäten proteiiniin 2-pyridyylidisulfidiryhmiä. Mittaamalla absorbanssin 343 nm:llä, joka on tällä pH-alueella spesifinen modifioidun FBD:n pelkistyksen jälkeen vapautuneelle tiopyridiiniryhmälle, laskettiin ristiliittäjäryhmien lukumäärä FBD-molekyyliä kohden. Plasman 31-kD FBD-molekyylillä saatiin hyvin huonot reaktiosaannot, koska sillä oli taipumus saostua kemiallisen modifikaation olosuhteissa. Suoritettiin lisää kokeita plasmidin pFN 196-2 (kuvio 10) tuottamalla 12-kD yhdistelmä-DNA-FBD-molekyylillä. Noin 2 tähdettä ristiliittäjää havaittiin tulleen lisätyksi kutakin 12-kD FBD-molekyyliä kohden.

SK, josta puuttuvat kysteiinitähteet, derivatisoitiin 2-iminotiolaanilla. Tämä reagenssi reagoi primääristen amiinien kanssa lisäten varautuneen välikkeen, joka päättyy tioliryhmään. SK-molekyyliin lisättyjen tioliryhmien lukumäärä määritettiin Ellman'in reagenssia käyttämällä. Modifiointiolosuhteissa havaittiin, että SK-molekyyliä kohden lisättiin noin 2 tioliryhmää.

Sekoittamalla kaksi derivatisoitua polypeptidiä vapaa tioliryhmä vaihtuu 2-pyridyylisulfidryhmän kanssa, muodostaen kahden proteiinin välille disulfidisidoksen ja vapauttaen pyridiini-2-tiolia. Konjugointi havaittiin optimaaliseksi

derivatisoidun FBD:n 4 - 8-kertaisella molaarisella ylimäärällä. Näissä olosuhteissa oleellisesti kaikki derivatisoidut SK-molekyylit olivat reagoineet FBD-molekyylien kanssa. Konjugointiprosessi analysoitiin SDS-PAGE:lla ja geelisuodatuksella FPLC:llä, joka oli kiinnitetty Superose 12:een. Kompleksin muodostuminen eteni loppuun noin 10 minuutissa, antaen tulokseksi molekyylien seoksen, joissa olivat vaihtelevat FBD- ja SK-pitoisuudet.

Kemialliset modifiointi- ja ristiliittämisreaktiot suoritettiin tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Runge et al.; PNAS, USA 84 (1987) 7659-7662.

Kemiallisille modifiointireaktioille aikaansaaduissa optimoiduissa olosuhteissa pyridyylidisulfidi- ja tioliryhmien lukumäärä kussakin FBD- ja SK-molekyyleistä on noin 2. Näin muodostunut konjugointiseos sisälsi enimmäkseen haluttua 1:1-hybridiä.

FBD/SK-kompleksin eristäminen

Konjugoitujen ja vapaiden SK- ja FBD-molekyylien välinen erotus suoritettiin kahdessa vaiheessa seuraavalla tavalla: Ensin suoritettiin geelisuodatus Superose 6:lla ylimääräisen 12-kD FBD:n poistamiseksi. Toiseksi, käytettiin kromatografiaa hepariini-Sepharose:lla vapaan streptokinaasin erottamiseksi konjugaatista, joka sitoutuu hartsiin puskurilla 25 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, ja eluoitiin sitten 0,5M NaCl:llä samassa puskurissa. Vapaan SK:n kontaminaatio geelielektroforeesilla arvioituna on alle 5 % lopullisesta valmisteesta.

FBD/SK-kompleksin funktionaalinen karakterisointi

Ristiliitettyä FBD/SK-kompleksia, joka oli puhdistettu hepariini-Sepharose-kromatografialla, verrattiin natiivin SK:n kanssa seuraavia kriteerejä käyttäen:

1. Plasminogeeniaktivaation kinetiikka käyttämällä plasmiinin kromogeenistä substraattia S-2251 (kuvio 33).

2. Fibrinolyyttinen aktiivisuus käyttämällä fibriinilevymääritystä (kuvio 34), menetelmällä, jonka on kuvannut Neville Marsh, Fibrinolysis, 1981.

3. Ihmisen plasman hyytymän liuotus käyttämällä $^{125}$I-fibrinogeeniä hyytymän muodostukseen.

Tulokset osoittavat, että kompleksilla säilyi plasminogeeniaktivaattoriaktiivisuustaso, joka oli verrattavissa SK:n aktiivisuustasoon. Kuviosta 33 näennäiset $K_m$-arvot plasminogeenisubstraatille, $K_{plg}$, olivat 3,1 x $10^{-6}$ M ja 1,8 x $10^{-6}$ M SK:lle ja FBD/SK-kompleksille, vastaavasti, kun taas katalyyttisen nopeusvakion kompleksille, $K_{plg}$, havaittiin olevan tekijällä 2 SK:ta alhaisempi. Lisäksi kuviossa 34 ei osoita merkittävää eroa liukenemisalueiden välillä, jotka muodostuivat inkuboitaessa yön yli joko SK:ta tai FBD/SK-komplekseja.

Lisäksi $^{14}$C-putreskiini liittyi komplekseihin marsun maksan transglutaminaasilla noin 40 %:lla tasosta, jolla se liittyi 12-kD FBD:hen (kuvio 35); vertaa taulukon E kanssa, esimerkki 11. DTT lisää kompleksiin liittymisen jopa 140 %:iin. Ei havaittu liittymistä SK:hon. Nämä havainnot ilmaisevat, että FBD/SK-konjugaatilla on säilynyt kyky ristiliittyä veritulppiin aktivoidun tekijä XIII:n vaikutuksella.

Lisäksi keksinnön hakijat ottavat huomioon yhdistelmä-DNA-plasmidin koodittaman kimeerisen FBD/SK-polypeptidin konstruoinnin.

Esimerkki 13

Veritulppien leimaaminen in vivo $^{111}$In-leimatulla 12-kD ja 18,5-kD FBD:llä rotan ruostumattomasta teräksestä olevan silmukan mallilla

Käytetty malli on oleellisesti esimerkissä 7 kuvattu. 12-kD, 18,5-kD ja 31-kD yhdistelmä-DNA-FBD-polypeptidifragmentit leimattiin $^{111}$In:llä DTPA-menetelmällä (esimerkki 8). Leimatut materiaalit (spesifinen aktiivisuus noin 5 x $10^6$ cpm/$\mu$g) annettiin laskimonsisäisesti (5 x $10^6$ cpm/rotta) silmukan sisältäviin rottiin (esimerkki 7) 5 tuntia ennen silmukoiden sijoittamista. Poistettiin silmukat, jotka sisälsivät veritulppia ja laskettiin 24 leiman antamisen jälkeen. Kuviossa 31 esitetään tulokset spesifisestä radioaktiivisuudesta hyytymissä ja veressä, ja kuviossa 32 esitetään vastaavat veritulppa:veri-suhteet. Kuten esitetään, korkeat veritulppaspesifiset radioaktiivisuusarvot saatiin kolmella yhdisteellä. 31-kD FBD-ryhmän veritulpissa havaittiin korkeampia arvoja kuin 12-kD ja 18,5-kD FBD-fragmenttien. Veritulppa/-veri-suhteet olivat kuitenkin 31-kD FBD:hen verrattuna korkeammat 12-kD ja 18,5-kD FBD-fragmenteilla, johtuen alhaisemmista veritasoista. Tämä voi johtua lyhyempien fragmenttien spesifisyyksien ja aktiivisuuksien kapeammasta kirjosta 31-kD polypeptidin spesifisyyteen ja aktiivisuuteen verrattuna (esimerkki 9, taulukko C).

Esimerkki 14

FBD-polypeptidien käyttö haavan parantamisessa

Haavan paranemisen varhaisissa vaiheissa epiteeli kulkee fibriinin ja fibronektiinin geelikerroksen päälle, ennen kuin muodostuu uudelleen membraanikomponenttien, kuten laminiinin ja tyypin IV kollageenin pysyvä pohjakerros. Alun plasmaperäinen geeliin, joka sisältää sekä fibriiniä että fibronektiinia, tulee helposti fibroblasteja, ja sillä on hemostaattisia ja tarttumistehtäviä, aikaansaaden tilapäisen matriisin solun kulkua varten ja kemotaktisten - ja kasvutekijöiden ("haavahormonien") varaston. Verisuonten ulkopuolinen geeli, joka muodostaa nopeasti ristikon, ottaa vastaan fibronektiiniä. On osoitettu, että fibroblastit tarttuvat fibriiniverkkoon in vivo pääasiassa fibronektiinin kautta (Grinnell, F. et al., Cell 19 (1980) 517-525; Colvin, R.B. et. al., Lab Invest. 41 (1979) 464-473; Knox, P. et. al., J.

Cell Biol. 102 (1986) 2318-2323). Sen vuoksi uskotaan, että haavan paranemisen alkutapahtumat vaativat sekä fibriinin sitomista että fibronektiinin solunsitomisalueita. Koska fibronektiinin tarttuminen fibriiniin tapahtuu luultavasti fibronektiinin Gln-3:n transglutaminaasikatalysoidulla vaihtoamidoinnilla fibriinilysiinitähteiksi, niin mikä hyvänsä fibriininsitomisaluepolypeptidi, joka sisältää Gln-3:a ympäröivän alueen ehjän rakenteen, voisi pystyä toimimaan tässä järjestelmässä. Siten keksinnön hakojoiden 12-kD ja 18,5-kD FBD:n polypeptidifragmentteja voidaan myös käyttää yhdessä CBD-polypeptidin kanssa haavan paranemisen lisäämiseen. Huomaa, että voidaan käyttää yhdistelmä-DNA-CBD-polypeptidiä, kuten r33 kD:tä ja r40 kD:tä, jotka on kuvattu yhdessä haetussa PCT-patenttihakemuksessa WO9007577.

Ihmis-fibronektiinin FBD:n potentiaalin määrittämiseksi haavan paranemisen edistymisessä se testattiin solunlevitysmäärityksessä. Tässä määrityksessä fibroblastien annetaan levitä lasisille peitinlevyille, joihin on absorboitu CBD-polypeptidiä FBD-polypeptidin puuttuessa tai läsnä ollessa. Siten testataan FBD-aluepeptidin kyky toimia solun paikallisen tarttumisen edistäjänä, apualustana fibronektiinin solunsitomisalueena. Käytettäessä yhdistelmänä 75-kD solunsitomisalueen (CBD) kanssa, joka on peräisin naudan plasman fibronektiinistä, plasmaperäisen FBD:n, p31 kD, ja yhdistelmä-DNA-FBD:n, r31 kD, jotka ovat molemmat ihmisperäisiä, keksittiin molempien olevan toisistaan erottamattomissa niiden kyvyn suhteen edistää NRK-fibroblastien paikallista tarttumista. Molemmat ihmisproteiinialueet olivat paljon tehokkaampia kuin vastaava fragmentti, joka oli naudasta peräisin, käytettäessä samoilla konsentraatioilla, ts. 100 µl liuosta, jossa oli 10 µg/ml seosta, jossa oli 1:1 FBD- ja CBD-proteiineja (katso alla kokeellisia yksityiskohtia). Ero vaikutuksissa 75-kD CBD:llä yksinään ja yhdistelmänä FBD:n kanssa oli silmäänpistävä. Interferenssireflektiomikroskopiassa (IRM) soluista, jotka oli levitetty 75 kD CBD:lle yksinään, nähtiin vain amorfisia 'harmaita' läikkiä ja täp-

liä (joiden tiedetään vatsapuolen membraanireplikaattien elektronimikroskopiasta - EM - liittyvän klatriiniin perustuviin rakenteisiin), mutta FBD:n (yhdistelmä-DNA- tai plasmaperäisen) sisällyttäminen apualustana indusoi selvästi määriteltyjen pesäkemäisten tarttumisrakenteiden muodostumisen, jotka näkyivät IRM:llä tiheinä mustina juovina (jolloin värin tiheys osoitti vastapuolen pinnan pinnan paremman kontaktin alustaan). IRM/EM-korrelaatiot osoittivat, että nämä lujat, järjestyneet tarttumiset vastaavat solun tukiverkoston pinnan suuntaisesti sijaitsevien aktiinifilamenttien nippujen (stress fibers) päätyjä.

FBD:n ja CBD:n yhdistettyjen vaikutusten edelleen tutkimiseksi haavan paranemisessa konstruoitiin 45-kD polypeptidi (12 kD FBD/33 kD CBD) ja 64-kD polypeptidi (31 kD FBD/33 kD CBD) (kuviot 12 ja 25, vastaavasti). Samanlaisia hybridipolypeptidejä tarkastellaan käyttämällä 12-kD tai 18,5-kD FBD:tä 31-kD FBD:n sijasta ja käyttämällä 40-kD CBD-polypeptidiä 33-kD CBD-polypeptidin sijasta.

Kokeelliset yksityiskohdat

Sekä p75 kD CBD (naudasta peräisin) että 31 kD FBD (ihmis-yhdistelmä-DNA-peräinen) polypeptidiä konsentraatiossa 10 µg/ml PBS:ssä, kokonaistilavuus 100 µl, sai adsorboitua kosteassa ilmakehässä 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa 13-mm lasipeitinlevyihin (Chance Propper Ltd. Warley, UK), jota oli käsitelty yön yli konsentroidulla $H_2SO^4$:llä ja huuhdottu läpikotaisin tislatulla vedellä. Kun oli pesty PBS:llä, pH 7,1, peitinlevyjä inkuboitiin ovalbumiinin (1 mg/ml PBS:ssä, Sigma Chemical Co.) kanssa 10 min ajan huoneenlämpötilassa ei-spesifisen tarttumisen vähentämiseksi. Levitysmääritys suoritettiin NRK-soluilla, aliviljeltiin 18 tunnin ajan ennen irrottamista 0,1 mg/ml TPCK-trypsiinillä (Sigma Chemical Co.) ja uudelleen suspendointia $Ca^{2+}$:aa sisältävään Eagle'n minimaaliseen välttämättömään väliaineeseen (EMEM) 20 min ajan 37 °C:ssa. Nämä solut saatiin 1-solususpensioon

imemällä varovasti 5-ml ruiskuun, joka oli varustettu ihonalaisella neulalla, minkä jälkeen seurasi 3 pesua EMEM:llä, joka sisälsi 2 % paino/tilavuus ovalbumiinia. Solujen levityksiä tarkkailtiin suspendoimalla pestyt NRK-solut uudelleen peitinlevylle, jossa oli proteiinialustaa tiheydellä 1 x $10^4$ solua/cm2. Niitä tutkittiin interferenssireflektio- ja faasikontrastimikroskopialla käyttämällä Leitz Ortholux II-mikroskooppia, joka oli varustettu x50/1,0 ja x 100/1,32 PHACO RK-objektiiveilla, ja otettiin valokuvia (Kodak technical Pan 2415 35-mm filmi). 2 tunnin kuluttua elävät solut kiinnitettiin 2,5 % tilavuus/tilavuus glutaraldehydillä (TAAB Labs, Reading, Berks, Yhdistynyt Kuningaskunta) 0,1 M natriumkakodylaattipuskurissa, ja kiinnitetyt solut tutkittiin EM:llä.

Esimerkki 15

Korkean radiokemiallisen puhtauden omaavien $^{111}$In-DTPA-modifioitujen FBD-proteiinien käyttö korkeiden veritulppa:veri-suhteiden saavuttamiseksi rottamallissa

1. DTPA-modifioitujen FBD-proteiinien modifiointi ja radioleimaus

Esimerkissä 8 kuvattua DTPA-modifiointimetodologiaa ja DTPA-modifioitujen FBD-proteiinien radioleimausta parannettu. Nämä parannukset ovat mahdollistaneet korkeiden veritulppa:-veri-suhteiden saavuttamisen silmukkamallissa rotissa.

1.1 DTPA-modifiointi

Kaikki kolme yhdistelmä-DNA-molekyyliä, r31 kD, r18,5 kD ja r12 kD, modifioitiin 20-kertaisella ylimäärällä DTPA:ta 0,1 M HEPES-puskurissa, pH 7,0, ja ylimääräinen DTPA poistettiin geelisuodatuksella.

1.2 Radioleimaus

Yksi lisätyistä muutoksista oli, että radioleimaus $^{111}InCl_3$:lla suoritettiin alhaisessa pH-arvossa (0,2 M sitraattipuskuri, pH 5,7) radiokolloidien määrän minimoimisek-

si. Lisävarotoimenpide suoritettiin varmistamaan että poistetaan kontaminoivat raskasmetalli-ionit, jotka voisivat syrjäyttää kelatoidun $^{111}$In:n DTPA-modifioidusta proteiinista vaihtamalla radioleimatun FBD-liuoksen puskurit Chelex-100-käsitellyillä puskureilla.

2. Työohje FBD-proteiinien modifioimiseksi ja radioleimaamiseksi

Alla esitetään yksityiskohtainen parannettu menettelytapa FBD:n r31 kD-, r18,5 kD- ja r12 kD-polypeptidifragmenttien DTPA-modifioimiseksi ja radioleimaamiseksi.

2.1. Suolanpoisto

Proteiinit (kaikki 0,5 M NaCl:ssä, joka sisältää mmol-konsentraatioita EDTA:ta ja muita proteaasi-inhibiittoreita) suolanpoistokäsiteltiin ja siirrettiin HEPES-puskuriin (0,1 M, pH 7). 31-kD FBD (27 ml, 0,6 mg/ml) suolanpoistokäsiteltiin dialyysillä, kun taas sekä 18,5-kD FBD (5 ml, 8,7 mg/ml) että 12-kD FBD (5 ml, 5,6 mg/ml) suolanpoistokäsiteltiin PD-10-geelisuodatuskolonneilla.

2.2 DTPA-modifiointi

Tämä suoritettiin 20-kertaisella ylimäärällä DTPA-anhydridiä 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa tilavuudessa 27 ml 31-kD FBD:n tapauksessa ja 7 ml sekä 12-kD että 18,5-kD FBD-proteiinien tapauksessa. Erät (100 µl) modifiointiseosta siirrettiin syrjään DTPA-tähteiden lukumäärän määrittämiseksi, jotka oli lisätty proteiineihin, ja vapaa DTPA poistettiin materiaalin loppuosasta geelisuodattamalla 2,6 x 60 cm Sephadex G-25-kolonnilla, jota oli etukäteen tasapainotettu ja kehitetty HEPES-puskurilla. Proteiinia sisältävät fraktiot (30 ml) kerättiin, ja saadut proteiinikonsentraatiot olivat 0,35 mg/ml, 0,8 mg/ml ja 0,9 mg/ml r31 kD-, r18,5 kD- ja r12 kD-FBD-proteiineilla, vastaavasti. Modifiointiaste, joka määritettiin TLC:llä silikageelillä (kehitettiin 85-% metanolissa), havaittiin olevan 1,1, 0,8 ja 1,6 edellä olevilla FBD-proteiineilla, vastaavasti. DTPA-modifioituja FBD-

proteiineja varastoitiin pakastettuina -20 °C:ssa, ja sulatetut erät amtoivat toistettavissa olevia tuloksia $^{111}$In:llä radioleimattaessa.

2.3. Radioleimaus

Leimaaminen suoritettiin $^{111}InCl_3$:lla, joka oli säädetty tasolle 0,2 M natriumsitraattia, pH 5,7, lisäämällä 125 µl 1 M natriumsitraattia, pH 5,7 500 µl:aan kantajavapaata $^{111}InCl_3$-kantaliuosta ($^{111}$In: 3,2 mCi/ml). Reaktioseos radioleimausta varten sisälsi (lopulliset konsentraatiot): FBD-proteiinia 0,2 µg/µl, HEPES 60 mM, HCl 10 mM, natriumsitraattia 0,2 M ja $^{111}$In 0,8 µCi/µl. Reaktio sai edetä 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Radiokemiallinen puhtaus analysoitiin TLC:llä silikageelillä (kehitettiin 85-% metanolissa), ja FBD:n kaikilla polypeptidifragmenteilla se oli alueella 91 - 95 %. Siten radioleimattujen FBD-proteiinien spesifinen aktiivisuus on noin 3,6 µCi/µg (~8 x $10^6$ cpm/µg). Koska raskasmetalli-ionit, joita mahdollisesti on läsnä hivenainepitoisuuden kontaminoivina aineina radioleimauksen aikana käytetyissä puskureissa, voisivat syrjäyttää DTPA-modifioituihin FBD-proteiineihin sitoutuneen $^{111}$In:n, radioleimatut FBD-proteiinit ajettiin 10-ml Sephadex G-25-kerroksen läpi, joka oli etukäteen tasapainotettu, ja joka oli kehitetty BSA:ta sisältävällä BBS-puskurilla, joka oli esikäsitelty Chelex-100:lla (kontaminoivien metalli-ionien poistamiseksi).

3. Biologinen aktiivisuus

Biologinen aktiivisuus testattiin in vitro sitomalla $^{111}$In-leimatun DTPA-modifioidun FBD:n ennalta muodostettuihin hyytymiin ja in vivo terässilmukkaindusoidulla laskimoveritulppamallilla rotissa.

3.1 Sitoutuminen ennalta muodostettuihin hyytymiin

Tämä suoritettiin täsmälleen esimerkissä 6 jodatulle FBD:lle kuvatulla tavalla. Kolmen $^{111}$In-leimatun DTPA-modifioidun FBD-proteiinin spesifinen aktiivisuus oli 6 x $10^6$ cpm/µg

proteiinia. Kokeiden tulokset esitetään taulukossa F (toinen sarake).

3.2 Laskimoveritulpat rotissa

Käytetty malli (silmukkaindusoidut laskimoveritulpat rotissa) on kuvattu esimerkissä 7. Tämän esimerkin kokeissa kukin ryhmä, joka koostui 7 rotasta, joihin injisoitiin 5 x $10^6$ cpm (spesifisellä aktiivisuudella 6 x $10^6$ cpm/$\mu$g proteiinia) $^{111}$In-leimattua DTPA-modifioitua FDB-proteiinia. Kokeiden tulokset esitetään taulukossa F (3 viimeistä saraketta).

Taulukko F: FBD-proteiinien sitoutuminen veritulpat in vitro ja in vivo

| | In vitro-hyytymä-määritys | Laskimoveritulpat rotissa | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Spesifinen radioaktiivisuus (cpm/g) | | Veritulppa:veri-suhde |
| FBD-proteiini | % sisään tulleista tuikkeista[a] | Veritulppa | Veri | |
| r12kD | 24 % | 24264±2700 | 375±77 | 78,2±17,3 |
| r18,5kD | 26 % | 28548±5028 | 289±41 | 98,3±13,3 |
| r31kD | 24 % | 19796±4144 | 1198±83 | 15,6±2,4 |

[a]Noin 50 % näistä arvoista saadaan jodiasetaatin, transglutaminaasi-inhibiittorin läsnä ollessa.

Viitteet

1. Uehara, A., et al., J. Nuclear Med. 29 (1988) 1264-1267.

2. Zoghbi, S.S., et al., Invest. Radio. 20 (1985) 198-202.

3. Kakkar, V.V., et al., Lancet 1 (1970) 540-542.

4. Knight, L.C., Nuclear Med. Commun. 9 (1988) 849-857.

5. Knight, L.C., Nuclear Med. Commun. 9 (1988) 823-829.

6. Som. P., et al., J. Nuc. Med. 27 (1986) 1315-1320.

7. Palabrica, T.M., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1036-40.

8. Akiyama, S.K. ja Yamada, K.M., Adv. Enzymol. 57 (1987) 1-57.

9. Pierschbacher, M.D., et al., J. Biol. Chem. 257 (1982) 9593-9597.

10. Pande, H. ja Shively, J.E., Arch. Biochem. Biophys. 213 (1982) 258-265.

11. Hayashi, M. ja Yamada, K.M., J. Biol. Chem. 258 (1983) 3332-3340.

12. Sekiguchi, K. ja Hakomori, S.-I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 2661-2665.

13. Ruoslahti, E., et al., J. Biol. Chem. 256 (1981) 7277-7281.

14. Owens, R.J. ja Baralle, F.E., EMBO J. 5 (1988) 2825-2830.

15. Obara, M., et al., FEBS Letters 213 (1987) 261-264.

16. Obara, M., et al., Cell 53 (1988) 699.

17. Ichihara-Tanaka, K., et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 401-407.

18. Mandel, et al., Principal and Practice of Infectious Disease 2 (1979) 1531-1552.

19. Proctor, R.A., et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 1181-1188.

20. Eldor, A., et al., Thrombosis and Haemostatis 56(3) (1986) 333-339.

21. Fritzberg, A.R., Nucl. Med. 26 (1987) 7-12.

22. Young, R.A. ja Davis, R.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 1194-1198.

23. Hugh, T., et al., teoksessa DNA Cloning: A Practical Approach (D. Glover, toimittaja), IRL Press, Oxford (1984).

24. Vogel, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 3180-3184.

25. Bagly, D., et al., Methods in Enzymol. 45 (1976) 669-678.

26. Wagner ja Hynes, J. Biol. Chem. 254 (1979) 6746-6754.

27. McDonagh, R.P., et al., FEBS Lett. 127 (1981) 174-178.

28. Mosher, et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 1181-1188.

29. Russel, P.B., et al., J. Clin. Micro. 25 (1987) 1083-1087.

30. Bolton, A.E. ja Hunter, W.M., Biochem. J. 133 (1973) 529.

31. Obara, et al., Cell 53 (1988) 649-657.

32. Fritzberg, A.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85 (1988) 4025-4029.

33. Knight, L.C., et al., Radiology 173 (1989) 163-169.

34. Wasser, M.N.J.M., et al., Blood 74 (1989) 708-714.

35. Burger, J.J., et al., Methods in Enzymology 112 (1985) 43-56.

36. Yamamoto, K., et al., Eur. J. Nucl. Med. 14 (1988) 60-64.

37. Peterson, et al., teoksessa Fibronectin, toimittaja Moshen, Academic Press, USA, 1989: s. 1-24, erityisesti kuvio 2 sivulla 5.

**Patenttivaatimukset**

1. Kuvausaine, **tunnettu** siitä, että siinä on polypeptidiä, joka on leimattu kuvattavalla merkkiaineella, jolloin tällaisella polypeptidillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisen identtinen sekvenssin kanssa, joka on läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin N-terminaalisella fibriininsitomisalueella, joka polypeptidi voi sitoutua fibriiniin, omaa molekyylipainon yli noin 6 kD mutta alle noin 20 kD, ja jolla on aminohapposekvenssi gln-ala-gln-gln tai met-gln-ala-gln-gln polypeptidin N-terminaalisessa päässä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kuvausaine, **tunnettu** siitä, että peptidin molekyylipaino on noin 12 kD tai yli tai noin 18,5 kD tai alle.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen aine, **tunnettu** siitä, että merkkiaine on radioaktiivinen isotooppi, alkuaine, joka on röntgensäteille läpinäkymätön, tai paramagneettinen ioni, tai merkkiaineen ollessa radioaktiivinen isotooppi on se valittu ryhmästä käsittäen indium-111:n, teknetium-99m:n, jodi-123:n, jodi-125:n, jodi-131:n, krypton-81m:n, ksenon-133:n ja gallium-67:n.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen aine, **tunnettu** siitä, että polypeptidi on 12 kD polypeptidi tai 18,5 kD polypeptidi, jolloin aminohapposekvenssi, joka on oleellisen identtinen ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella läsnä olevan sekvenssin kanssa, on kuviossa 2 esitettyjen aminohappojen 1 - 109 tai 1 - 154 sekvenssi vastaavasti.

5. Menetelmä fibriiniä sisältävän aineen kuvaamiseksi, **tunnettu** siitä, että kuvattava fibriiniä sisältävä aine saatetaan kontaktiin jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukaisen aineen kanssa sellaisissa olosuhteissa, että aine sitoutuu fibriiniä sisältävään aineeseen, ja kuvataan sitoutunut aine ja täten fibriiniä sisältävä aine kuvataan.

6. Plasmidi polypeptidin ekspressiota varten, jolla polypeptidillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän, ihmis-fibronektiinin N-terminaalisella fibriininsitomisalueella, joka polypeptidi voi sitoutua fibriiniin, omaa molekyylipainon yli noin 6 kD mutta alle noin 20 kD, ja jolla on aminohapposekvenssi gln-ala-gln-gln tai met-gln-ala-gln-gln polypeptidin N-terminaalisessa päässä, jossa plasmidissa on DNA:ta, joka koodittaa polypeptidiä, ja DNA:ta, joka koodittaa sopivia säätelyelementtejä, jotka sijaitsevat suhteessa polypeptidiä koodittavaan DNA:han niin, että ne aikaansaavat polypeptidin ekspression sopivassa isäntäsolussa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen plasmidi, **tunnettu** siitä, että polypeptidi on noin 12 kD polypeptidi tai noin 18,5 kD polypeptidi, joka vastaa aminohapposekvenssiä, joka on läsnä ihmis-fibronektiinin fibriininsitomisalueella.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen plasmidi, jota kutsutaan nimellä pFN 949-2 ja on talletettu Escherichia coli -kannassa A1645 ATCC-talletusnumerolla 67831; nimellä pFN 196-2 ja on talletettu Escherichia coli -kannassa A4255 ATCC-talletusnumerolla 68328; nimellä pFN 203-2 ja on talletettu Escherichia coli -kannassa A4255 ATCC-talletusnumerolla 68606.

9. Solu, joka sisältää jonkin patenttivaatimuksen 6 - 8 mukaisen plasmidin.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen Escherichia coli -solu, **tunnettu** siitä, että plasmidia kutsutaan nimellä pFN 949-2 ja solu on talletettu ATCC-talletusnumerolla 67831; tai plasmidia kutsutaan nimellä pFN 196-2 ja solu on talletettu ATCC-talletusnumerolla 68328.

11. Menetelmä polypeptidin tuottamiseksi, jolla polypeptidillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin N-terminaalisella fibriininsitomisalueella ja joka polypeptidi voi sitoutua fibriiniin ja jolla on aminohapposekvenssi gln-ala-gln-gln tai met-gln-ala-gln-gln polypeptidin N-terminaalisessa päässä, **tunnettu**

siitä, että patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukaista solua käsitellään niin, että DNA ohjaa polypeptidin ekspressiota ja solu ilmentää polypeptidiä, ja otetaan solusta talteen näin ekspressoitu polypeptidi.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se edelleen sisältää polypeptidin sitomisen trombolyyttiseen aineeseen.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että trombolyyttinen aine on: kudosplasminogeeniaktivaattori (TPA), urokinaasi, streptokinaasi, prourokinaasi, anisoyloitu plasminogeeni/streptokinaasiaktivaattori-kompleksi (Eminase™), TPA-analogeja tai proteaasi.

14. Puhdistettu polypeptidi, joka soveltuu käytettäväksi kuvausaineen valmistamisessa, **tunnettu** siitä, että se on oleellisen vapaata muista ihmisperäisistä aineista, ja sillä on aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin N-terminaalisella fibriininsitomisalueella ja voi sitoutua fibriiniin, ja että sen molekyylipaino on yli noin 6 kD mutta alle noin 20 kD ja sillä on aminohapposekvenssi gln-ala-gln-gln tai met-gln-ala-gln-gln polypeptidin N-terminaalisessa päässä.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen polypeptidi, **tunnettu** siitä, että polypeptidi on 12 kD polypeptidi tai 18,5 kD polypeptidi, jolla on kuviossa 2 esitetty aminohappojen 1 - 109 tai 1 - 154 vastaavasti aminohapposekvenssi.

16. Menetelmä 12 kD tai 18,5 kD polypeptidifragmentin tuottamiseksi, joka fragmentti vastaa aminohapposekvenssiä, joka on läsnä luonnollisesti esiintyvän ihmis-fibronektiinin N-terminaalisella fibriininsitomisalueella, **tunnettu** siitä, että Escherichia coli -solua, joka sisältää jonkin patenttivaatimuksen 6 - 8 mukaisen plasmidin, käsitellään niin, että DNA ohjaa polypeptidin ekspressiota ja solu ilmentää polypeptidiä, ja otetaan solusta talteen näin ekspressoitu polypeptidi.

17. Menetelmä patenttivaatimuksen 11 tai 16 mukaisella menetelmällä valmistetun polypeptidin uudelleen laskostamiseksi, **tunnettu** siitä, että polypeptidi saatetaan kosketukseen tiolia sisältävän yhdisteen kanssa ja disulfidin kanssa polypeptidin uudelleenlaskostamiseksi ja -hapettamiseksi.

18. Menetelmä patenttivaatimuksen 14 mukaisen puhdistetun, biologisesti aktiivisen polypeptidin talteenottamiseksi, **tunnettu** siitä, että:

(a) tuotetaan bakteerisolussa polypeptidiä koodittavan DNA:n sisältävän plasmidin avulla ensimmäinen polypeptidi, jolla on polypeptidin aminohapposekvenssi, mutta josta puuttuu disulfidisidos;

(b) rikotaan solu lysaatin tuottamiseksi, joka sisältää ensimmäisen polypeptidin;

(c) sentrifugoidaan lysaatti ensimmäisen polypeptidin konsentroimiseksi;

(d) erotetaan konsentroitu ensimmäinen polypeptidi;

(e) liuotetaan erotettu, konsentroitu ensimmäinen polypeptidi;

(f) uudelleenlaskostetaan ja uudelleenhapetetaan liuotettu ensimmäinen polypeptidi biologisesti aktiivisen polypeptidin muodostamiseksi;

(g) erotetaan uudelleenlaskostettu ja uudelleenhapetettu, biologisesti aktiivinen polypeptidi;

(h) otetaan talteen puhdistettu, uudelleenlaskostettu ja uudelleenhapetettu, biologisesti aktiivinen polypeptidi; ja

(i) puhdistetaan näin talteen saatu biologisesti aktiivinen polypeptidi.

**Patentkrav**

1. Kontrastmedel, **kännetecknat** av att det innehåller en polypeptid, som stämplats med ett spårämne som kan avbildas, varvid en dylik polypeptid har en aminosyrasekvens som är väsentligen identisk med den sekvens som är närvarande inom N-terminalens fibrinbindande område av naturligt förekommande fibronektin hos människa, varvid polypeptiden kan bindas vid fibrin, har en molekylvikt över ca 6 kD men under ca 20 kD, och som har aminosyrasekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln vid polypeptidens N-terminalände.

2. Kontrastmedel enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att peptidens molekylvikt är ca 12 kD eller över eller ca 18,5 kD eller under.

3. Medel enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att spårämnet är en radioaktiv isotop, ett spårelement som är osynligt för röntgenstrålar, eller en paramagnetisk jon, eller då spårämnet är en radioaktiv isotop är det valt i gruppen bestående av indium-111, teknetium-99m, jod-123, jod-125, jod-131, krypton-81m, xenon-133 och gallium-67.

4. Medel enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att polypeptiden är en 12 kD polypeptid eller 18,5 kD polypeptid, varvid den aminosyrasekvens som är väsentligen identisk med den sekvens som är närvarande inom det fibrinbindande området av fibronektin hos människa är sekvens 1-109 respektive 1-154 av aminosyrorna i figur 2.

5. Förfarande för att avbilda ett ämne innehållande fibrin, **kännetecknat** av att det fibrinhaltiga ämnet som skall avbildas sätts i kontakt med ett medel enligt något av patentkraven 1-4 under sådana förhållanden att medlet binds vid det fibrinhaltiga ämnet, och det bundna medlet avbildas och sålunda avbildas det fibrinhaltiga ämnet.

6. Plasmid för expression av polypeptid, som har en aminosyrasekvens som är väsentligen närvarande inom N-terminalens fibrinbindande område av naturligt förekommande fibronektin hos

människa, varvid polypeptiden kan bindas vid fibrin, har en molekylvikt över ca 6 kD men under ca 20 kD, och som har aminosyrasekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln vid polypeptidens N-terminalände, varvid plasmiden innehåller DNA som kodar polypeptid och DNA som kodar lämpliga reglerelement, vilka är belägna i förhållande till DNA som kodar polypeptid så att de åstadkommer expression av polypeptid i en lämplig värdcell.

7. Plasmid enligt patentkrav 6, **kännetecknad** av att polypeptiden är en ca 12 kD polypeptid eller en ca 18,5 kD polypeptid, som motsvarar en aminosyrasekvens som är närvarande inom det fibrinbindande området av fibronektin hos människa.

8. Plasmid enligt patentkrav 7, som betecknas med pFN 949-2 och deponerats i Escherichia coli-stammen A1645 med ATCC-deponeringsnummer 67831; betecknas pFN 196-2 och deponerats i Escherichia coli-stammen A4255 med ATCC-deponeringsnummer 68328; betecknas pFN 203-2 och deponerats i Escherichia coli-stammen A4255 med ATCC-deponeringsnummer 68606.

9. Cell innehållande en plasmid enligt något av patentkraven 6-8.

10. Escherichia coli-cell enligt patentkrav 9, **kännetecknad** av att plasmiden betecknas med pFN 949-2 och cellen deponerats med ATCC-deponeringsnummer 67831; eller plasmiden betecknas pFN 196-2 och cellen deponerats med ATCC-deponeringsnummer 68328.

11. Förfarande för att producera en polypeptid med en aminosyrasekvens som är väsentligen närvarande inom N-terminalens fibrinbindande område av naturligt förekommande fibronektin hos människa, varvid polypeptiden kan bindas vid fibrin, och har aminosyrasekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln vid polypeptidens N-terminalände, **kännetecknat** av att cellen enligt patentkrav 9 eller 10 behandlas så att DNA styr polypeptidens expression och cellen uttrycker polypeptid, och den sålunda uttryckta polypeptiden tas tillvara ur cellen.

12. Förfarande enligt patentkrav 11, **kännetecknat** av att det vidare innefattar bindning av polypeptid vid ett trombolytiskt ämne.

13. Förfarande enligt patentkrav 12, **kännetecknat** av att det trombolytiska ämnet är: en vävnadsplasminogenaktivator (TPA), urokinas, streptokinas, prourokinas, ett anisoyliserat plasminogen/streptokinasaktivator-komplex (Eminase™), TPA-analoger eller proteas.

14. Renad polypeptid som lämpar sig för användning vid framställning av ett kontrastmedel, **kännetecknad** av att den är väsentligen fri från övriga mänskliga ämnen, och den har en aminosyrasekvens som är väsentligen närvarande inom N-terminalens fibrinbindande område av naturligt förekommande fibronektin hos människa, och kan bindas vid fibrin, och har en molekylvikt över ca 6 kD men under ca 20 kD, och som har aminosyrasekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln vid polypeptidens N-terminalände.

15. Polypeptid enligt patentkrav 14, **kännetecknat** av att polypeptiden är en 12 kD polypeptid eller 18,5 kD polypeptid, som har aminosyrasekvensen hos aminosyror 1-109 respektive 1-154 i figur 2.

16. Förfarande för att producera ett 12 kD eller 18,5 kD polypeptidfragment som motsvarar en aminosyrasekvens som är närvarande inom N-terminalens fibrinbindande område av naturligt förekommande fibronektin hos människa, **kännetecknat** av att en Escherichia coli-cell, som innehåller en plasmid enligt något av patentkraven 6-8, behandlas så att DNA styr polypeptidens expression och cellen uttrycker polypeptid, och den sålunda uttryckta polypeptiden tas tillvara ur cellen.

17. Förfarande för omplissering av en polypeptid som framställts enligt förfarandet enligt patentkrav 11 eller 16, **kännetecknat** av att polypeptiden sätts i kontakt med en förening innehållande tiol och disulfid för omplissering och omoxidering av polypeptid.

18. Förfarande för att ta tillvara renad, biologiskt aktiv polypeptid enligt patentkrav 14, **kännetecknat** av att:

(a) med en plasmid innehållande DNA som kodar polypeptid i en bakteriecell produceras en första polypeptid som har polypeptidens aminosyrasekvens, men som saknar disulfidbindning;

(b) cellen bryts för att producera en lysat som innehåller den första polypeptiden;

(c) lysaten centrifugeras för att koncentrera den första polypeptiden;

(d) den koncentrerade första polypeptiden separeras;

(e) den separerade koncentrerade första polypeptiden upplöses;

(f) den lösta första polypeptiden omplisseras och omoxideras för att bilda en biologiskt aktiv polypeptid;

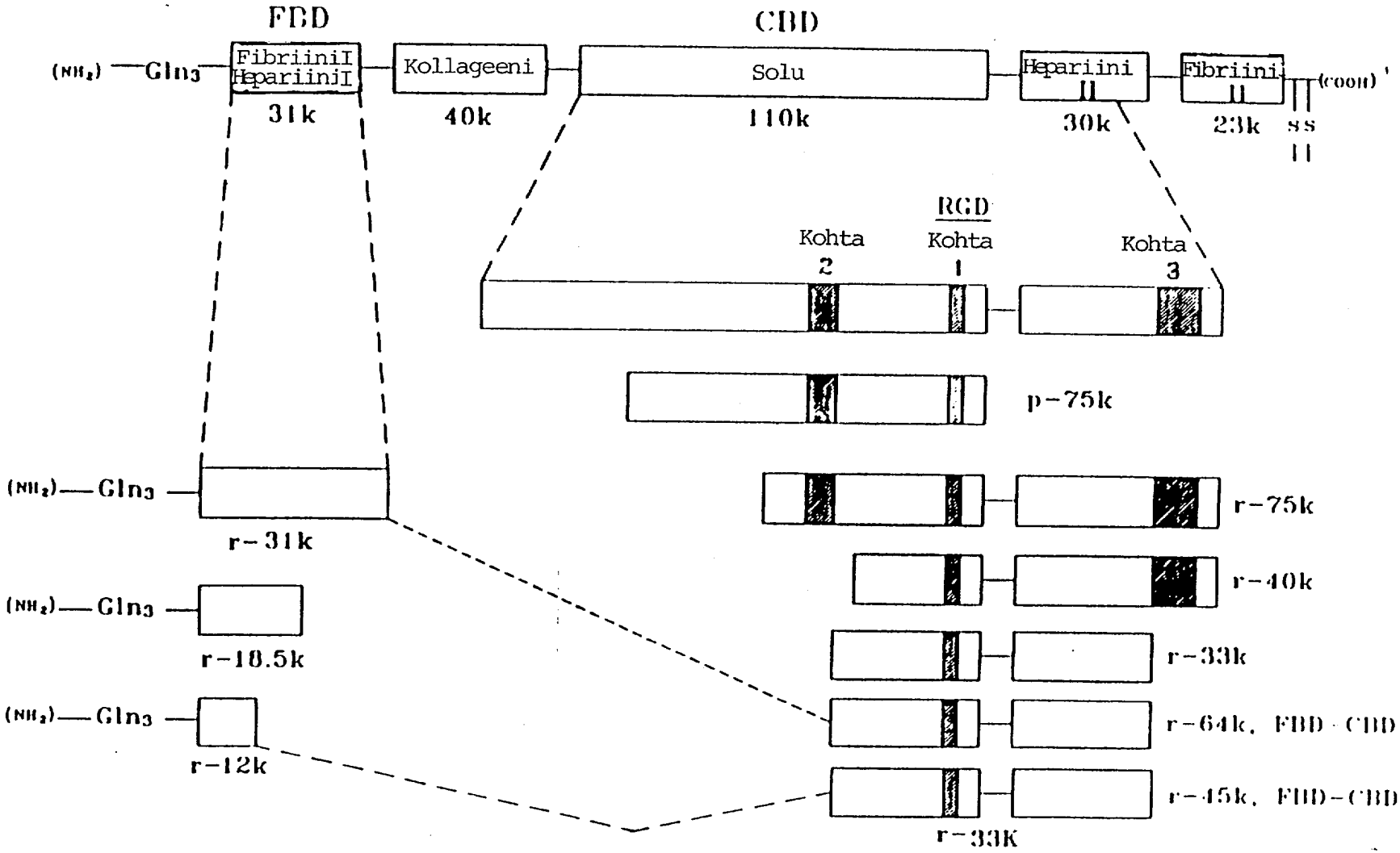
(g) den omplisserade och omoxiderade biologiskt aktiva polypeptiden separeras;

(h) den renade, omplisserade och omoxiderade biologiskt aktiva polypeptiden tas tillvara; och

(i) den sålunda tillvaratagna biologiskt aktiva polypeptiden renas.

14·01·93 92504

Figure 1






108298

Figure 2A

Ensimmäinen sekvenssinumero =

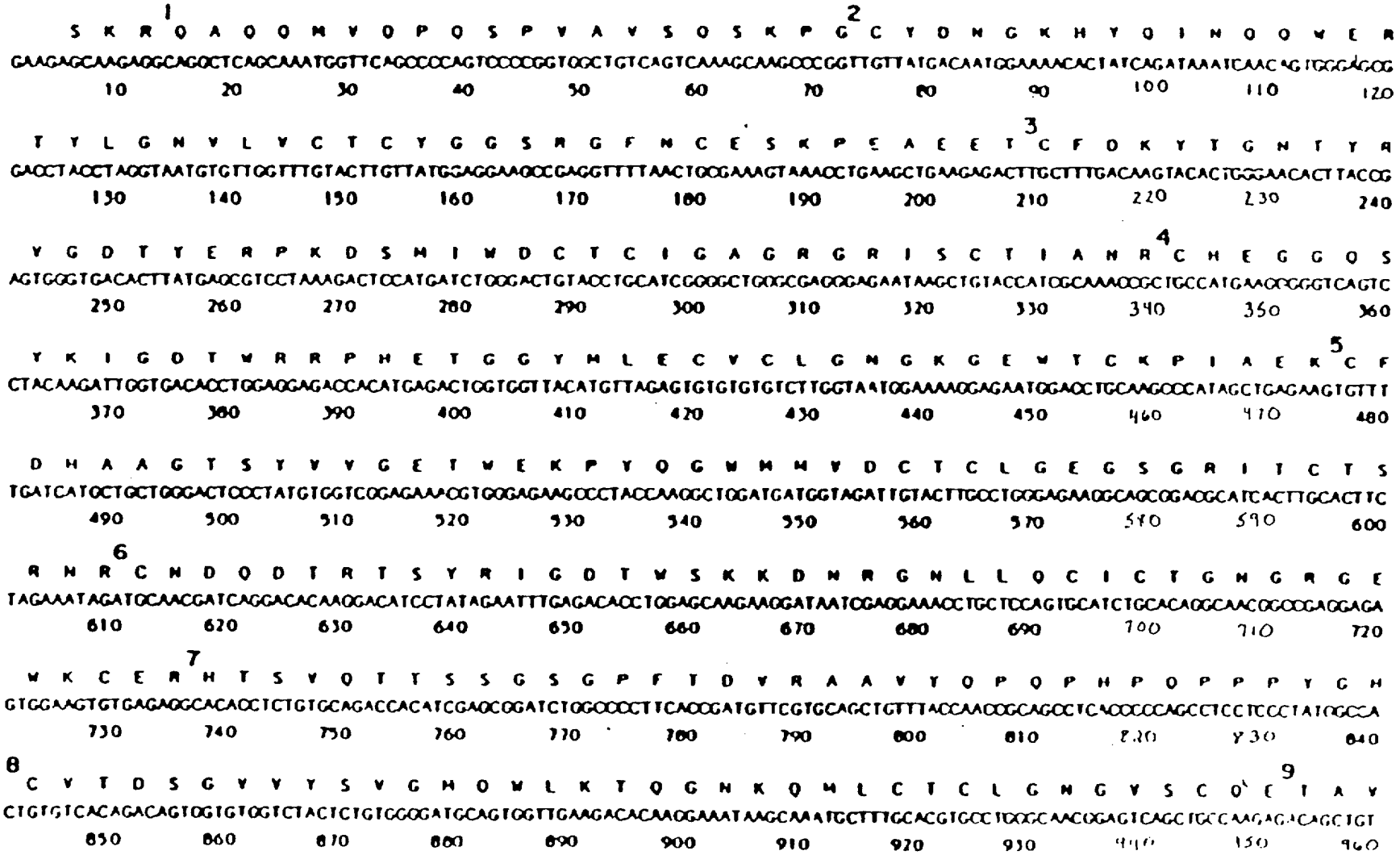


Figure 2B

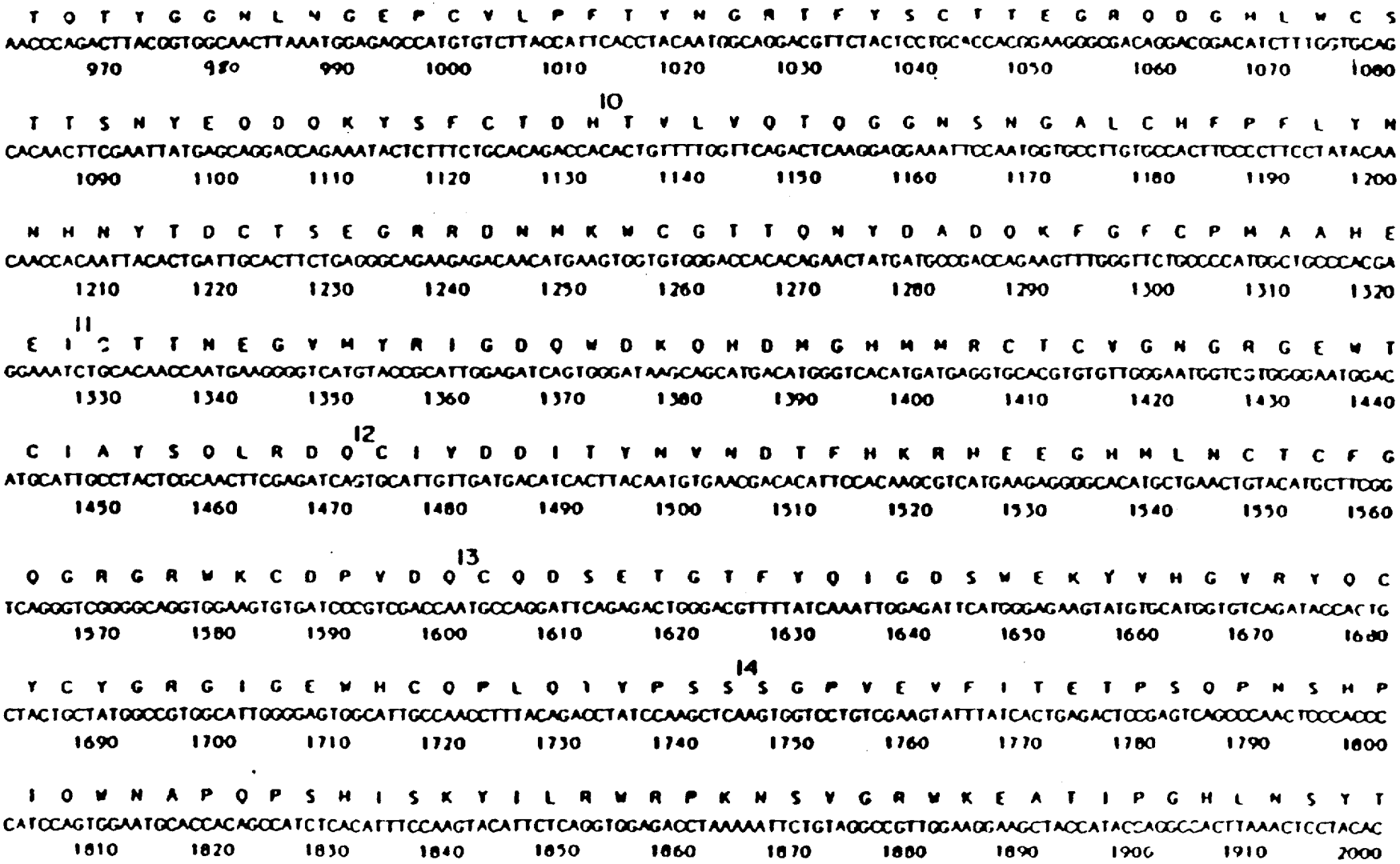

T Q T Y G G N L N G E P C V L P F T Y N G R T F Y S C T T E G R Q D G H L W C S
AACCCAGACTTACGGTGGCAACTTAAATGGAGAGCCATGTGTCTTACCATTCACCTACAATGGCAGGACGTTCTACTCCTGCACCACGGAAGGCGGACAGGACGGACATCTTTGGTGCAG
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
10
T T S N Y E Q D Q K Y S F C T D H T V L V Q T Q G G N S N G A L C H F P F L Y N
CACAACTTCGAATTATGAGCAGGACCAGAAATACTCTTTCTGCACAGACCACACTGTTTTGGTTCAGACTCAAGGAGGAAATTCCAATGGTGCCTTGTGCCACTTCCCCTTCCTATACAA
1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
N H N Y T D C T S E G R R D N M K W C G T T Q N Y D A D Q K F G F C P M A A H E
CAACCACAATTACACTGATTGCACTTCTGAGGGCAGAAGAGACAACATGAAGTGGTGTGGGACCACACAGAACTATGATGCCGACCAGAAGTTTGGGTTCTGCCCCATGGCTGCCCACGA
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
11
E I C T T N E G V M Y R I G D Q W D K Q H D M G H M M R C T C V G N G R G E W T
GGAAATCTGCACAACCAATGAAGGGGTCATGTACCGCATTGGAGATCAGTGGGATAAGCAGCATGACATGGGTCACATGATGAGGTGCACGTGTGTTGGGAATGGTCGTGGGGAATGGAC
1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
12
C I A Y S Q L R D Q C I Y D D I T Y N V N D T F H K R H E E G H M L N C T C F G
ATGCATTGCCTACTGCAACTTCGAGATCAGTGCATTGTTGATGACATCACTTACAATGTGAACGACACATTCCACAAGCGTCATGAAGAGGGGCACATGCTGAACTGTACATGCTTCGGG
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
13
Q G R G R W K C D P V D Q C Q D S E T G T F Y Q I G D S W E K Y V H G V R Y Q C
TCAGGGTCGGGGCAGGTGGAAGTGTGATCCCGTCGACCAATGCCAGGATTCAGAGACTGGGACGTTTTATCAAATTGGAGATTCATGGGAGAAGTATGTGCATGGTGTCAGATACCACTG
1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
14
Y C Y G R G I G E W H C Q P L Q T Y P S S S G P V E V F I T E T P S Q P N S H P
CTACTGCTATGGCCGTGGCATTGGGAGTGGCATTGCCAACCTTTACAGACCTATCCAAGCTCAAGTGGTCCTGTCGAAGTATTTATCACTGAGACTCCGAGTCAGCCCAACTCCCACCC
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
I Q W N A P Q P S H I S K Y I L R W R P K N S V G R W K E A T I P G H L N S Y I
CATCCAGTGGAATGCACCACAGCCATCTCACATTCCAAGTACATTCTCAGGTGGAGACCTAAAAATTCTGTAGGCCGTTGGAAGGAAGCTACCATACCAGGCCACTTAAACTCCTACAC
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 2000

Figure 2C

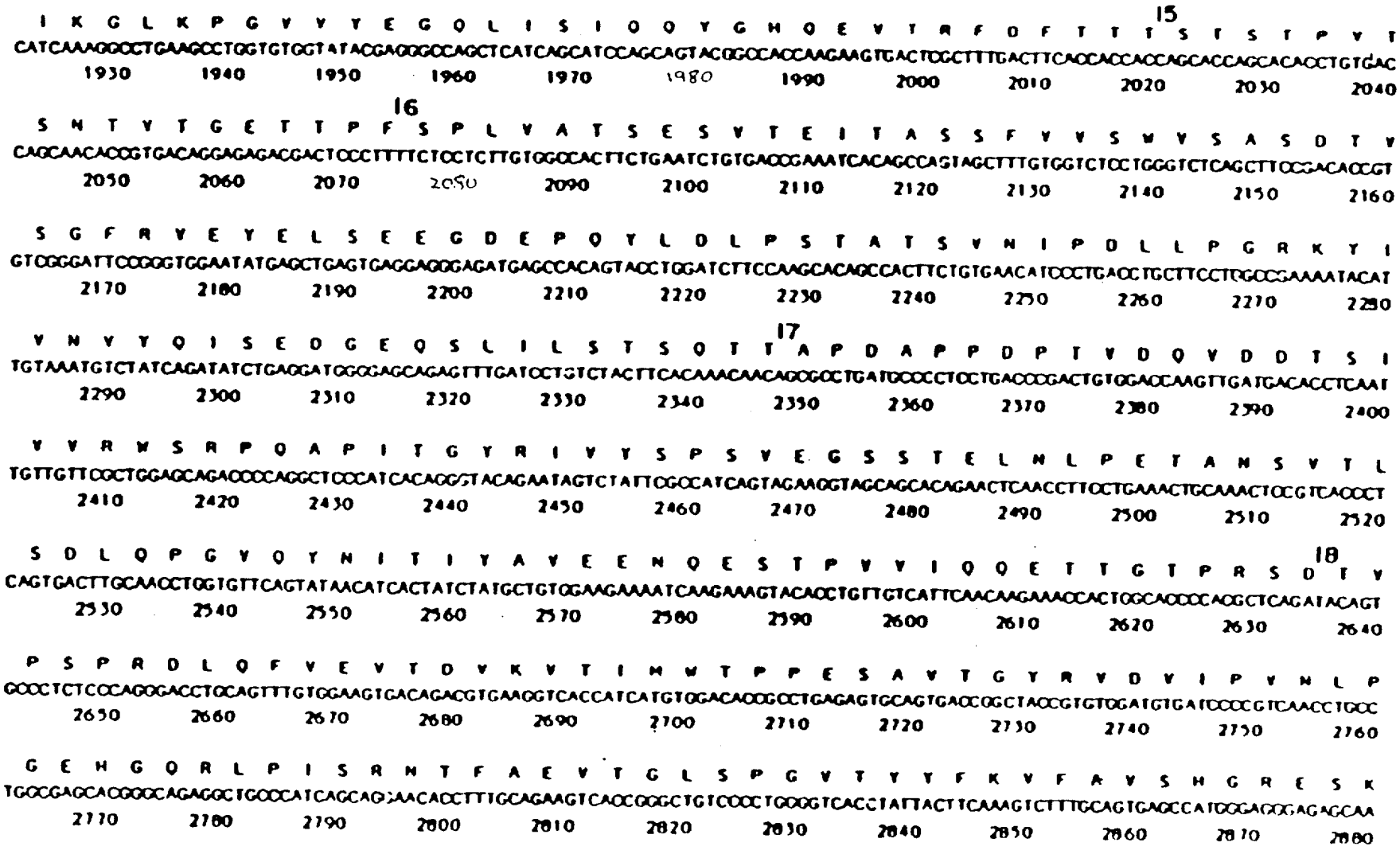


Figure 2D

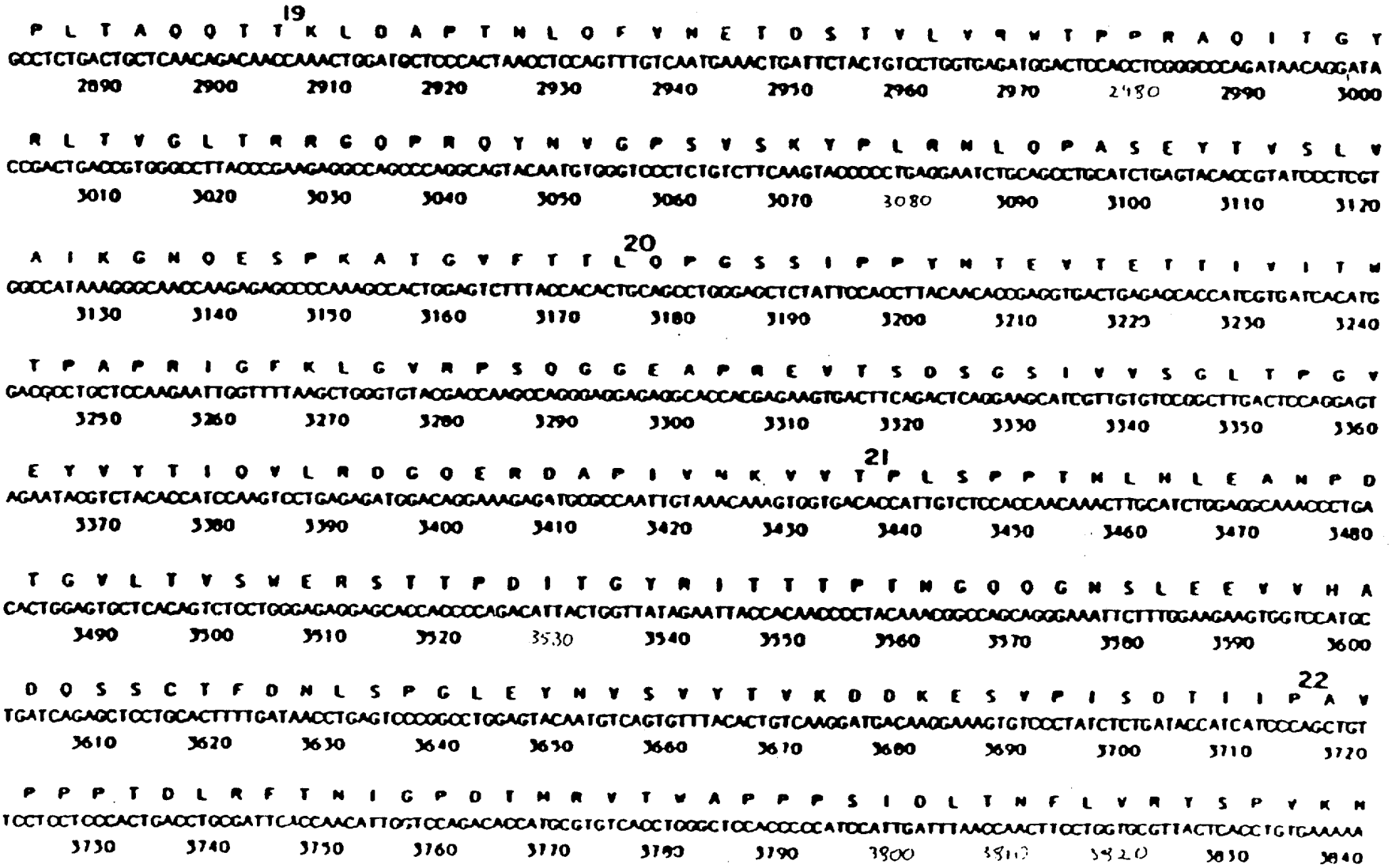

19
P L T A Q Q T T K L Q A P T N L Q F Y N E T D S T V L V Q W T P P R A Q I T G Y
GCCTCTGACTGCTCAACAGACAACCAAACTGGATGCTCCCACTAACCTCCAGTTTGTCAATGAAACTGATTCTACTGTCCTGGTGAGATGGACTCCACCTCGGGCCCAGATAACAGGATA
2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
R L T Y G L T R R G Q P R Q Y N V G P S V S K Y P L R N L Q P A S E Y T V S L V
CCGACTGACCGTGGGCCTTACCCGAAGAGGCCAGCCCAGGCAGTACAATGTGGGTCCCTCTGTCTTCAAGTACCCCCTGAGGAATCTGCAGCCTGCATCTGAGTACACCGTATCCCTCGT
3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
20
A I K G N Q E S P K A T G Y F T T L Q P G S S I P P Y N T E Y T E T T I V I T M
GGCCATAAAGGGCAACCAAGAGAGCCCCAAAGCCACTGGAGTCTTTACCACACTGCAGCCTGGAGCTCTATTCCACCTTACAACACCGAGGTGACTGAGACCACCATCGTGATCACATG
3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
T P A P R I G F K L G V R P S Q G G E A P R E Y T S Q S G S I V Y S G L T P G V
GACGCCTGCTCCAAGAATTGGTTTTAAGCTGGTGTACGACCAAGCCAGGGAGGAGAGGCACCACGAGAAGTGACTTCAGACTCAGGAAGCATCGTTGTGTCCGGCTTGACTCCAGGAGT
3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
21
E Y V Y T I Q V L R D G Q E R D A P I V N K V V T P L S P P T N L H L E A N P D
AGAATACGTCTACACCATCCAAGTCCTGAGAGATGGACAGGAAAGAGATGGGCCAATTGTAAACAAAGTGGTGACACCATTGTCTCCACCAACAAACTTGCATCTGGAGGCAAACCCTGA
3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480
T G V L T V S W E R S T T P D I T G Y R I T T T P T N G Q Q G N S L E E V V H A
CACTGGAGTGCTCACAGTCTCCTGGGAGAGGAGCACCACCCCAGACATTACTGGTTATAGAATTACCACAACCCCTACAAACGGCCAGCAGGGAAATTCTTTGGAAGAAGTGGTCCATGC
3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
22
D Q S S C T F D N L S P G L E Y N V S V Y T V K D D K E S V P I S D T I I P A V
TGATCAGAGCTCCTGCACTTTTGATAACCTGAGTCCCGGCCTGGAGTACAATGTCAGTGTTTACACTGTCAAGGATGACAAGGAAAGTGTCCCTATCTCTGATACCATCATCCCAGCTGT
3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720
P P P T D L R F T N I G P D T M R V T W A P P P S I D L T N F L V R Y S P V K N
TCCTCCTCCCACTGACCTGCGATTCACCAACATTGGTCCAGACACCATGCGTGTCACCTGGGCTCCACCCCCATCCATTGATTTAACCAACTTCCTGGTGCGTTACTCACCTGTGAAAAA
3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840

Figure 2E

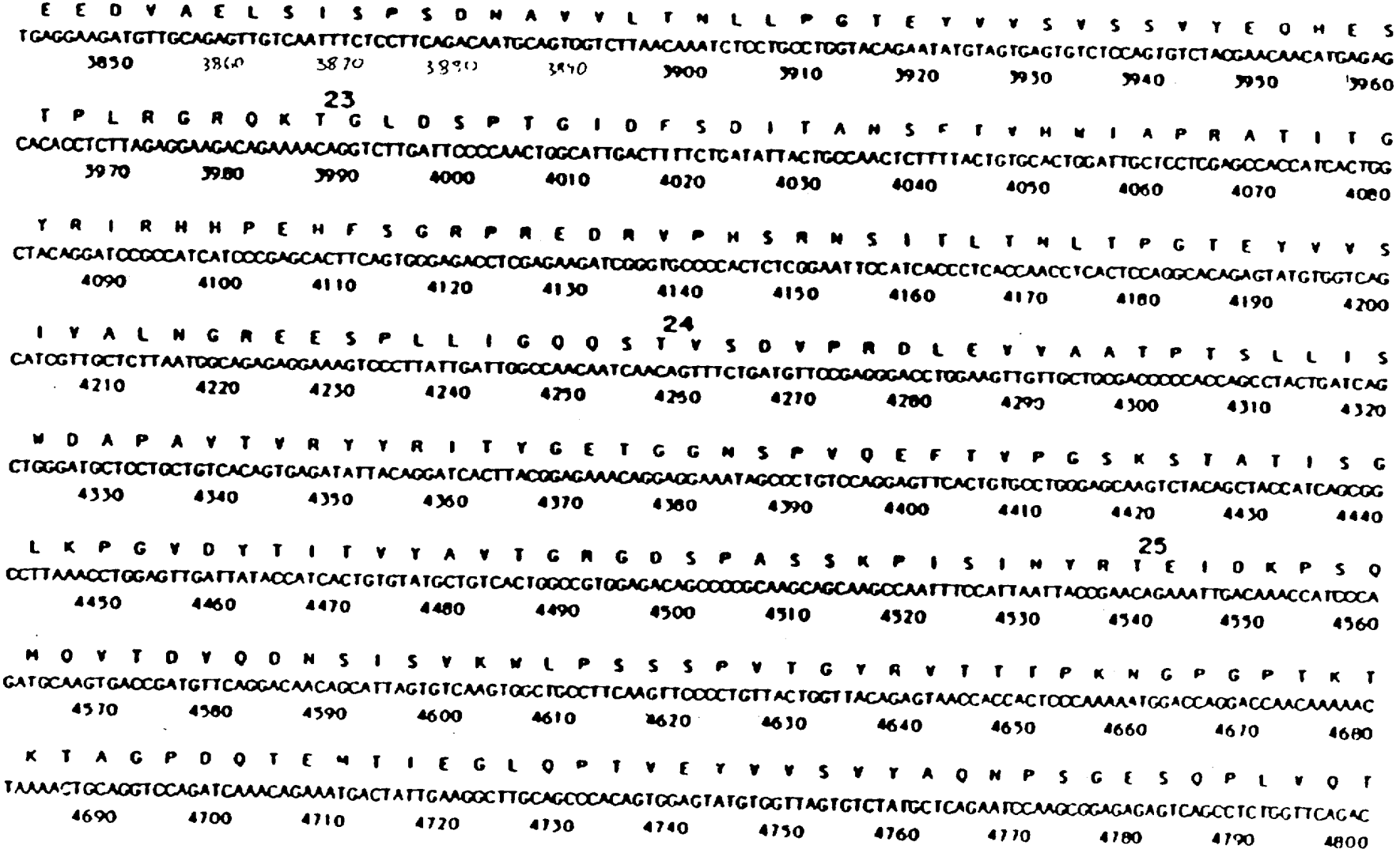

E E D V A E L S I S P S D N A V V L T N L L P G T E Y V V S V S S V Y E Q M E S
TGAGGAAGATGTTGCAGAGTTGTCAATTTCTCCTTCAGACAATGCAGTGGTCTTAACAAATCTCCTGCCTGGTACAGAATATGTAGTGAGTGTCTCCAGTGTCTACGAACAACATGAGAG
3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960
23
T P L R G R Q K T G L D S P T G I D F S D I T A N S F T V H W I A P R A T I T G
CACACCTCTTAGAGGAAGACAGAAAACAGGTCTTGATTCCCCAACTGGCATTGACTTTTCTGATATTACTGCCAACTCTTTTACTGTGCACTGGATTGCTCCTCGAGCCACCATCACTGG
3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080
Y R I R H H P E H F S G R P R E D R V P H S R N S I T L T N L T P G T E Y V V S
CTACAGGATCCGCCATCATCCCGAGCACTTCAGTGGGAGACCTGGAGAAGATCGGGTGCCCCACTCTCCGAATTCCATCACCCTCACCAACCTCACTCCAGGCACAGAGTATGTGGTCAG
4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
24
I V A L N G R E E S P L L I G Q Q S T V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S
CATCGTTGCTCTTAATGGCAGAGAGGAAAGTCCCTTATTGATTGGCCAACAATCAACAGTTTCTGATGTTCCGAGGGACCTGGAAGTTGTTGCTGCGACCCCCACCAGCCTACTGATCAG
4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320
M D A P A V T V R Y Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G
CTGGGATGCTCCTGCTGTCACAGTGAGATATTACAGGATCACTTACGGAGAAACAGGAGGAAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGGAGCAAGTCTACAGCTACCATCAGCGG
4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440
25
L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T E I D K P S Q
CCTTAAACCTGGAGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCCGTGGAGACAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGAACAGAAATTGACAAACCATCCCA
4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560
M Q V T D V Q D N S I S V K W L P S S S P V T G Y R V T T T P K N G P G P T K T
GATGCAAGTGACCGATGTTCAGGACAACAGCATTAGTGTCAAGTGGCTGCCTTCAAGTTCCCCTGTTACTGGTTACAGAGTAACCACCACTCCCAAAAATGGACCAGGACCAACAAAAAC
4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680
K T A G P D Q T E M T I E G L Q P T V E Y V V S V Y A Q N P S G E S Q P L V Q T
TAAAACTGCAGGTCCAGATCAAACAGAAATGACTATTGAAGGCTTGCAGCCCACAGTGGAGTATGTGGTTAGTGTCTATGCTCAGAATCCAAGCGGAGAGAGTCAGCCTCTGGTTCAGAC
4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800

Figure 2F

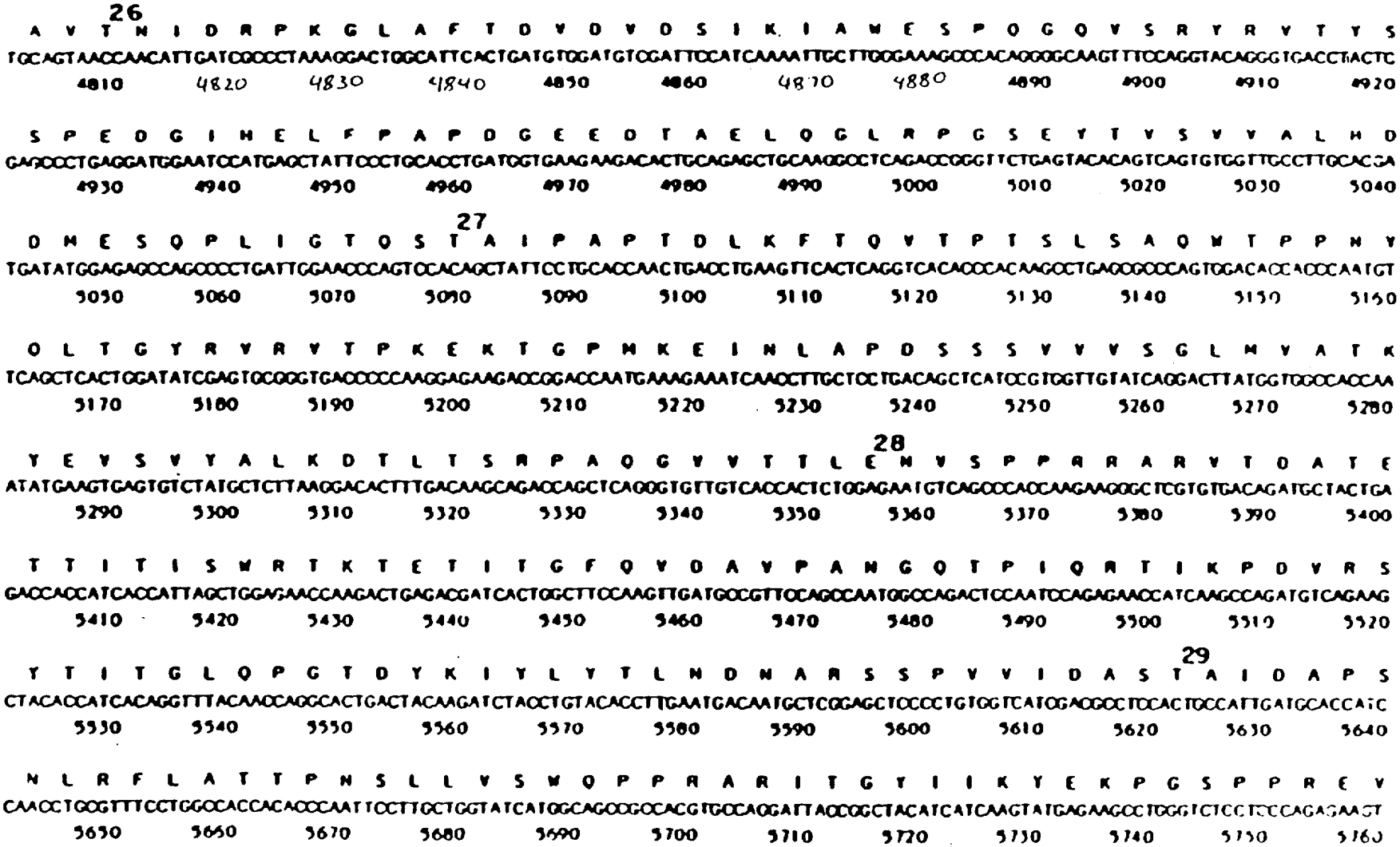

26
A V T N I D R P K G L A F T D V D V D S I K I A M E S P Q G Q V S R Y R V T Y S
TGCAGTAACCAACATTGATCGCCCTAAAGGACTGGCATTCACTGATGTGGATGTCGATTCCATCAAAATTGCTTGGGAAAGCCCACAGGGCAAGTTTCCAGGTACAGGGTGACCTACTC
4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920
S P E D G I H E L F P A P D G E E D T A E L Q G L R P G S E Y T V S V V A L H D
GAGCCCTGAGGATGGAATCCATGAGCTATTCCCTGCACCTGATGGTGAAGAAGACACTGCAGAGCTGCAAGGCCTCAGACCGGGTTCTGAGTACACAGTCAGTGTGGTTGCCTTGCACGA
4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040
27
D M E S Q P L I G T Q S T A I P A P T D L K F T Q V T P T S L S A Q W T P P M Y
TGATATGGAGAGCCAGCCCCTGATTGGAACCCAGTCCACAGCTATTCCTGCACCAACTGACCTGAAGTTCACTCAGGTCACACCCACAAGCCTGAGCGCCCAGTGGACACCACCCAATGT
5050 5060 5070 5090 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160
Q L T G Y R V R V T P K E K T G P M K E I N L A P D S S S V V V S G L M V A T K
TCAGCTCACTGGATATCGAGTGCGGGTGACCCCCAAGGAGAAGACCGGACCAATGAAAGAAATCAACCTTGCTCCTGACAGCTCATCCGTGGTTGTATCAGGACTTATGGTGGCCACCAA
5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280
28
Y E V S V Y A L K D T L T S R P A Q G V V T T L E N V S P P R R A R V T D A T E
ATATGAAGTGAGTGTCTATGCTCTTAAGGACACTTTGACAAGCAGACCAGCTCAGGGTGTTGTCACCACTCTGGAGAATGTCAGCCCACCAAGAAGGGCTCGTGTGACAGATGCTACTGA
5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
T T I T I S W R T K T E T I T G F Q V D A V P A N G Q T P I Q R T I K P D V R S
GACCACCATCACCATTAGCTGGAGAACCAAGACTGAGACGATCACTGGCTTCCAAGTTGATGCCGTTCCAGCCAATGGCCAGACTCCAATCCAGAGAACCATCAAGCCAGATGTCAGAAG
5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520
29
Y T I T G L Q P G T D Y K I Y L Y T L N D N A R S S P V V I D A S T A I D A P S
CTACACCATCACAGGTTTACAACCAGGCACTGACTACAAGATCTACCTGTACACCTTGAATGACAATGCTCGGAGCTCCCCTGTGGTCATCGACGCCTCCACTGCCATTGATGCACCATC
5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640
N L R F L A T T P N S L L V S W Q P P R A R I T G Y I I K Y E K P G S P P R E V
CAACCTGCGTTTCCTGGCCACCACACCCAATTCCTTGCTGGTATCATCGCAGCCGCCACGTGCCAGGATTACCGCTACATCATCAAGTATGAGAAGCCTGGGTCTCCTCCCAGAGAAGT
5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760

Figure 2G

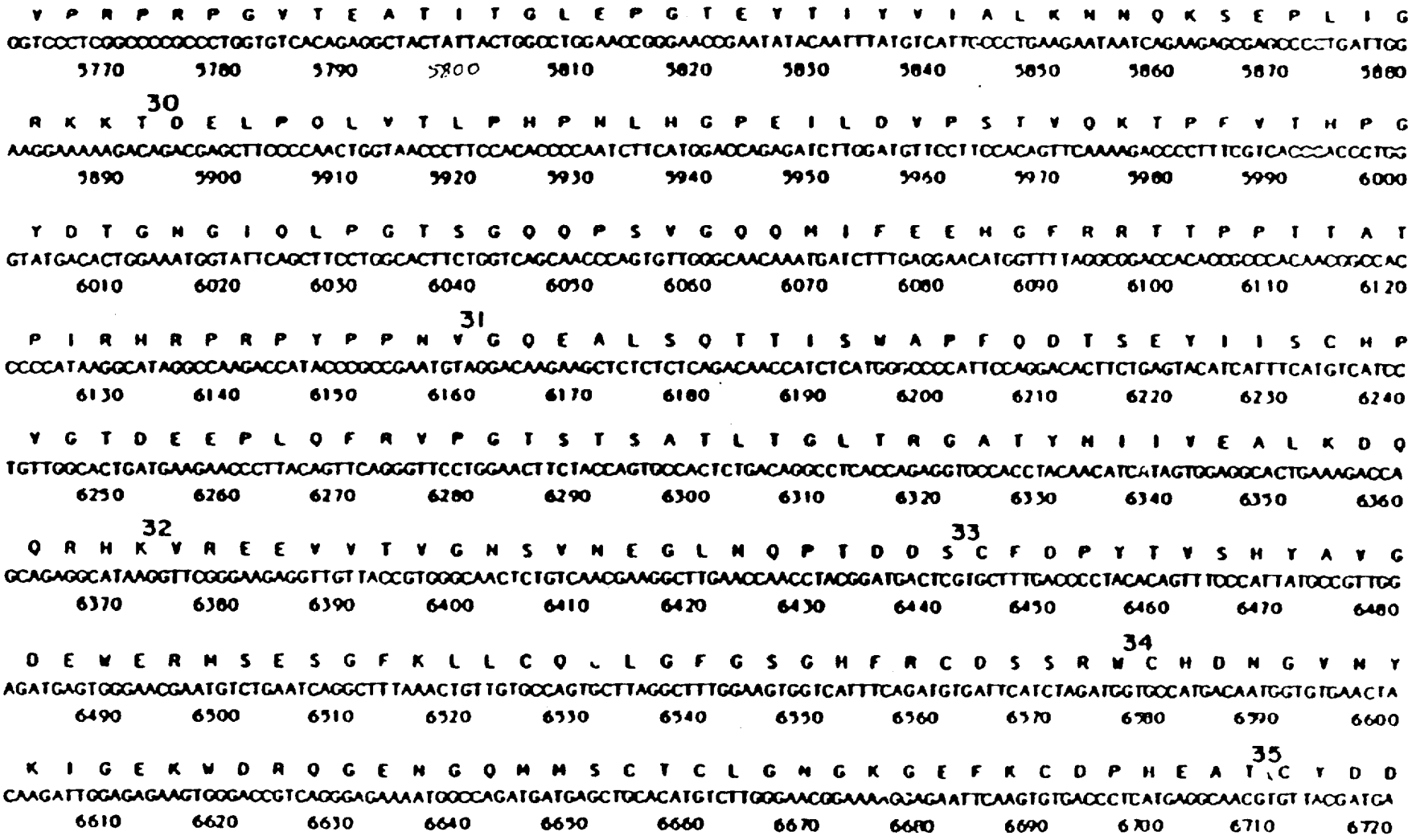

V P R P R P G V T E A T I T G L E P G T E Y T I Y V I A L K N N Q K S E P L I G
GGTCCCTCGGCCCCCCCCTGGTGTCACAGAGGCTACTATTACTGGCTGGAACCGGGAACCGAATATACAATTTATGTCATTGCCCTGAAGAATAATCAGAAGAGCGAGCCCCTGATTGG
5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880
30
R K K T D E L P Q L V T L P H P N L H G P E I L D V P S T V Q K T P F V T H P G
AAGGAAAAAGACAGACGAGCTTCCCCAACTGGTAACCCTTCCACACCCCAATCTTCATGGACCAGAGATCTTGGATGTTCCTTCCACAGTTCAAAGACCCCTTTCGTCACCCACCCTGG
5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000
Y D T G N G I Q L P G T S G Q Q P S V G Q Q M I F E E H G F R R T T P P T T A T
GTATGACACTGGAAATGGTATTCAGCTTCCTGGCACTTCTGGTCAGCAACCCAGTGTTGGCAACAAATGATCTTTGAGGAACATGGTTTTAGGCGGACCACACGGCCCACAACGGCCAC
6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120
31
P I R H R P R P Y P P N V G Q E A L S Q T T I S W A P F Q D T S E Y I I S C H P
CCCCATAAGGCATAGGCCAAGACCATACCCGGCCGAATGTAGGACAAGAAGCTCTCTCTCAGACAACCATCTCATGGTCCCCATTCCAGGACACTTCTGAGTACATCATTTCATGTCATCC
6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240
Y G T D E E P L Q F R V P G T S T S A T L T G L T R G A T Y N I I V E A L K D Q
TGTTGGCACTGATGAAGAACCCTTACAGTTCAGGGTTCCTGGAACTTCTACCAGTGGCACTCTGACAGGCCTCACCAGAGGTGGCACCTACAACATCATAGTGGAGGCACTGAAAGACCA
6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360
32
33
Q R H K V R E E V V T V G N S V N E G L N Q P T D D S C F D P Y T V S H Y A V G
GCAGAGGCATAAGGTTCGGGAAGAGGTTGTTACCGTGGGCAACTCTGTCAACGAAGGCTTGAACCAACCTACGGATGACTCGTGCTTTGACCCTACACAGTTTGCCATTATGCCGTTGG
6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480
34
D E W E R M S E S G F K L L C Q L G F G S G H F R C D S S R W C H D N G V N Y
AGATGAGTGGGAACGAATGTCTGAATCAGGCTTTAAACTGTTGTGCCAGTGCTTAGGCTTTGGAAGTGGTCATTTCAGATGTGATTCATCTAGATGGTGCCATGACAATGGTGTGAACTA
6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600
35
K I G E K W D R Q G E N G Q M M S C T C L G N G K G E F K C D P H E A T C Y D D
CAAGATTGGAGAGAAGTGGGACCGTCAGGGAGAAAATGGCCAGATGATGAGCTGCACATGTCTTGGGAACGGAAAGGGAGAATTCAAGTGTGACCCTCATGAGGCAACGTGTTACGATGA
6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720

Figure 2H

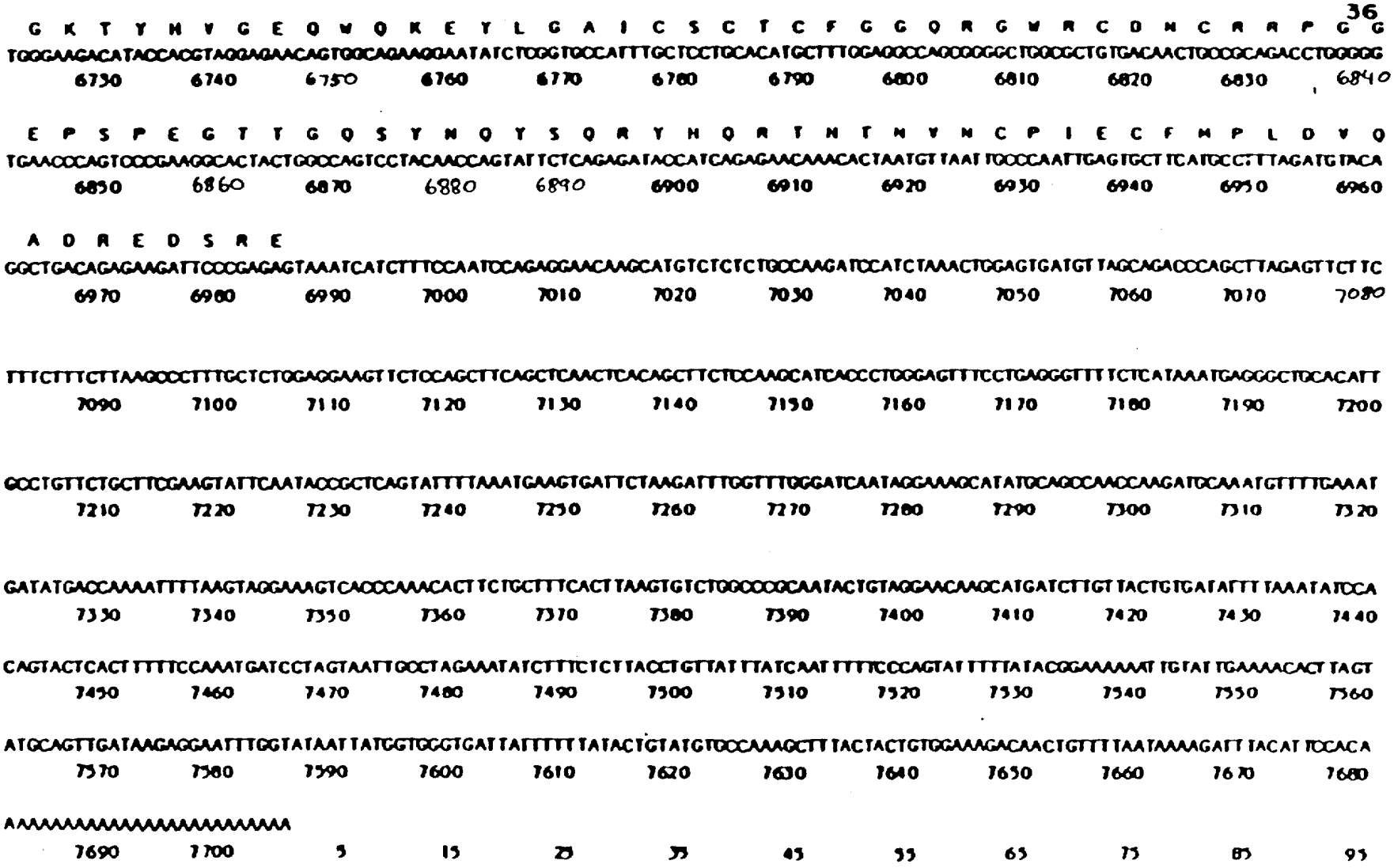

G K T Y H V G E Q W Q K E Y L G A I C S C T C F G G Q R G W R C D N C R R P G G
TGGGAAGACATACCACGTAGGAGAACAGTGGCAGAAGGAATATCTGGGTGCCATTTGCTCCTGCACATGCTTTGGAGGCCAGGGGGGCTGGGGCTGTGACAACTGCCGCAGACCTGGGGG
6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840
E P S P E G T T G Q S Y N Q Y S Q R Y H Q R T N T N V N C P I E C F M P L D V Q
TGAACCCAGTCCCGAAGGCACTACTGGCCAGTCCTACAACCAGTATTCTCAGAGATACCATCAGAGAACAAACACTAATGTTAATTGCCCAATTGAGTGCTTCATGCCTTTAGATGTACA
6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960
A D R E D S R E
GGCTGACAGAGAAGATTCCCGAGAGTAAATCATCTTTCCAATCCAGAGGAACAAGCATGTCTCTCTGCCAAGATCCATCTAAACTGGAGTGATGTTAGCAGACCCAGCTTAGAGTTCTTC
6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080
TTTCTTTCTTAAGCCCTTTGCTCTGGAGGAAGTTCTCCAGCTTCAGCTCAACTCACAGCTTCTCCAAGCATCACCCTGGGAGTTTCCTGAGGGTTTTCTCATAAATGAGGGCTGCACATT
7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
GCCTGTTCTGCTTCGAAGTATTCAATACCGCTCAGTATTTTAAATGAAGTGATTCTAAGATTTGGTTTGGGATCAATAGGAAAGCATATGCAGCCAACCAAGATGCAAATGTTTTGAAAT
7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320
GATATGACCAAAATTTTAAGTAGGAAAGTCACCCAAACACTTCTGCTTTCACTTAAGTGTCTGGCCCGCAATACTGTAGGAACAAGCATGATCTTGTTACTGTGATATTTTAAATATCCA
7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440
CAGTACTCACTTTTTCCAAATGATCCTAGTAATTGCCTAGAAATATCTTTCTCTTACCTGTTATTTATCAATTTTTCCCAGTATTTTTATACGGAAAAAATTGTATTGAAAACACTTAGT
7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560
ATGCAGTTGATAAGAGGAATTTGGTATAATTATGGTGGGTGATTATTTTTTATACTGTATGTGCCAAAGCTTTACTACTGTGGAAAGACAACTGTTTTAATAAAAGATTTACATTCCACA
7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
7690 7700 5 15 25 35 45 55 65 75 85 95

Figure 2A

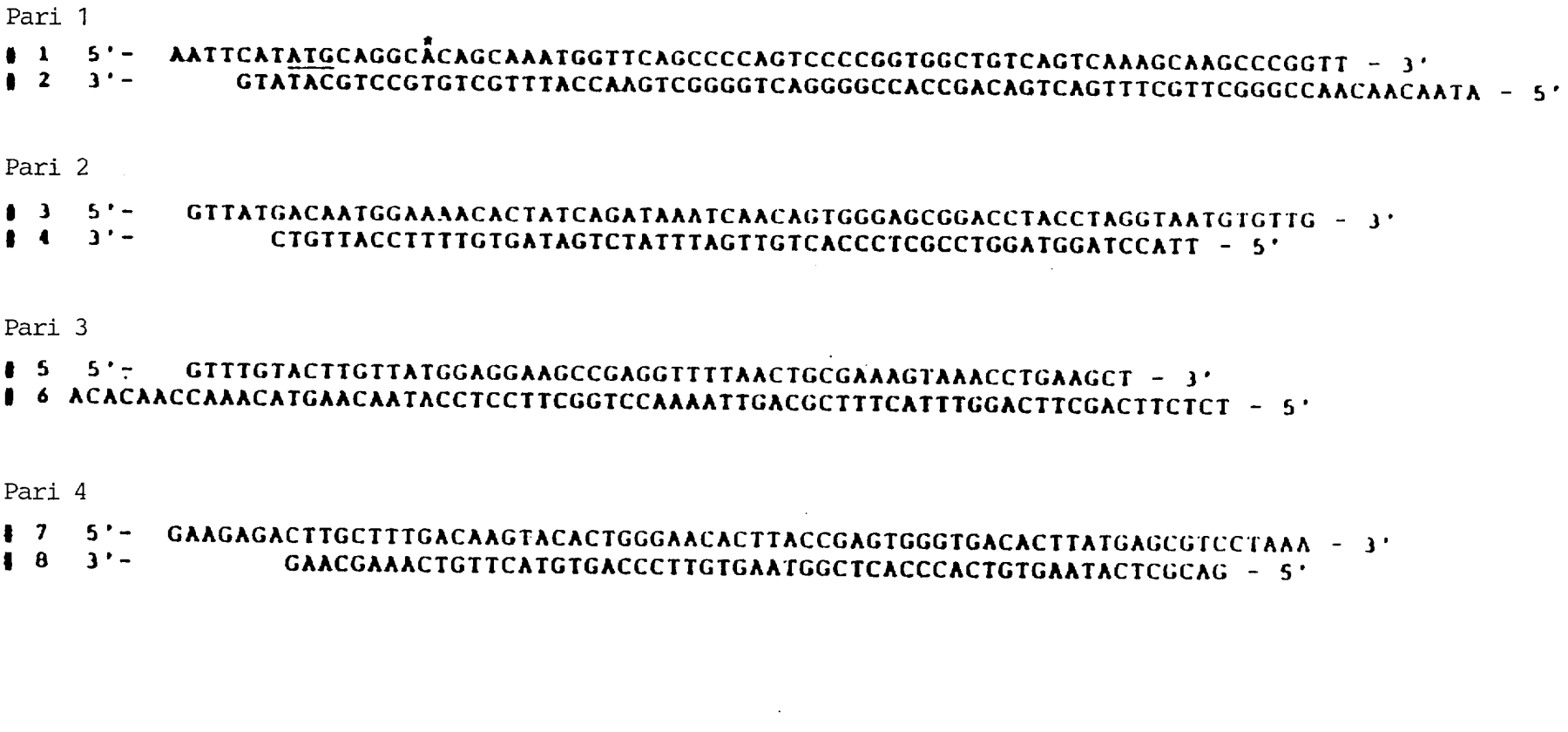

Pari 1
1 5'- AATTCATATGCAGGCACAGCAAATGGTTCAGCCCCAGTCCCCGGTGGCTGTCAGTCAAAGCAAGCCCGGTT - 3'
2 3'- GTATACGTCCGTGTCGTTTACCAAGTCGGGGTCAGGGGCCACCGACAGTCAGTTTCGTTCGGGCCAACAACAATA - 5'
Pari 2
3 5'- GTTATGACAATGGAAAACACTATCAGATAAATCAACAGTGGGAGCGGACCTACCTAGGTAATGTGTTG - 3'
4 3'- CTGTTACCTTTTGTGATAGTCTATTTAGTTGTCACCCTCGCCTGGATGGATCCATT - 5'
Pari 3
5 5'- GTTTGTACTTGTTATGGAGGAAGCCGAGGTTTTAACTGCGAAAGTAAACCTGAAGCT - 3'
6 ACACAACCAAACATGAACAATACCTCCTTCGGTCCAAAATTGACGCTTTCATTTGGACTTCGACTTCTCT - 5'
Pari 4
7 5'- GAAGAGACTTGCTTTGACAAGTACACTGGGAACACTTACCGAGTGGGTGACACTTATGAGCGTCCTAAA - 3'
8 3'- GAACGAAACTGTTCATGTGACCCTTGTGAATGGCTCACCCACTGTGAATACTCGCAG - 5'

Figure 3B

Pari 5

```
# 9   5'-  GACTCCATGATCTGGGACTGTACCTGCATCGGGGCTGGGCGAGGGAGAATAAGCTGTACC - 3'
#10   GATTTCTGAGGTACTAGACCCTGACATGGACGTAGCCCCGACCCGCTCCCTCTTATTC - 5'
```

Pari 6

```
#11   5'-      ATCGCCAACGCTGCCATGAAGGGGGTCAGTCCTACCAGATTGGTGACACCTGGAGGAGACCACATGAGACT - 3'
#12    GACATGGTAGCGTTTGCGACGGTACTTCCCCCAGTCAGGATGGTCTAACCACTGTGGACCTCCTCTGGTGTACTCTGACCACCAA - 5'
```

Pari 7

```
#13   5'-  GGTGGTTACATGTTAGAGTGTGTGTGTCTTGGTAATGGAAAAGGAGAATGGACCTGCAAGCCCATAGCTGAG - 3'
#14   3'-          TGTACAATCTCACACACACAGAACCATTACCTTTTCCTCTTACCTGGACGTTCGGGTATCGACTCCTAG - 5'
```



1008298

Figure 4

FN-geenin (emäsparit 14-472) synteesi

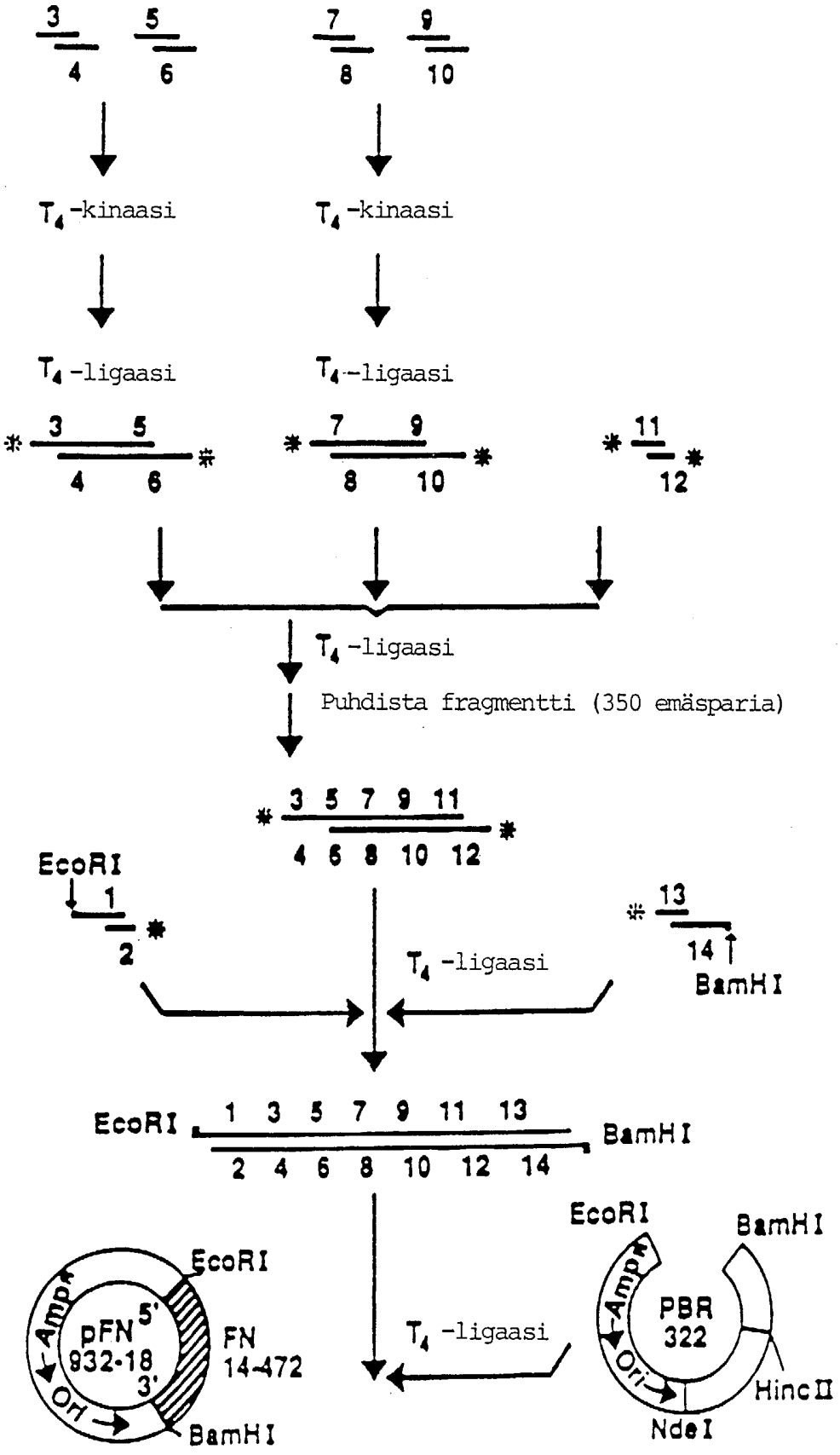


Figure 5

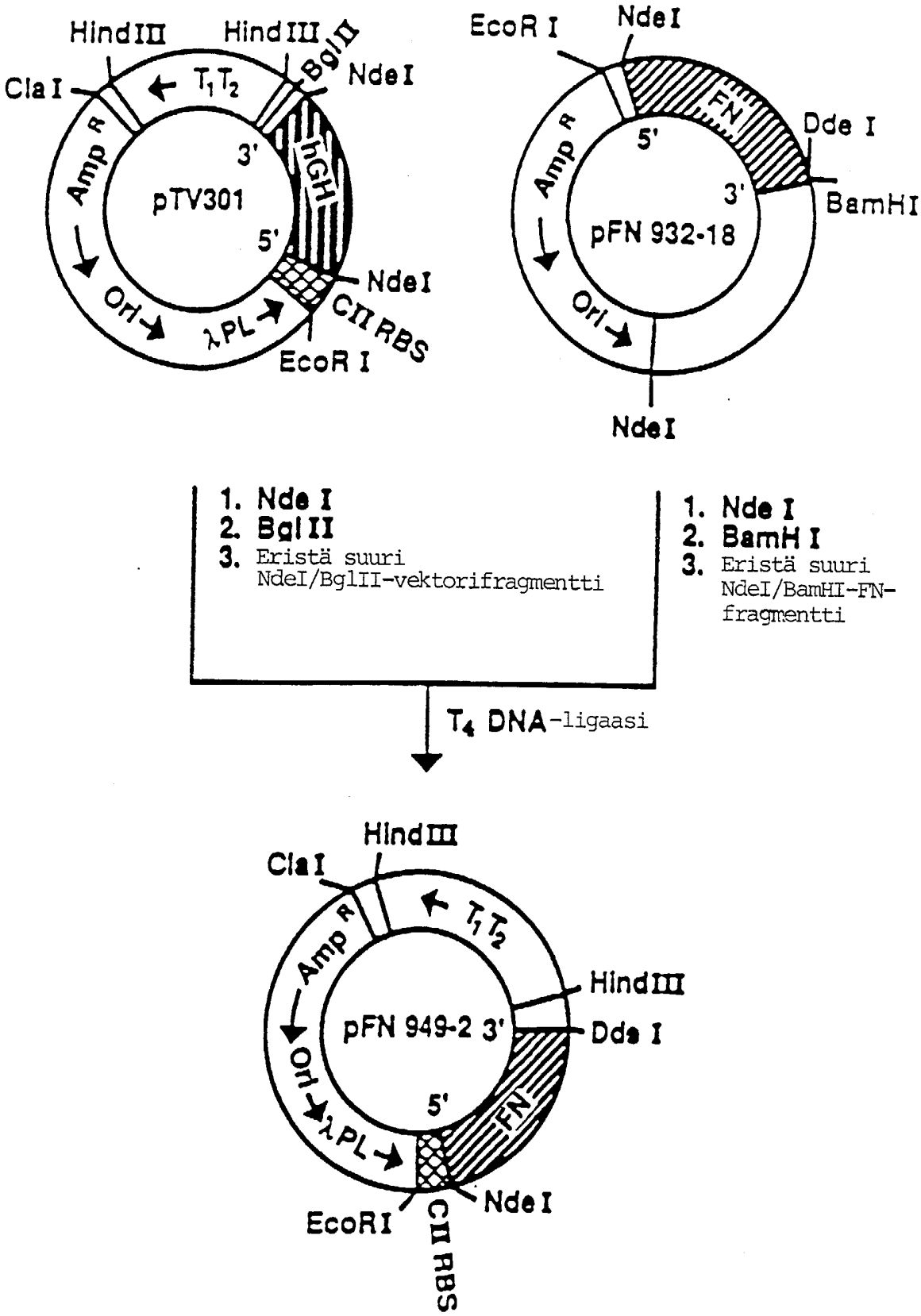

HindIII
HindIII
BglII
ClaI
T1T2
NdeI
Amp R
3'
pTV301
hGH
5'
NdeI
CII RBS
Ori
λPL
EcoR I
EcoR I
NdeI
FN
Dde I
5'
3'
BamHI
pFN 932-18
Ori
NdeI
1. Nde I
2. BglII
3. Eristä suuri NdeI/BglII-vektorifragmentti
1. Nde I
2. BamH I
3. Eristä suuri NdeI/BamHI-FN-fragmentti
T4 DNA-ligaasi
HindIII
ClaI
T1T2
Amp R
HindIII
pFN 949-2 3'
Dde I
5'
FN
Ori
λPL
NdeI
EcoRI
CII RBS

Figure 6

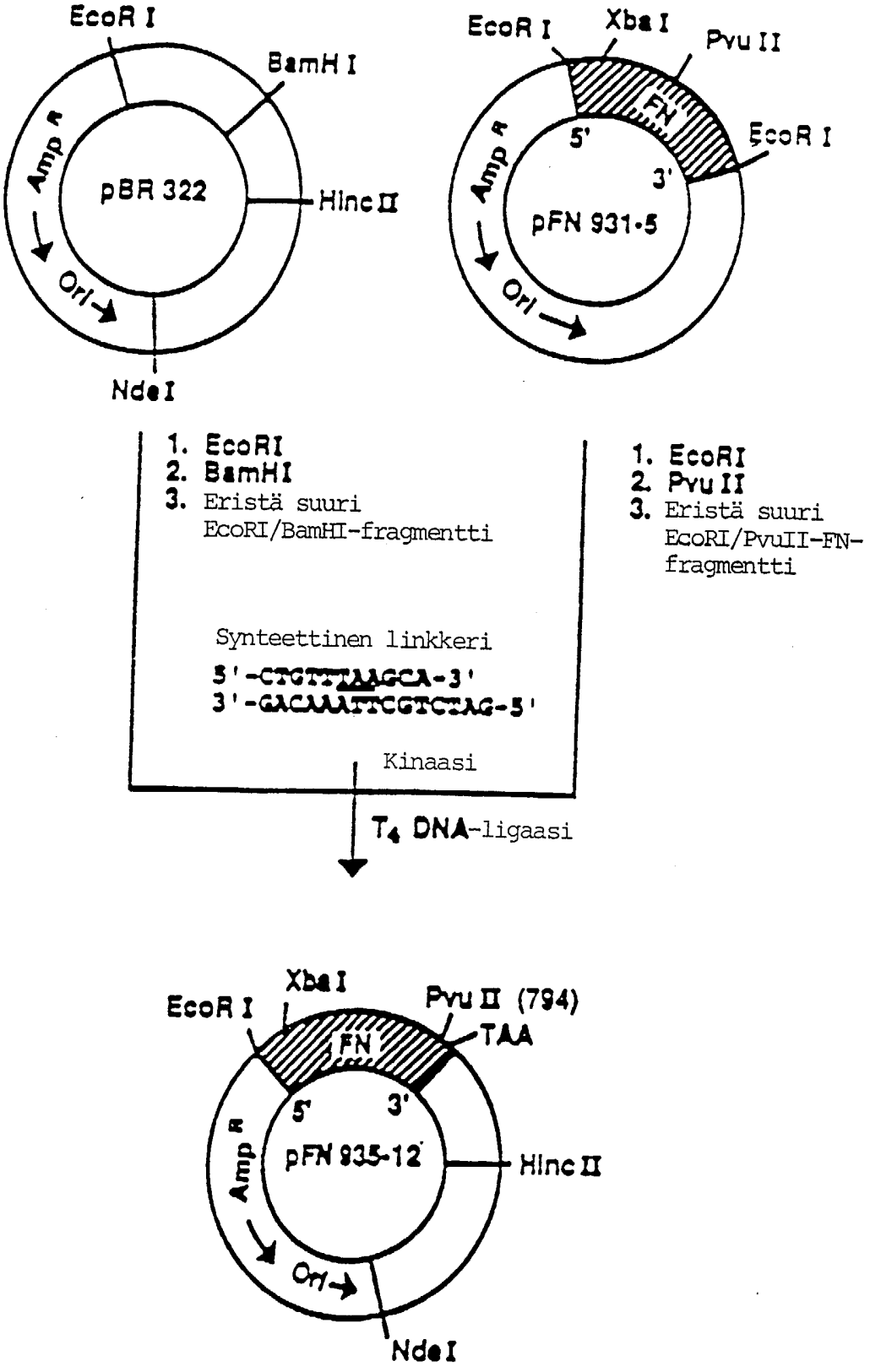

EcoR I
BamH I
Amp R
pBR 322
HincII
Ori
NdeI
EcoR I
Xba I
Pvu II
FN
5'
3'
EcoR I
Amp R
pFN 931-5
Ori
1. EcoRI
2. BamHI
3. Eristä suuri EcoRI/BamHI-fragmentti
1. EcoRI
2. Pvu II
3. Eristä suuri EcoRI/PvuII-FN-fragmentti
Synteettinen linkkeri
5'-CTGTTTAAGCA-3'
3'-GACAAATTCGTCTAG-5'
Kinaasi
T4 DNA-ligaasi
EcoR I
Xba I
Pvu II (794)
TAA
FN
5'
3'
Amp R
pFN 935-12
HincII
Ori
NdeI

Figure 7

Fibronektiinin ja 31-kD yhdistelmä-DNA-FBD:n
farmakokineettinen käyttäytyminen rotassa

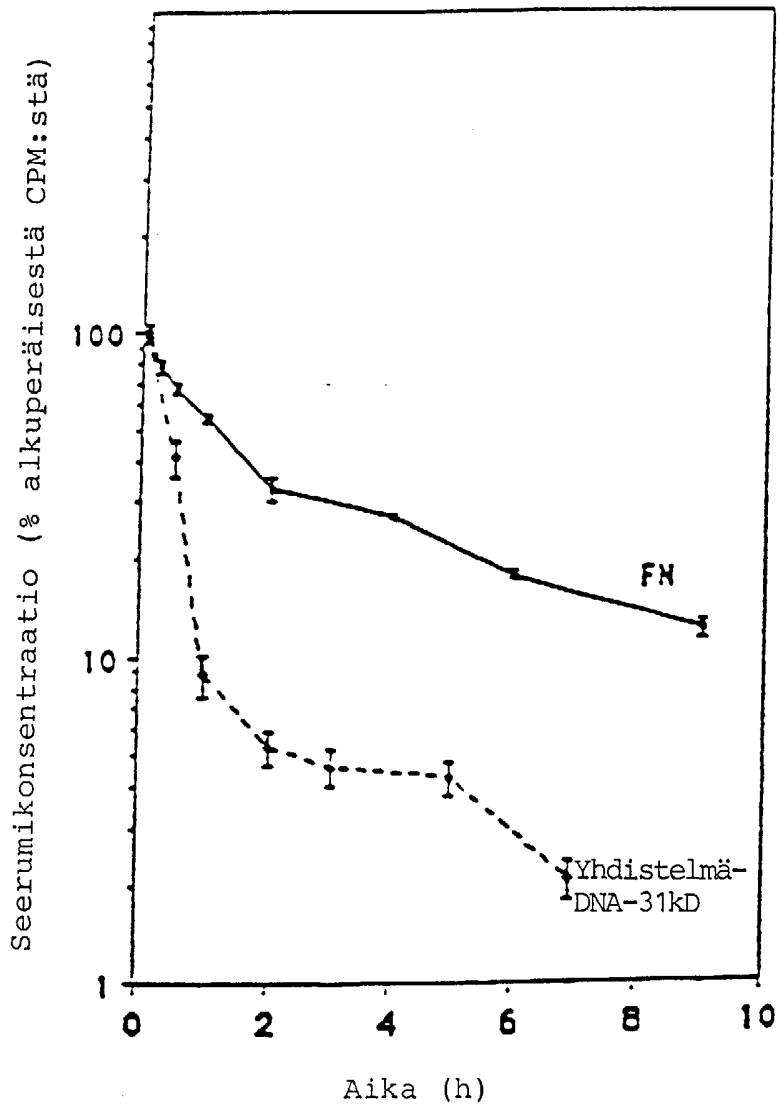
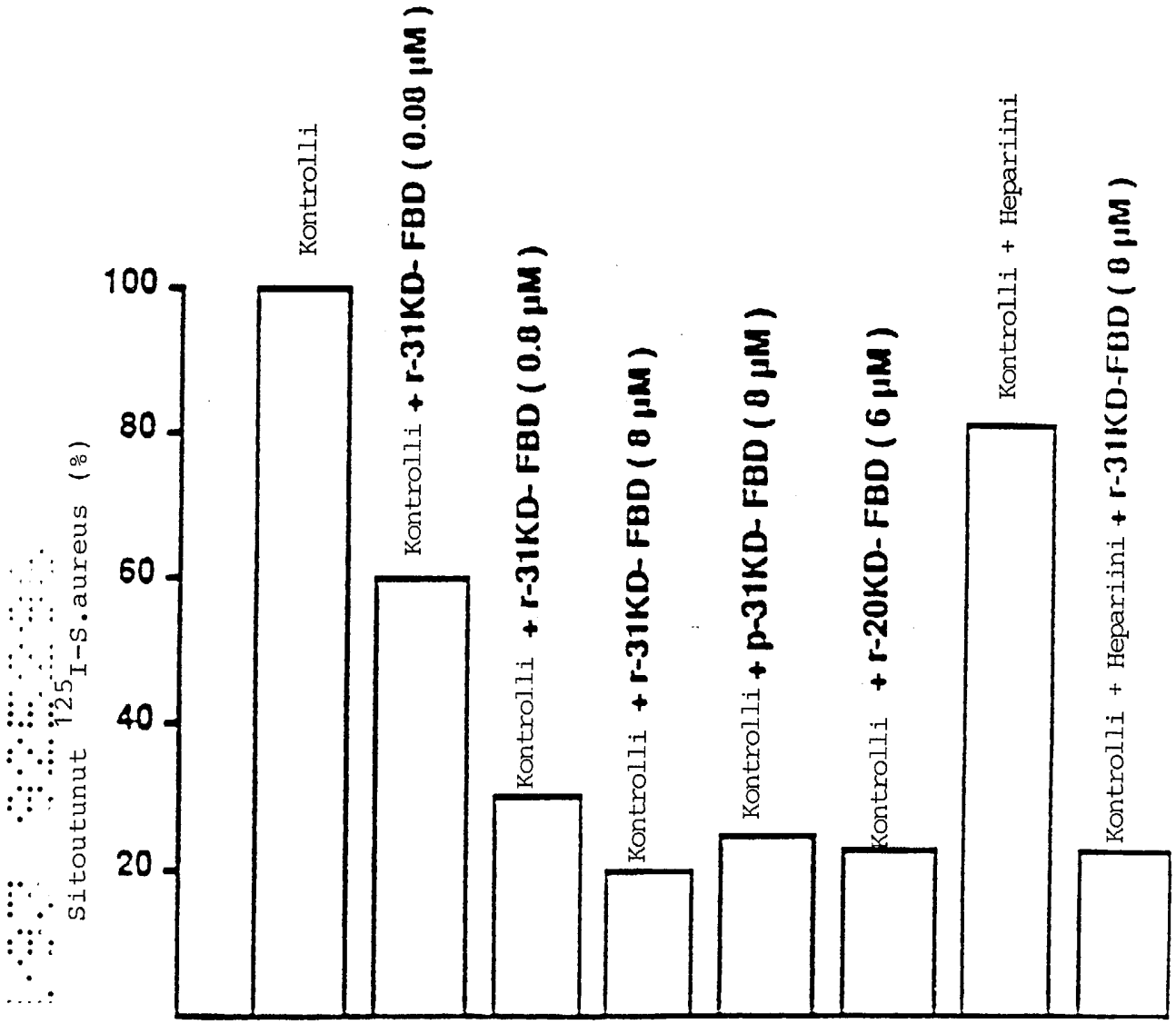
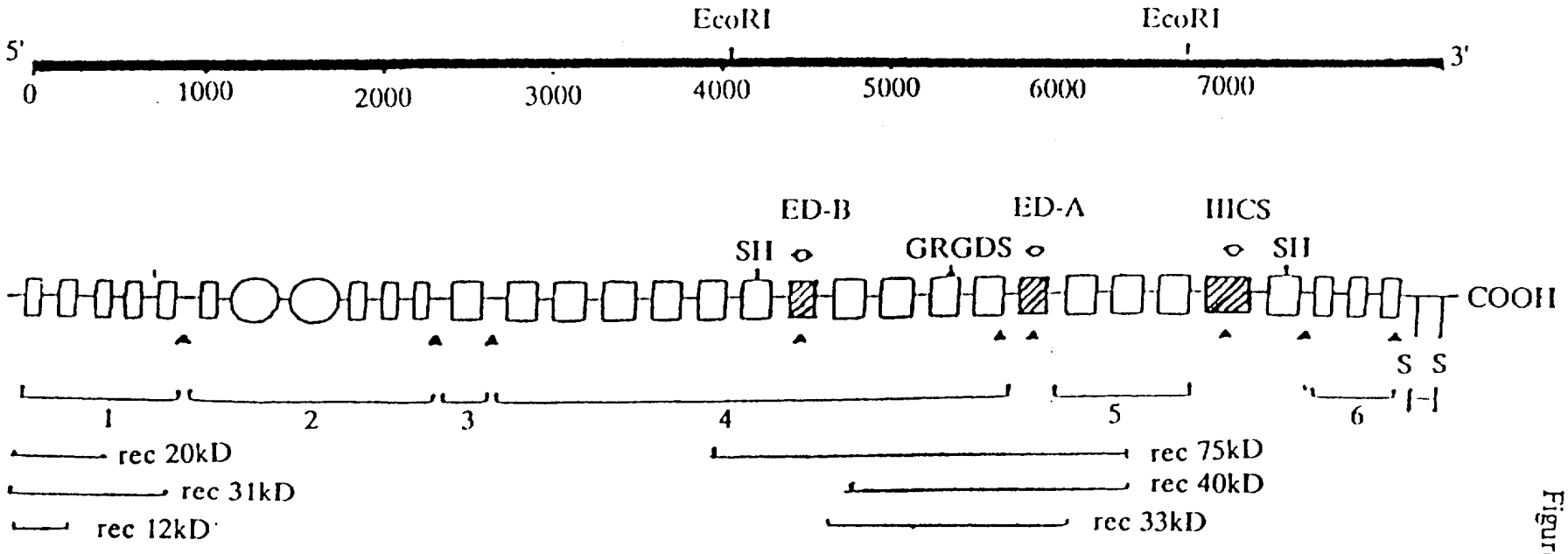


Figure 8

S.aureus'in sitoutuminen keuhkoputki-
katetreihin;
FBD:n ja hepariinin vaikutus






HEPARIINI
S.AUREUS-
FIBRIINI

KOLLAGEENI [HEPARIINI DNA] SOLU HEPARIINI DNA

HEPARIINI[ SOLU] FIBRIINI

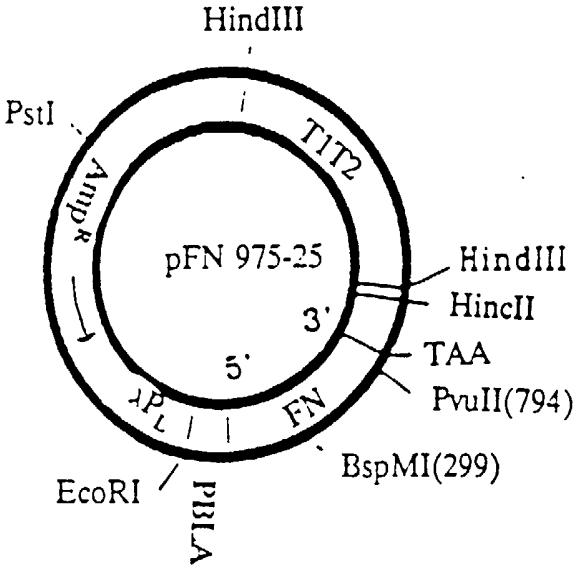
Figure 9

17/43

| | | Nukleotidit |
|---|---|---|
| FBD | rec-12 kD: | 14-340 |
| | rec-20 kD: | 14-472 |
| | rec-31 kD: | 14-799 |
| CBD | rec-40 kD: | 4151-5566 |
| | rec-75 kD: | 3317-5566 |
| | rec-33 kD: | 3998-5179 |

1008298

Figure 10




Synteettinen linkkeri: A

1. Sulata BspMI:llä + HindIII:lla
2. Eristä suuri BspMI/HindIII-fragmentti

T4 DNA-ligaasi

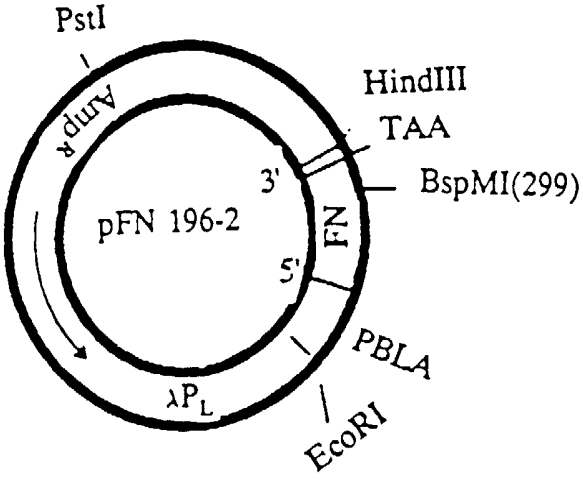


Figure 11

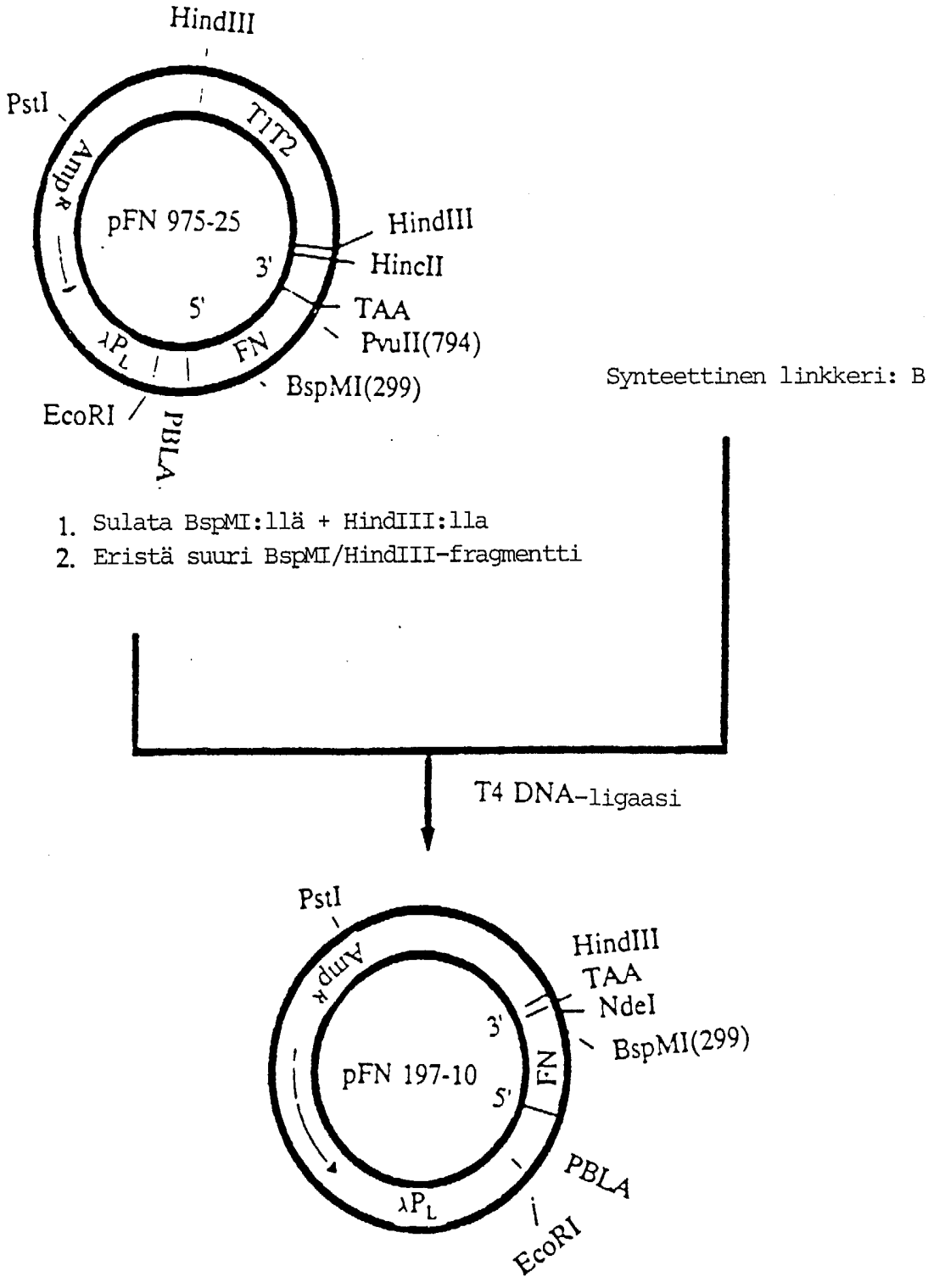

HindIII
PstI
T1T2
Amp R
pFN 975-25
HindIII
HincII
3'
5'
TAA
PvuII(794)
λP L
FN
BspMI(299)
EcoRI
PBLA
Synteettinen linkkeri: B
1. Sulata BspMI:llä + HindIII:lla
2. Eristä suuri BspMI/HindIII-fragmentti
T4 DNA-ligaasi
PstI
Amp R
HindIII
TAA
NdeI
3'
BspMI(299)
pFN 197-10
5'
FN
PBLA
λP L
EcoRI

Figure 12

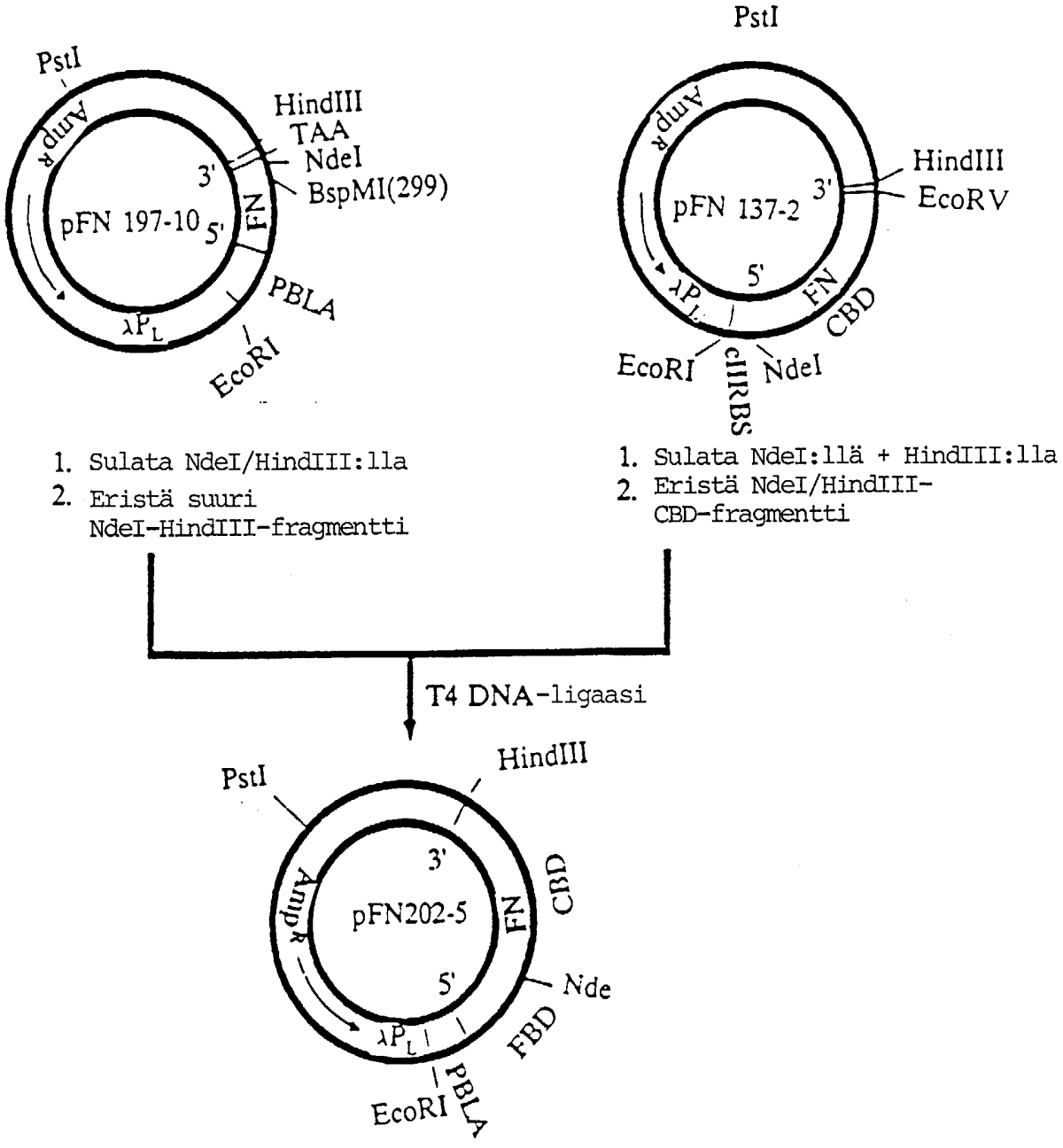
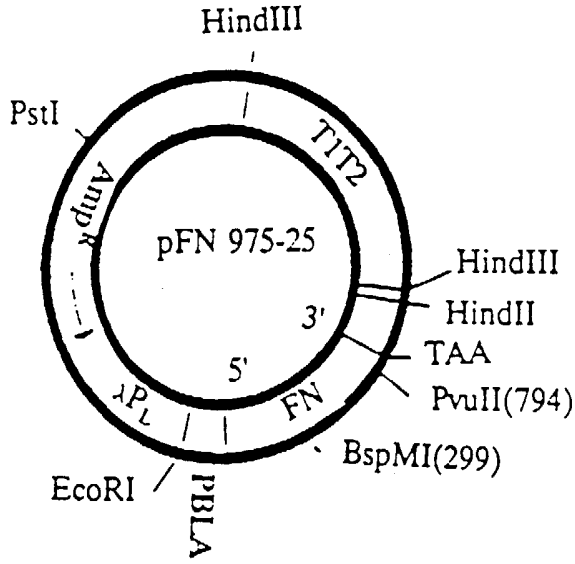

PstI
Amp R
HindIII
TAA
NdeI
BspMI(299)
3'
pFN 197-10
5'
FN
PBLA
λP L
EcoRI
1. Sulata NdeI/HindIII:lla
2. Eristä suuri NdeI-HindIII-fragmentti
PstI
Amp R
HindIII
EcoRV
3'
pFN 137-2
5'
λP L
FN
CBD
EcoRI
cIIRBS
NdeI
1. Sulata NdeI:llä + HindIII:lla
2. Eristä NdeI/HindIII-CBD-fragmentti
T4 DNA-ligaasi
PstI
HindIII
3'
Amp R
pFN202-5
FN
CBD
5'
Nde
λP L
FBD
EcoRI
PBLA

Figure 13




Synteettinen linkkeri: C

1. Sulata PvuII+HindII:lla
2. Eristä suuri PvuII/HindIII-fragmentti

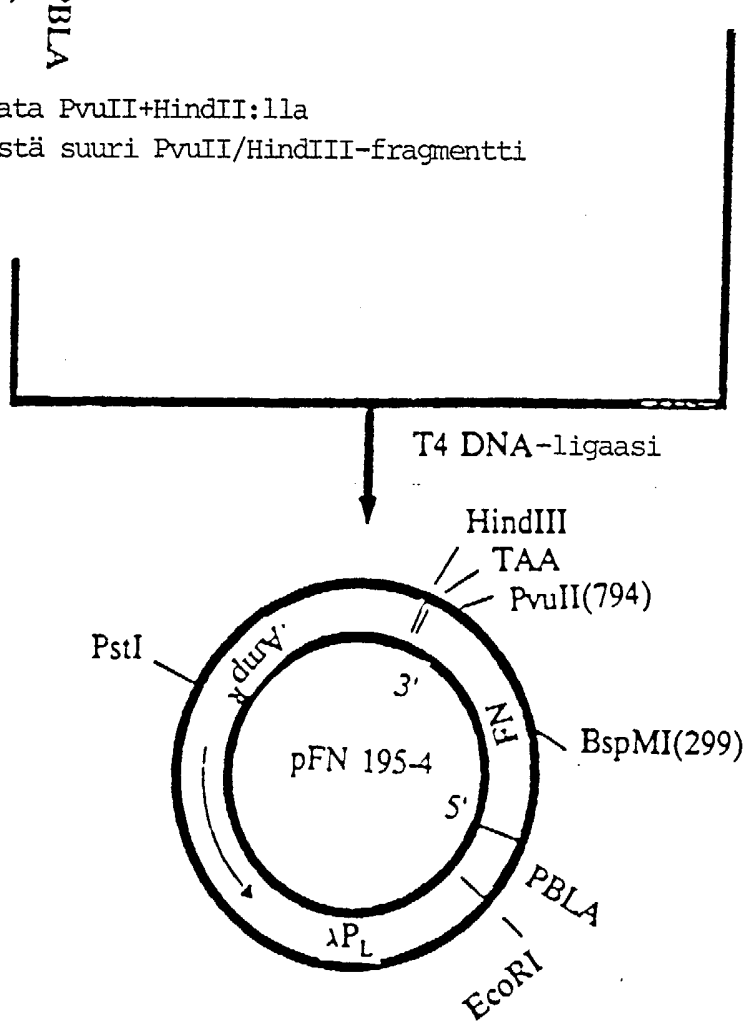


Figure 14

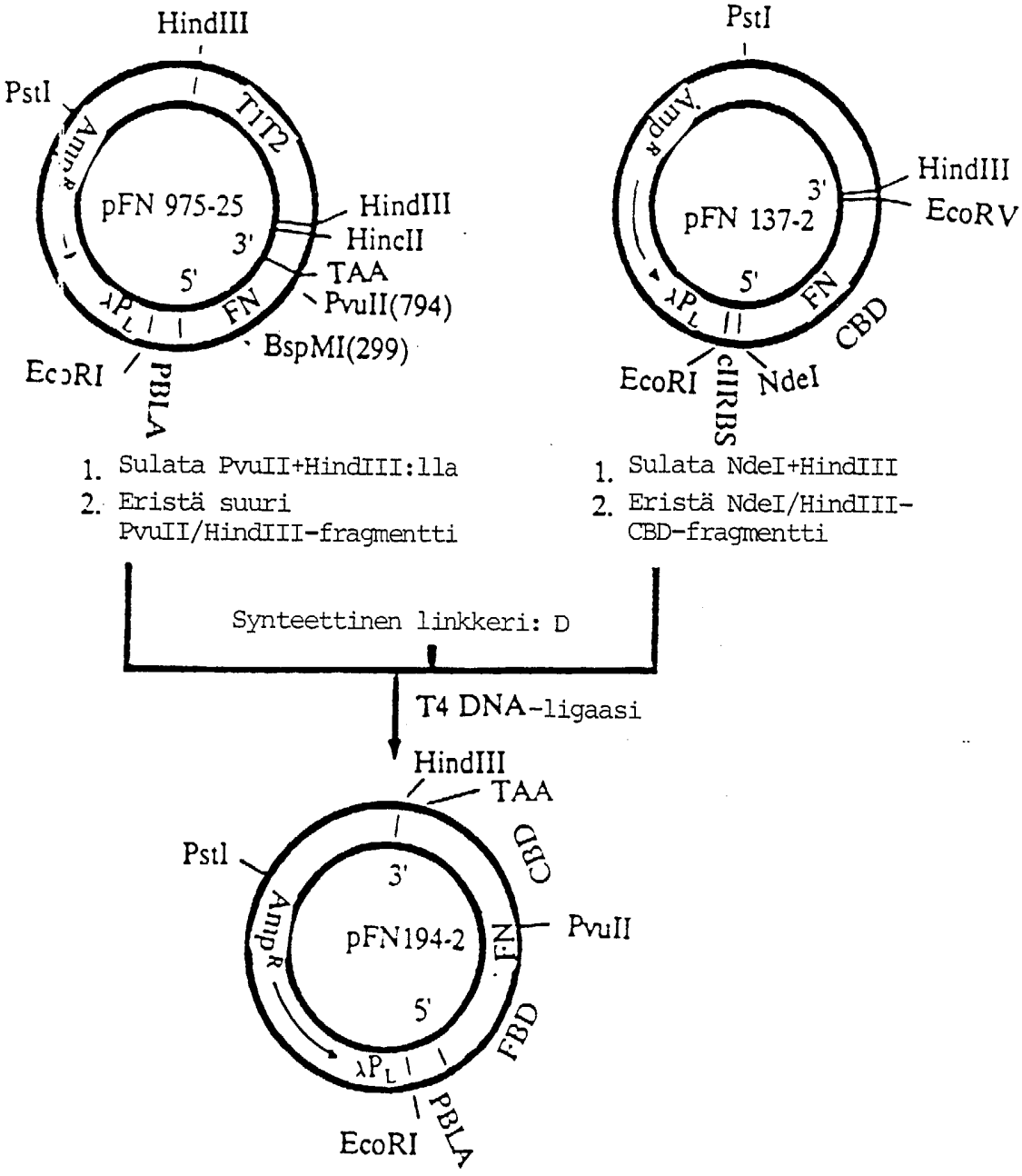

HindIII
PstI
T1T2
Amp R
pFN 975-25
HindIII
3'
HincII
5'
TAA
λP L
FN
PvuII(794)
BspMI(299)
EcoRI
PBLA
1. Sulata PvuII+HindIII:lla
2. Eristä suuri PvuII/HindIII-fragmentti
PstI
Amp R
pFN 137-2
3'
HindIII
EcoRV
5'
λP L
FN
CBD
EcoRI
cIIRBS
NdeI
1. Sulata NdeI+HindIII
2. Eristä NdeI/HindIII-CBD-fragmentti
Synteettinen linkkeri: D
T4 DNA-ligaasi
HindIII
TAA
PstI
CBD
3'
Amp R
pFN194-2
FN
PvuII
5'
FBD
λP L
PBLA
EcoRI

Figure 15

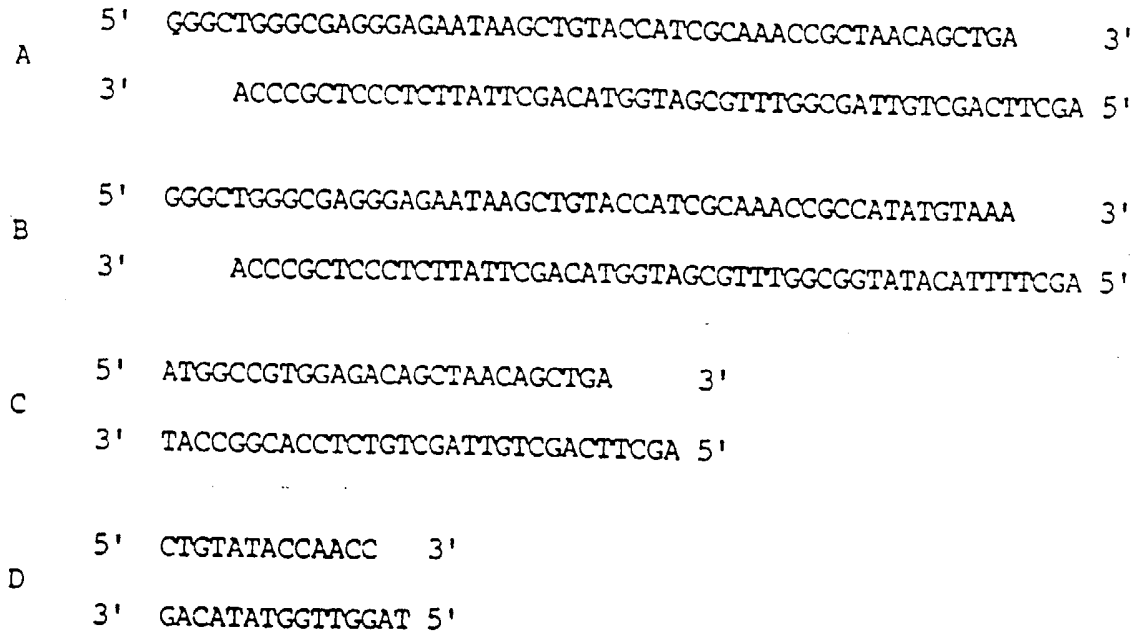
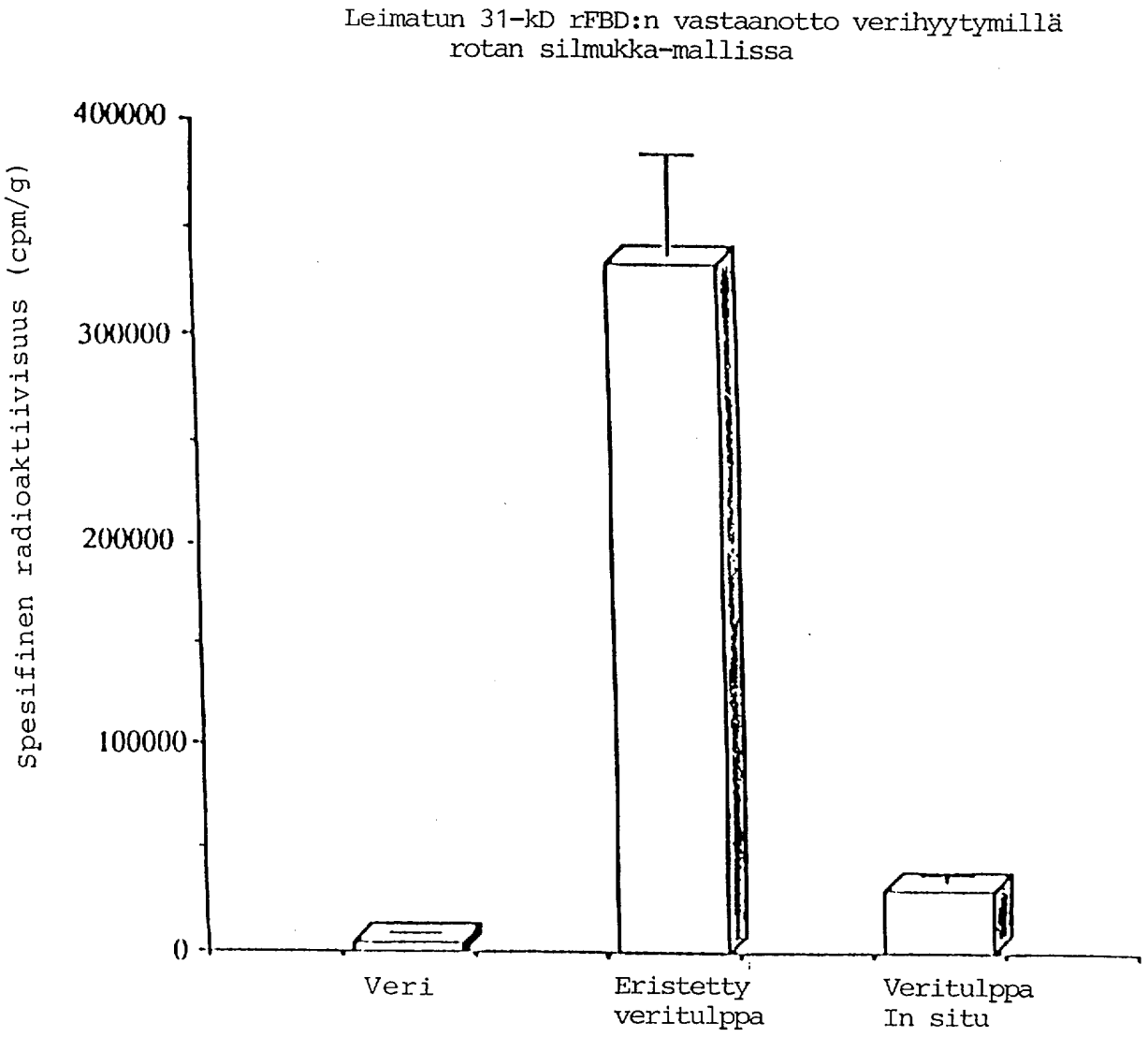

A
5' GGGCTGGGCGAGGGAGAATAAGCTGTACCATCGCAAACCGCTAACAGCTGA 3'
3' ACCCGCTCCCTCTTATTCGACATGGTAGCGTTTGGCGATTGTCGACTTCGA 5'
B
5' GGGCTGGGCGAGGGAGAATAAGCTGTACCATCGCAAACCGCCATATGTAAA 3'
3' ACCCGCTCCCTCTTATTCGACATGGTAGCGTTTGGCGGTATACATTTTCGA 5'
C
5' ATGGCCGTGGAGACAGCTAACAGCTGA 3'
3' TACCGGCACCTCTGTCGATTGTCGACTTCGA 5'
D
5' CTGTATACCAACC 3'
3' GACATATGGTTGGAT 5'

Figure 16






1008298

Figure 17

12, 20 ja 31-kD FBD-molekyylien välinen vertailu

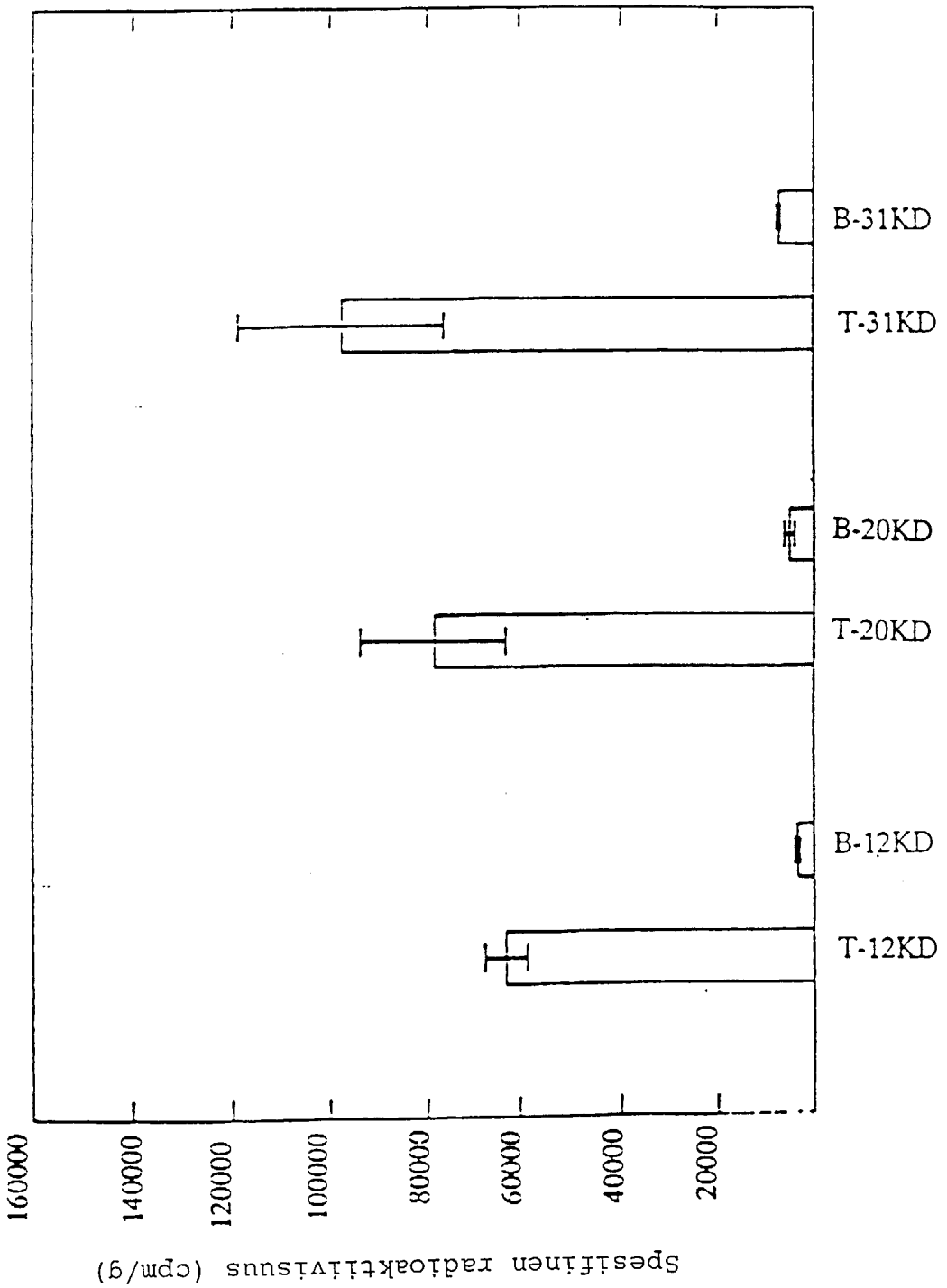
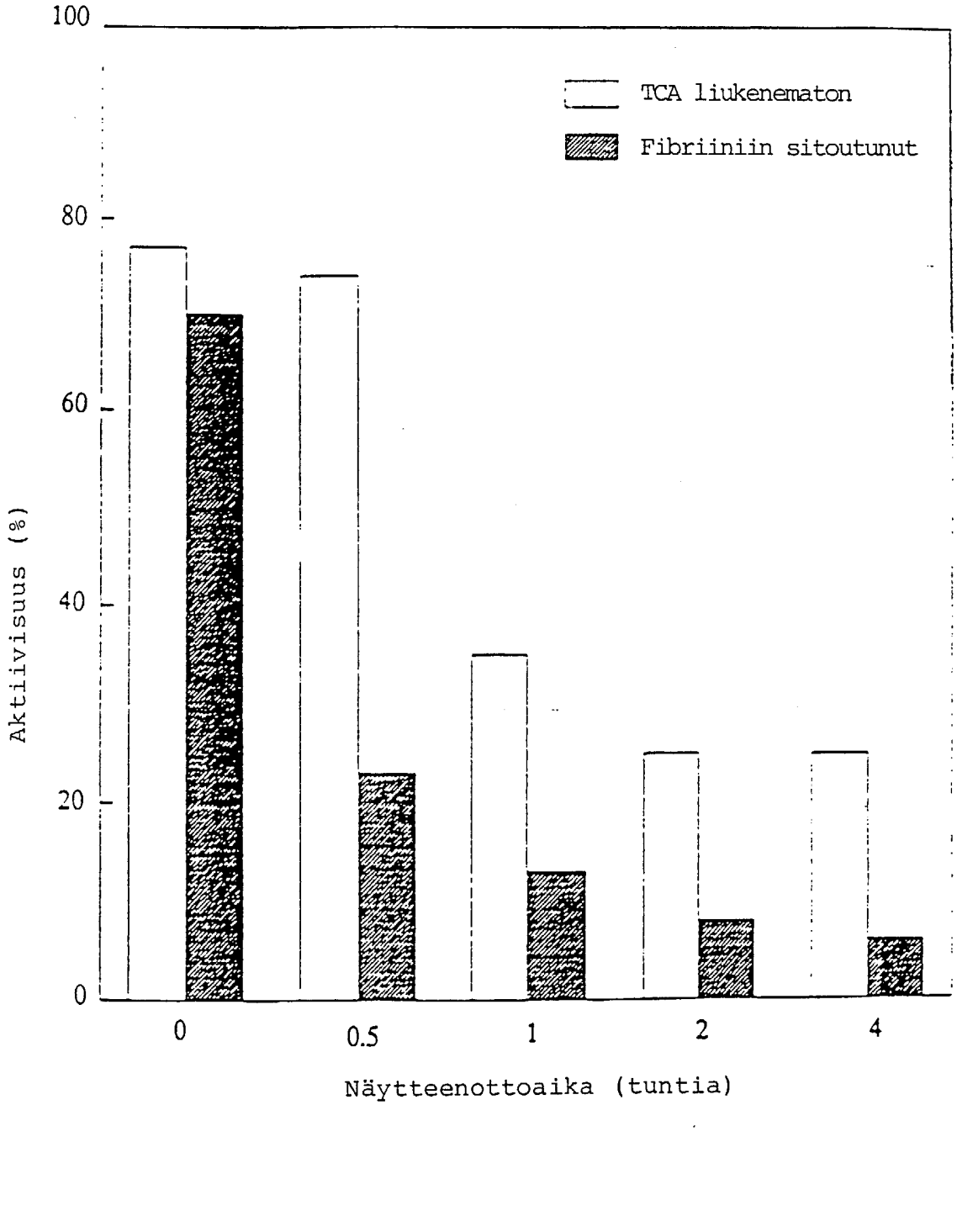


Figure 18

vFBD:n metabolinen stabiilisuus rotissa
Ex vivo-sitoutuminen fibriiniin verrattuna
TCA-liukenemattomuuteen



FBD:n sitoutuminen fibriinihyytymään (reaktio II)
eri yhdistelmä-DNA- ja plasma-FBD-molekyylien
välinen vertailu

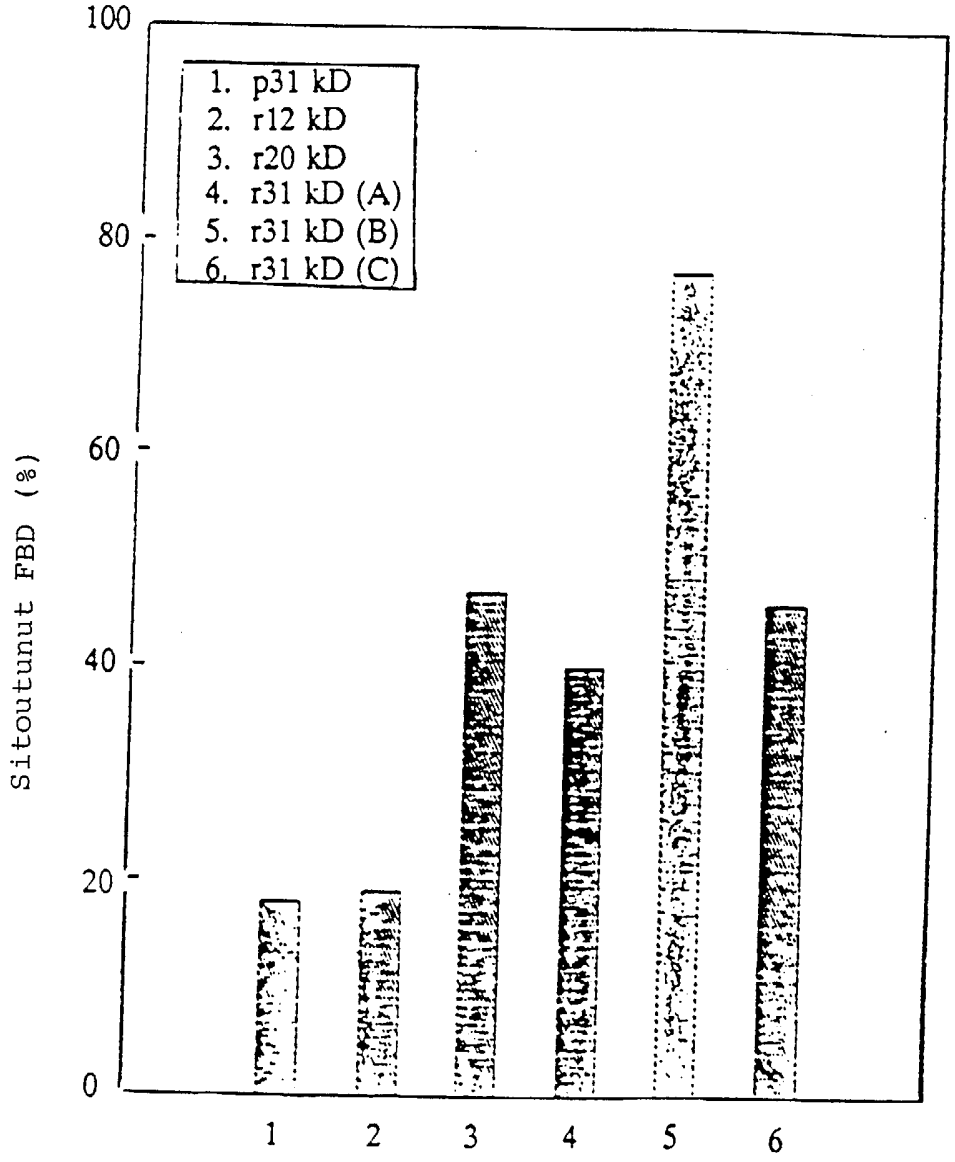


Figure 20

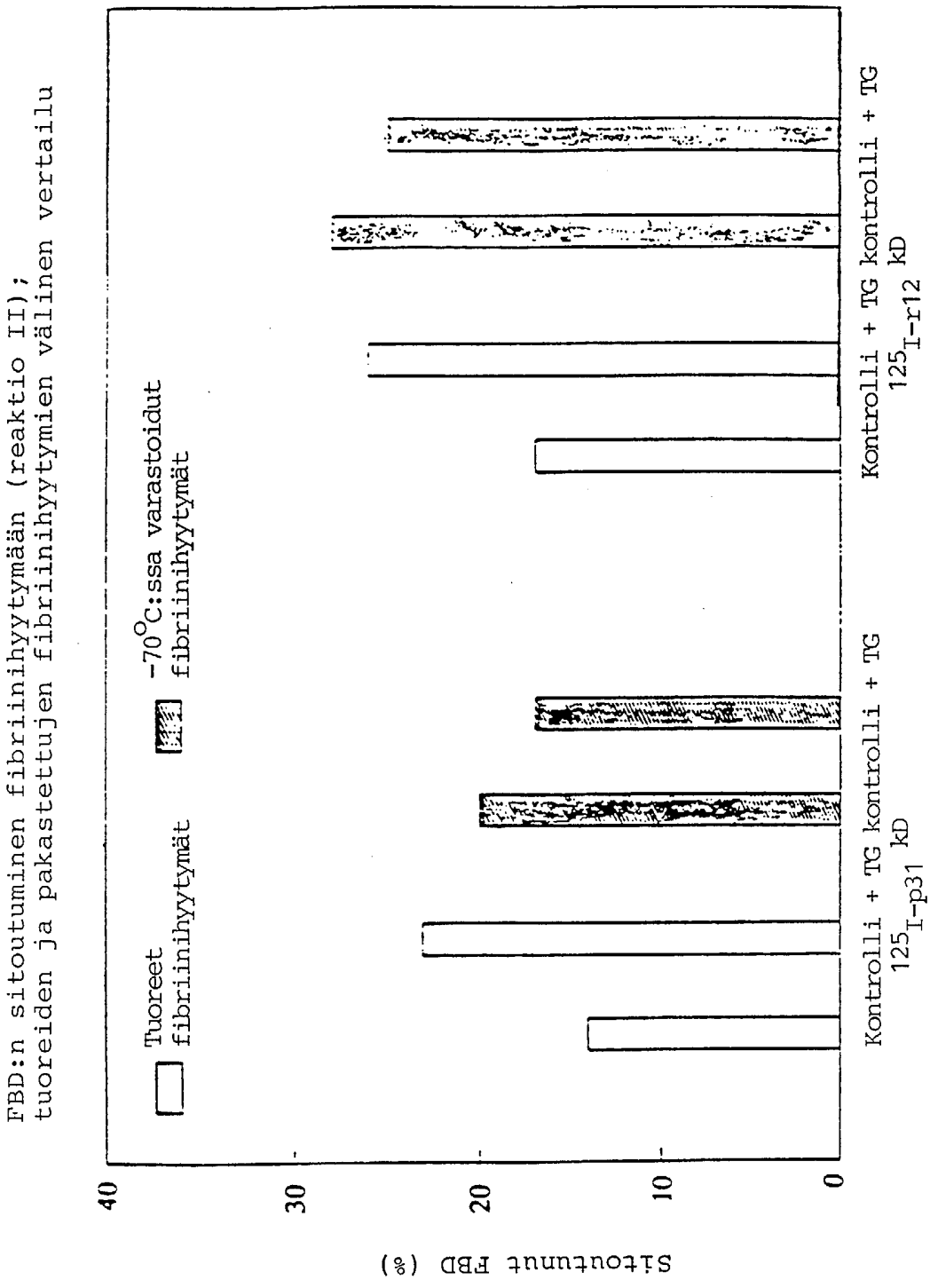

FBD:n sitoutuminen fibriinihyytymään (reaktio II);
tuoreiden ja pakastettujen fibriinihyytymien välinen vertailu
Tuoreet fibriinihyytymät
-70°C:ssa varastoidut fibriinihyytymät
Sitoutunut FBD (%)
0
10
20
30
40
Kontrolli + TG
Kontrolli + TG kontrolli + TG
125I-p31 kD
125I-r12 kD

Figure 21

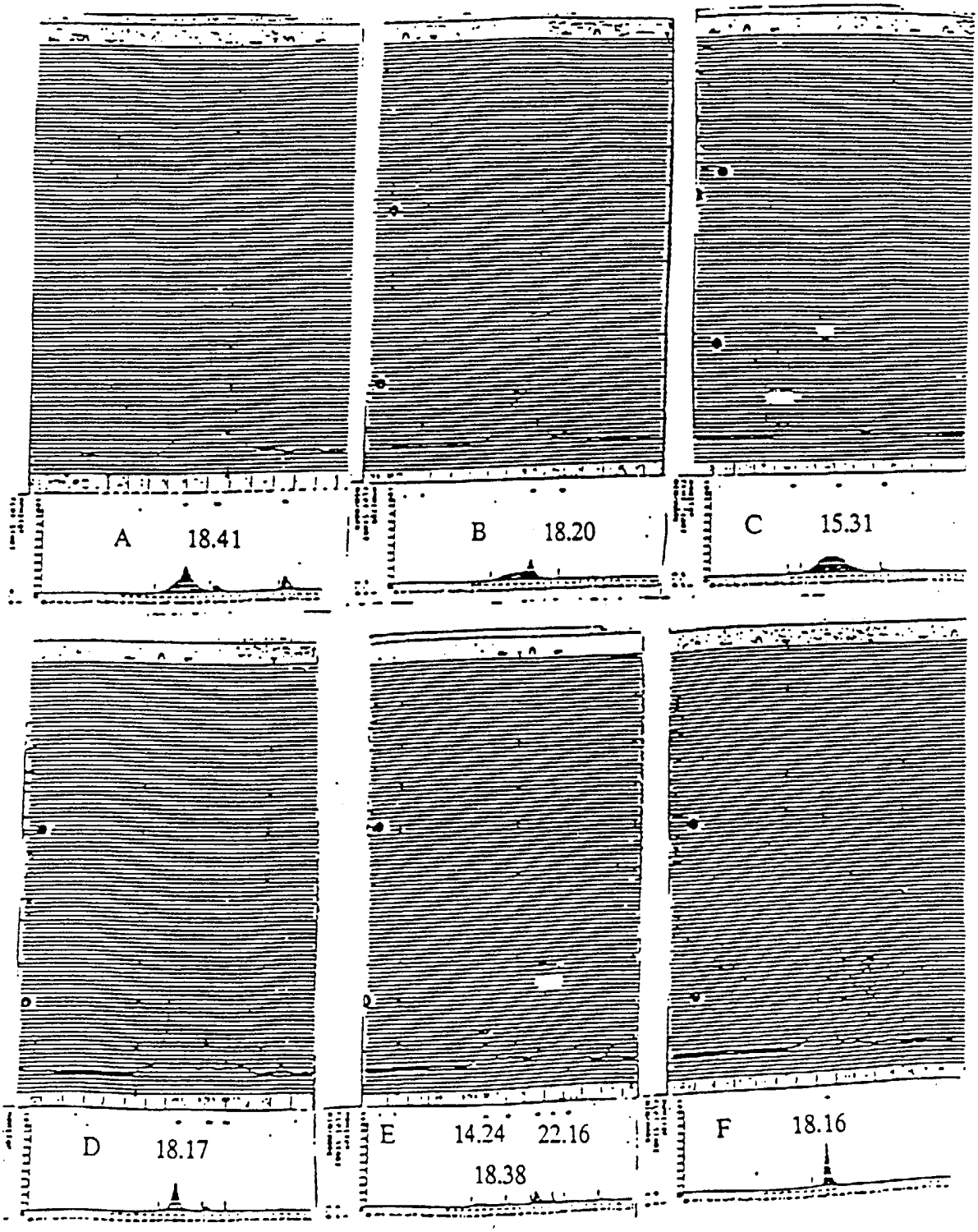


Figure 22

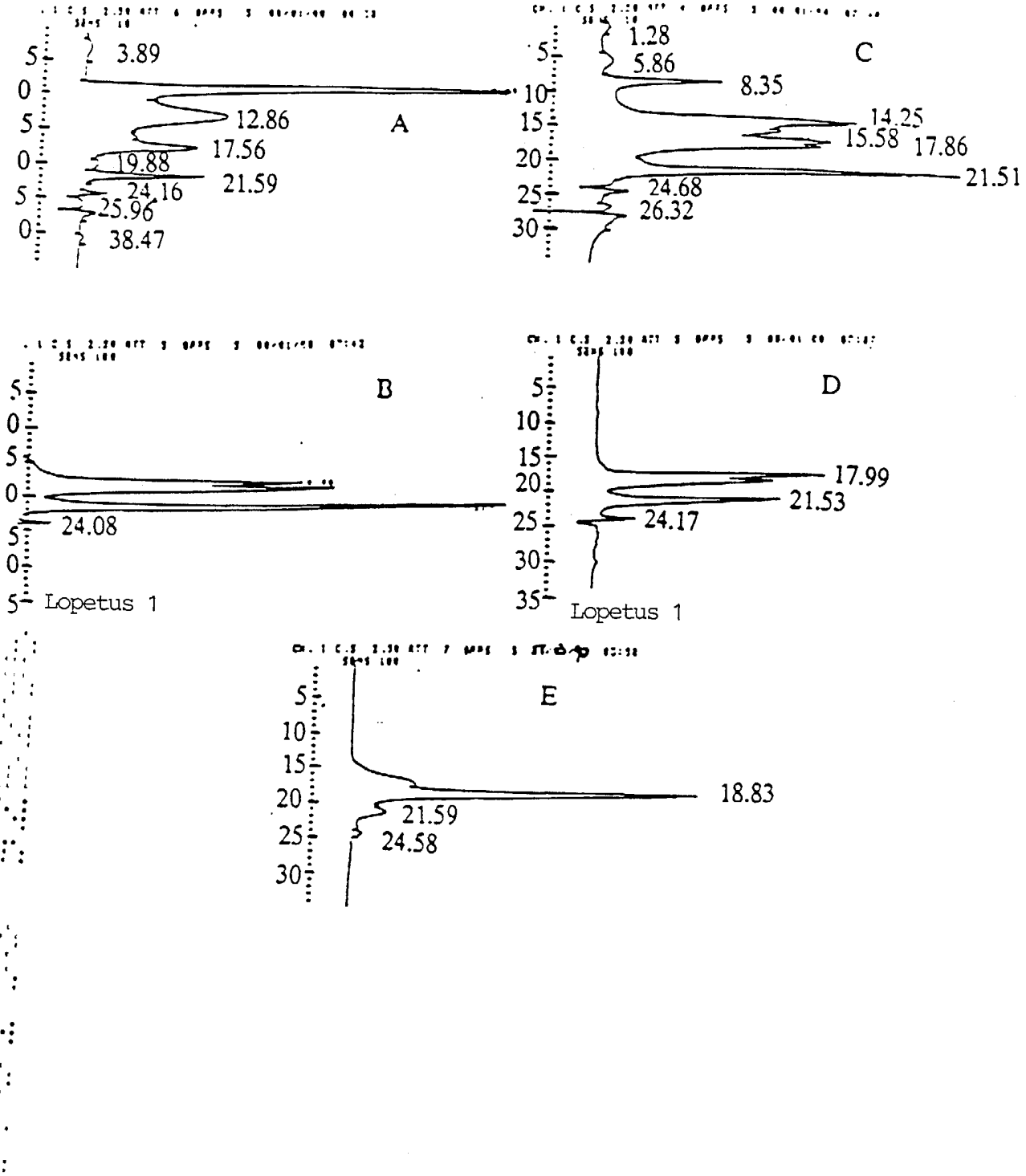

A
3.89
12.86
17.56
19.88
21.59
24.16
25.96
38.47
B
24.08
Lopetus 1
C
1.28
5.86
8.35
14.25
15.58
17.86
21.51
24.68
26.32
D
17.99
21.53
24.17
Lopetus 1
E
18.83
21.59
24.58

Figure 23

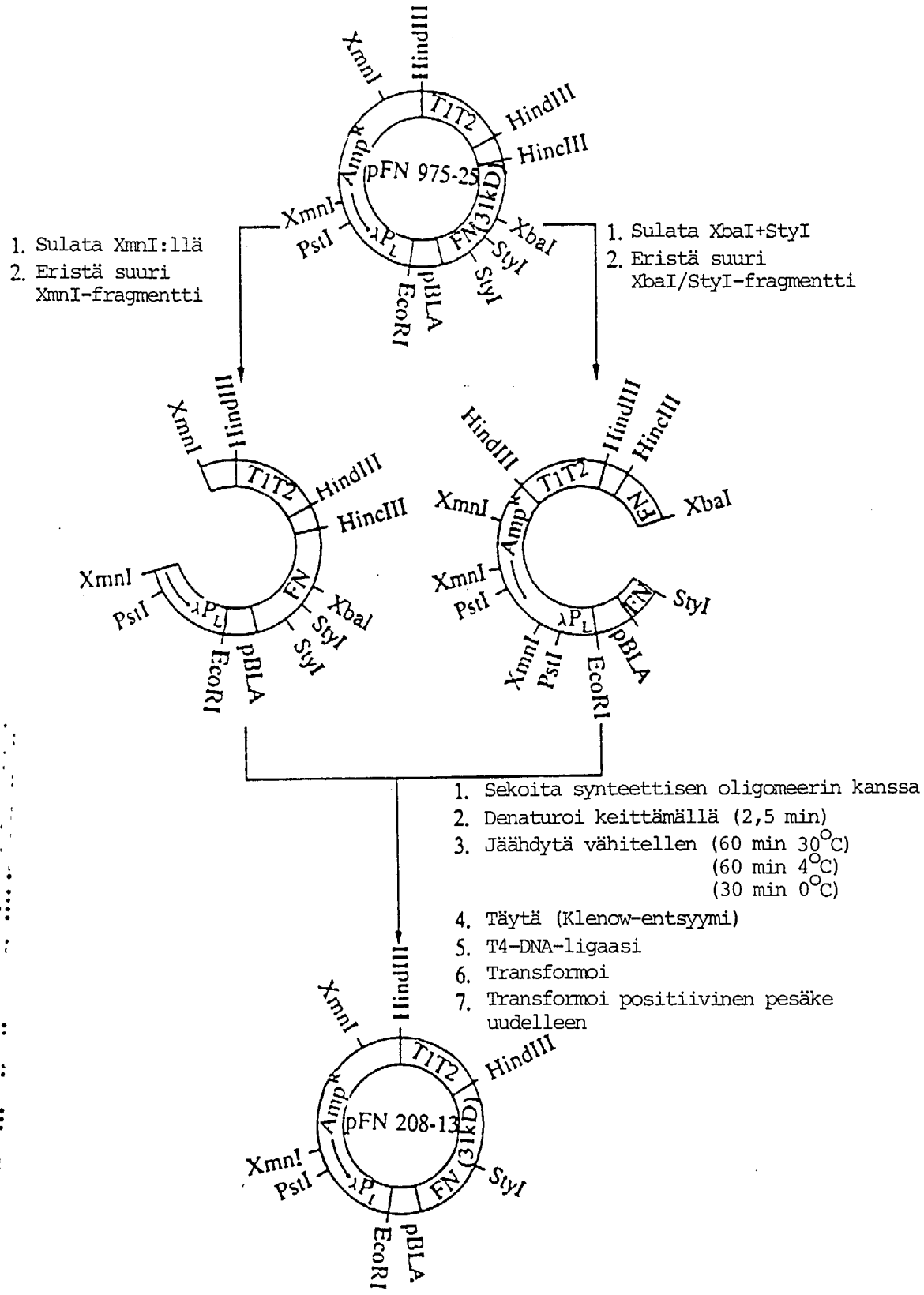

pFN 975-25
XmnI
HindIII
T1T2
HindIII
HincIII
Amp
XmnI
PstI
λPL
FN(31kD)
XbaI
StyI
StyI
pBLA
EcoRI
1. Sulata XmnI:llä
2. Eristä suuri XmnI-fragmentti
1. Sulata XbaI+StyI
2. Eristä suuri XbaI/StyI-fragmentti
FN
1. Sekoita synteettisen oligomeerin kanssa
2. Denaturoi keittämällä (2,5 min)
3. Jäähdytä vähitellen (60 min 30°C)
(60 min 4°C)
(30 min 0°C)
4. Täytä (Klenow-entsyymi)
5. T4-DNA-ligaasi
6. Transformoi
7. Transformoi positiivinen pesäke uudelleen
pFN 208-13

Figure 24

5' GCCCATAGCTGAAAAGTAATTTGATCATGCTGC 3'

Figure 25



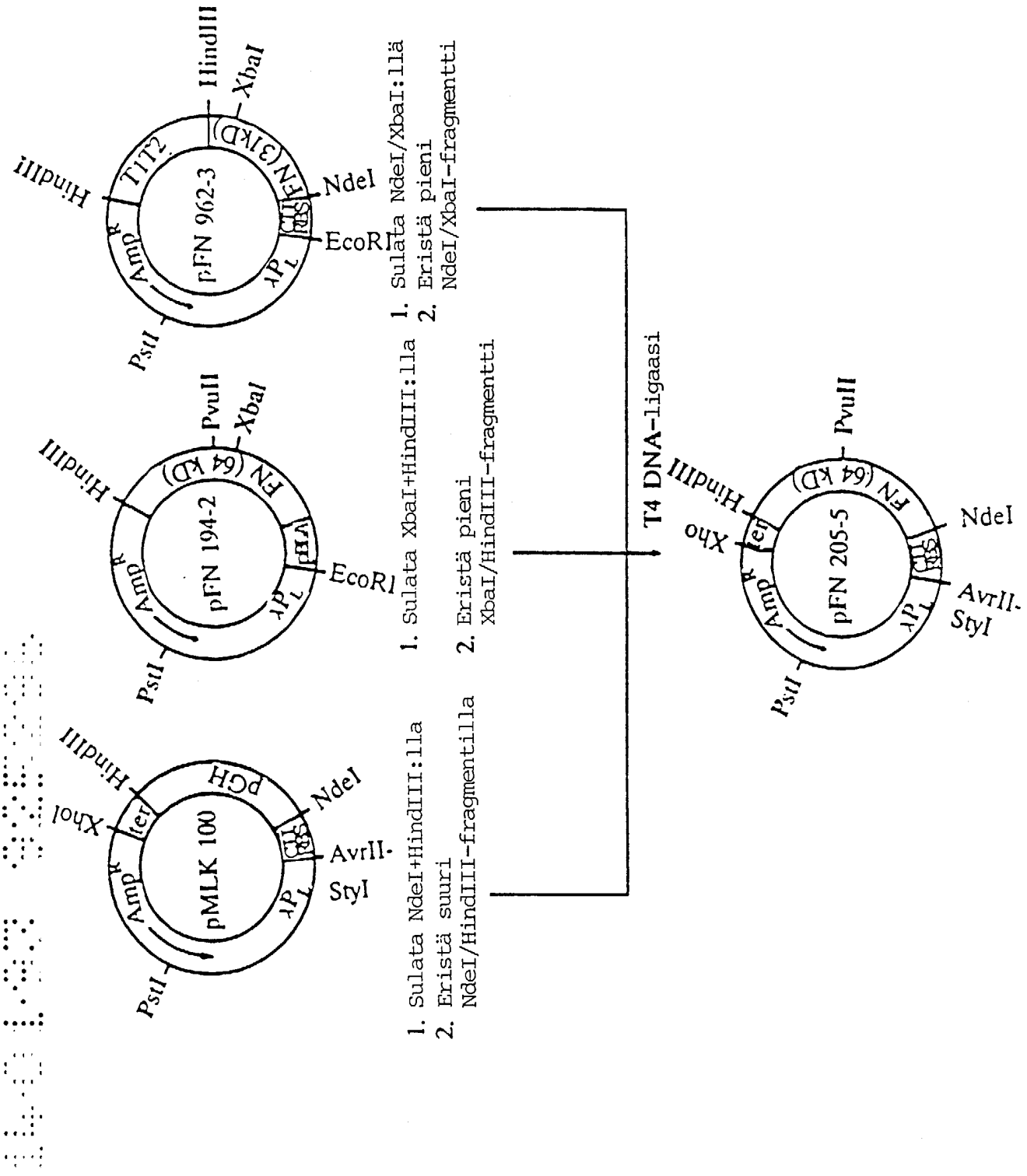
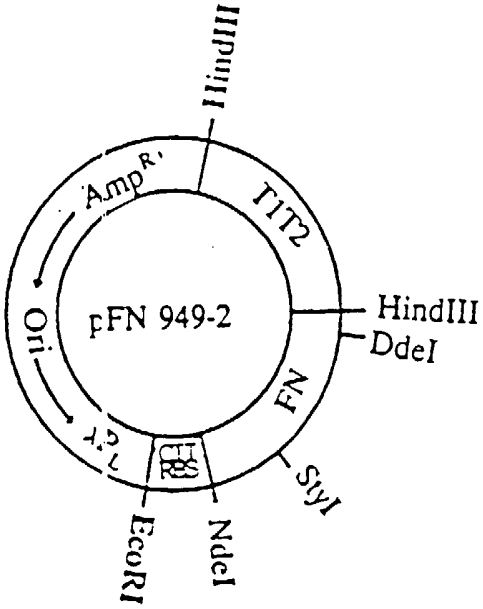
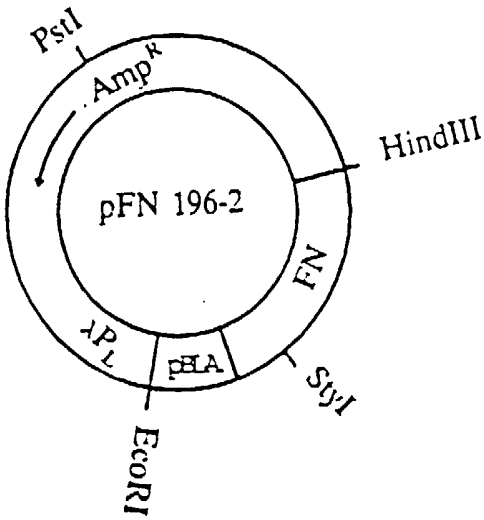

pMLK 100
pGH
NdeI
AvrII-
StyI
HindIII
XhoI
Amp
PstI
1. Sulata NdeI+HindIII:lla
2. Eristä suuri
NdeI/HindIII-fragmentilla
pFN 194-2
PvuII
XbaI
FN (64 kD)
VH
EcoRI
HindIII
Amp
PstI
1. Sulata XbaI+HindIII:lla
2. Eristä pieni
XbaI/HindIII-fragmentti
pFN 962-3
HindIII
XbaI
FN(3IKD)
NdeI
EcoRI
T1T2
Amp
PstI
1. Sulata NdeI/XbaI:llä
2. Eristä pieni
NdeI/XbaI-fragmentti
T4 DNA-ligaasi
pFN 205-5
PvuII
FN (64 kD)
NdeI
AvrII-
StyI
HindIII
XhoI
Amp
PstI

Figure 26




1. Sulata HindIII+StyI:llä
2. Eristä suuri HindIII/StyI-fragmentti




1. Sulata HindIII+StyI:llä
2. Eristä pieni HindIII/StyI-fragmentti

T4 DNA-ligaasi

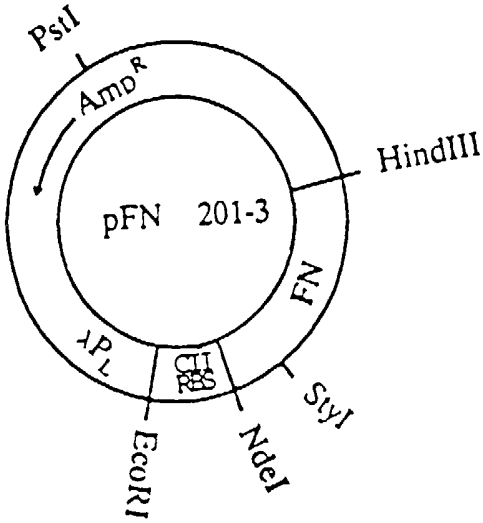
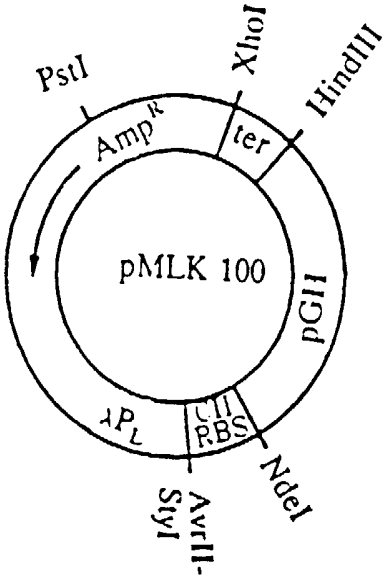
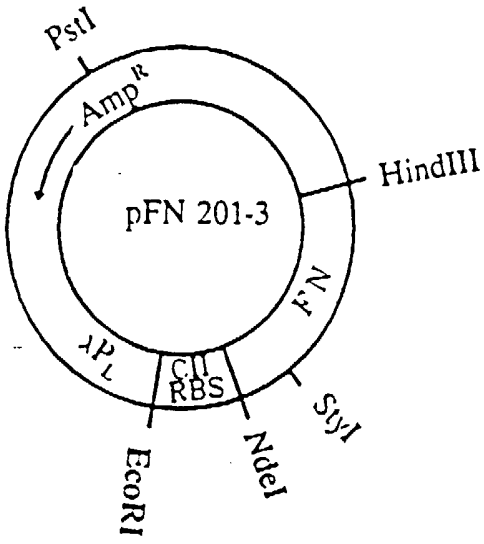


Figure 27




1. Sulata NdeI+HindIII:lla
2. Eristä suuri NdeI/HindIII-fragmentti




1. Sulata NdeI+HindIII:lla
2. Eristä pieni NdeI/HindIII-fragmentti (FN)

T4 DNA-ligaasi

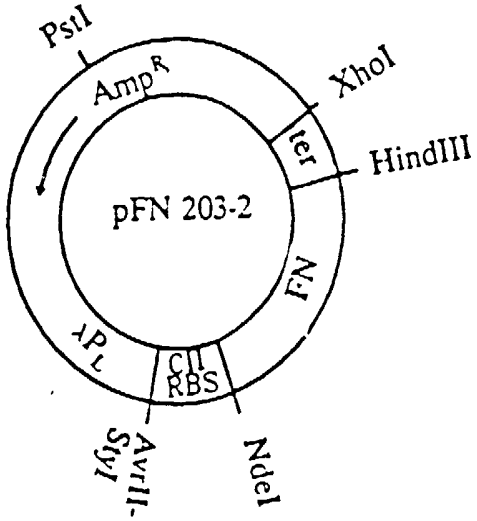
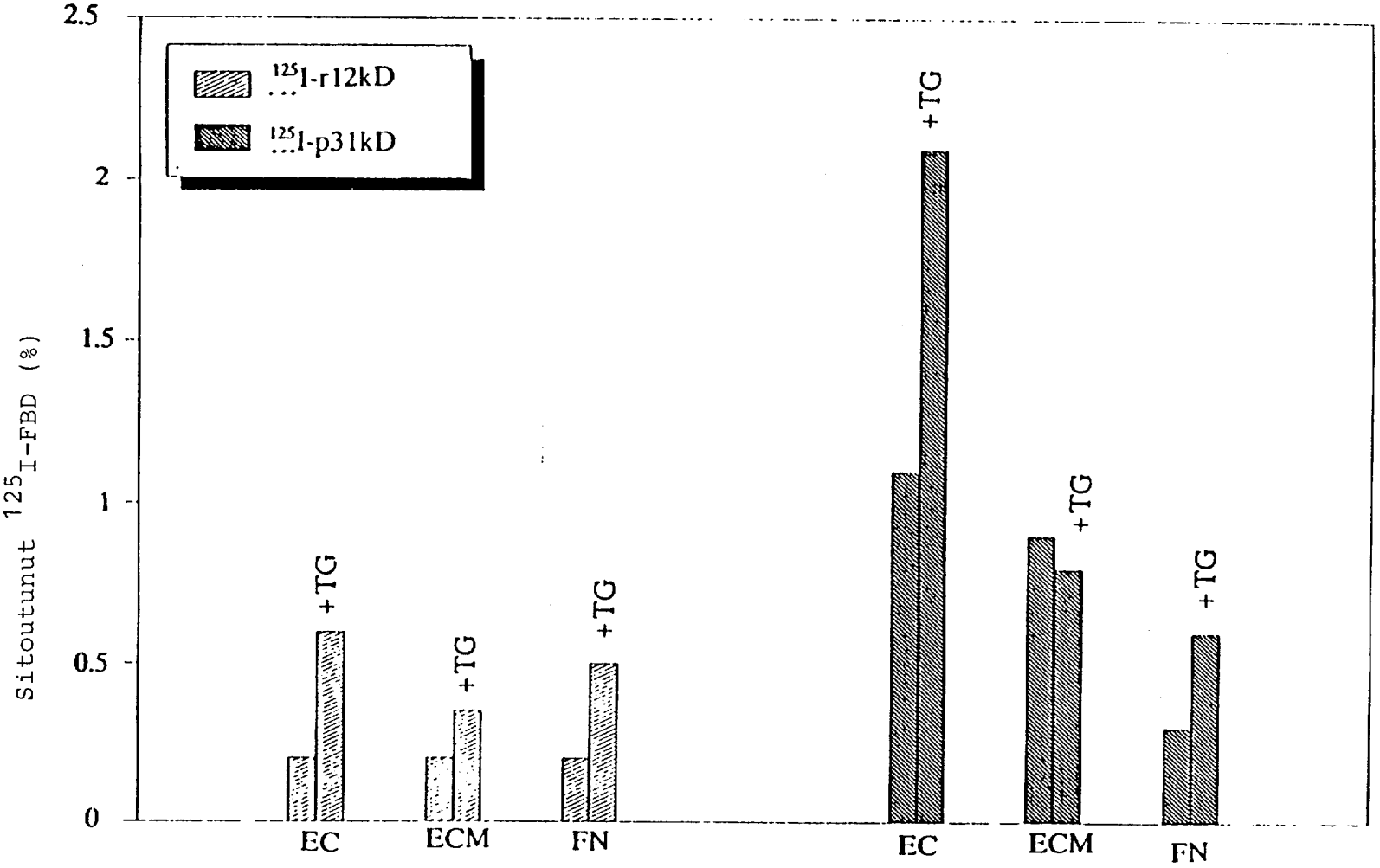


Figure 28






108298

Figure 29

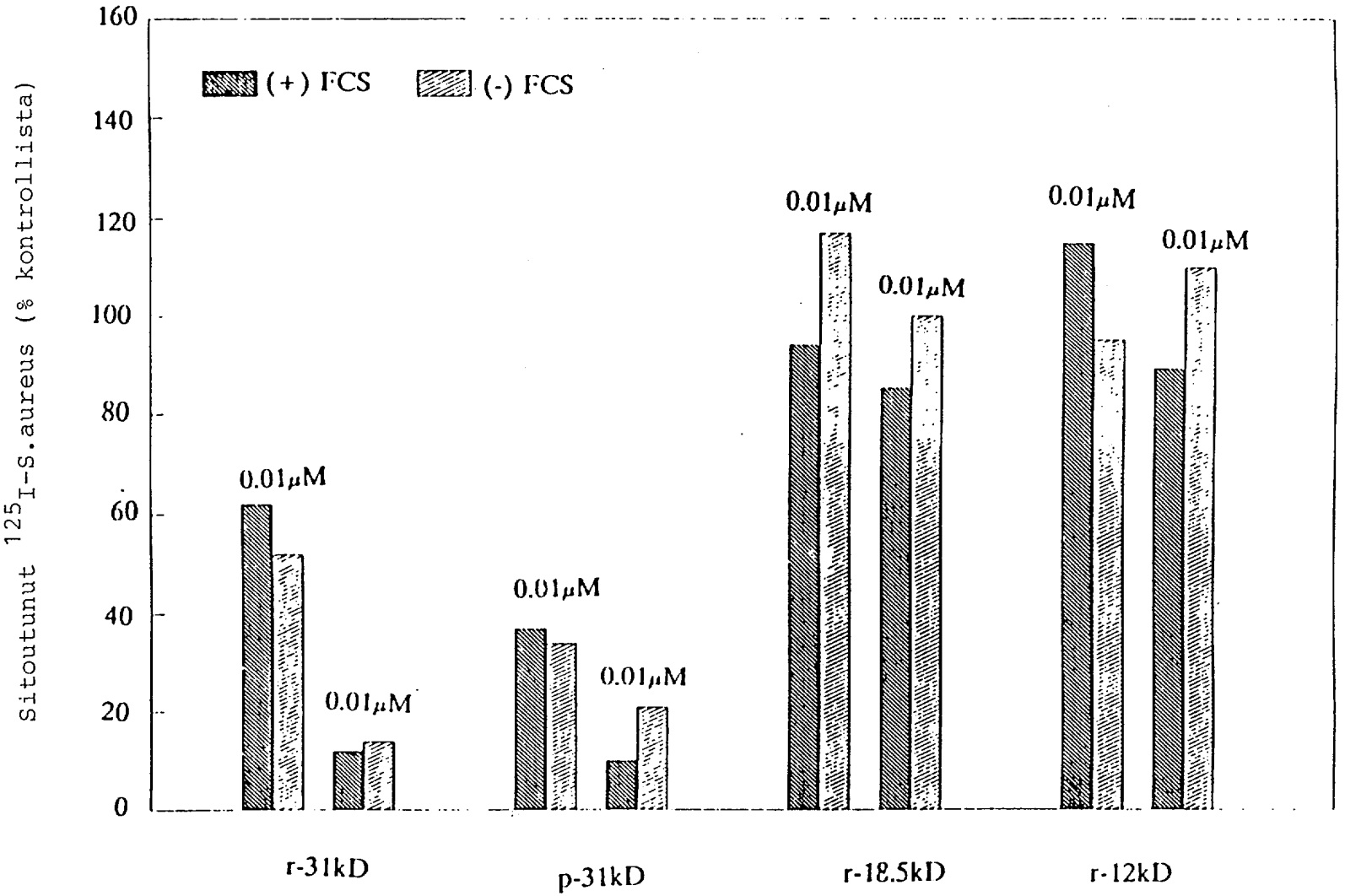

160
140
120
100
80
60
40
20
0
(+) FCS
(-) FCS
Sitoutunut $^{125}$I-S.aureus (% kontrollista)
0.01μM
0.01μM
0.01μM
0.01μM
0.01μM
0.01μM
0.01μM
0.01μM
r-31kD
p-31kD
r-18.5kD
r-12kD

Figure 30

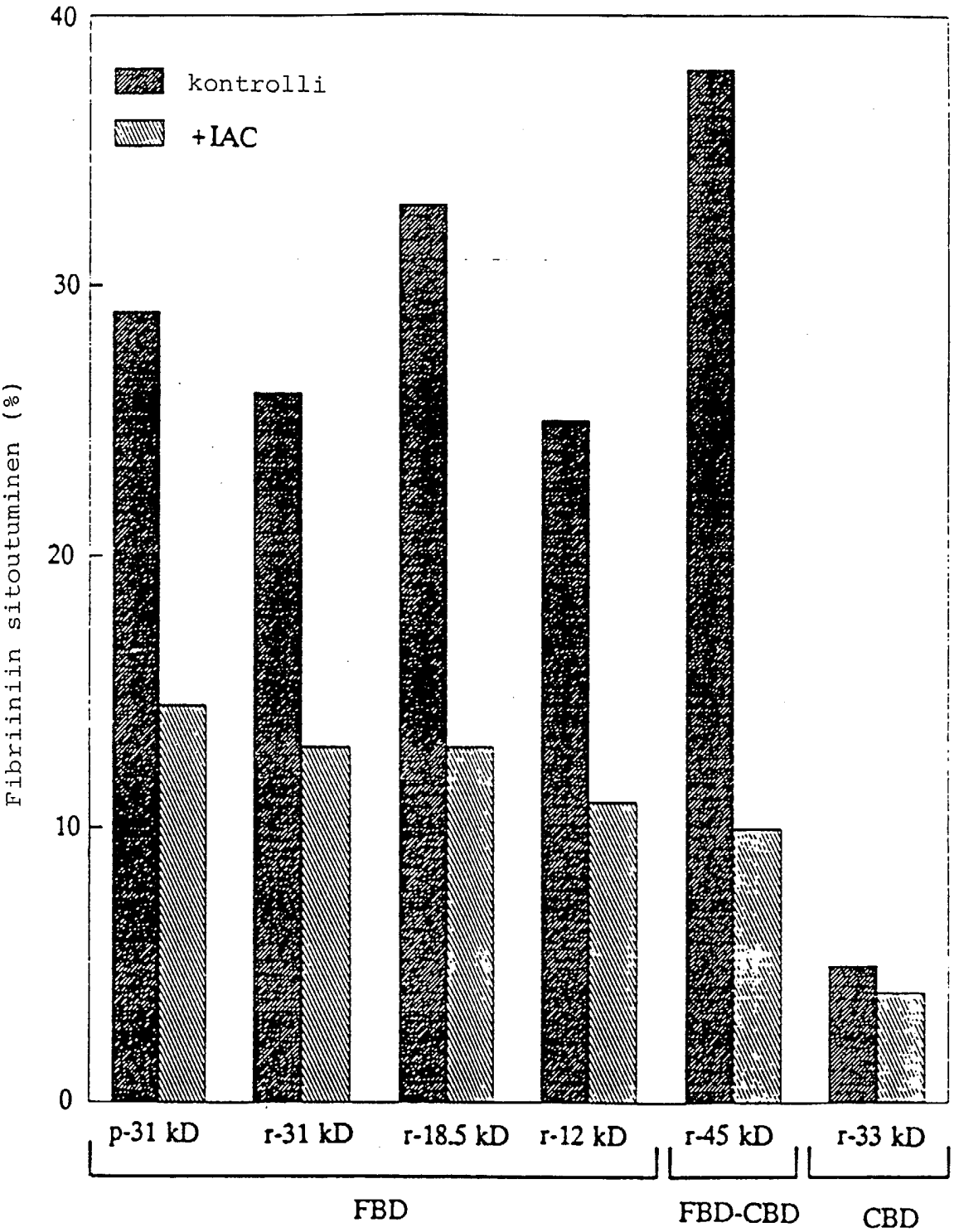

40
30
20
10
0
kontrolli
+IAC
Fibriinin sitoutuminen (%)
p-31 kD
r-31 kD
r-18.5 kD
r-12 kD
r-45 kD
r-33 kD
FBD
FBD-CBD
CBD

Figure 31

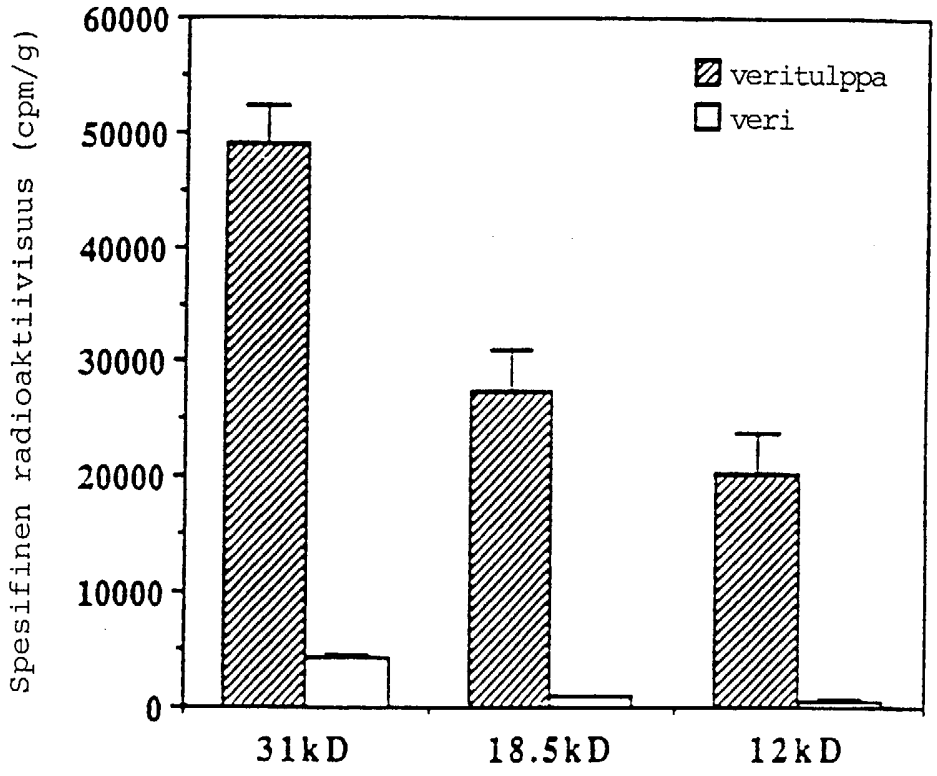

Spesifinen radioaktiivisuus (cpm/g)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
veritulppa
veri
31kD
18.5kD
12kD

Figure 32

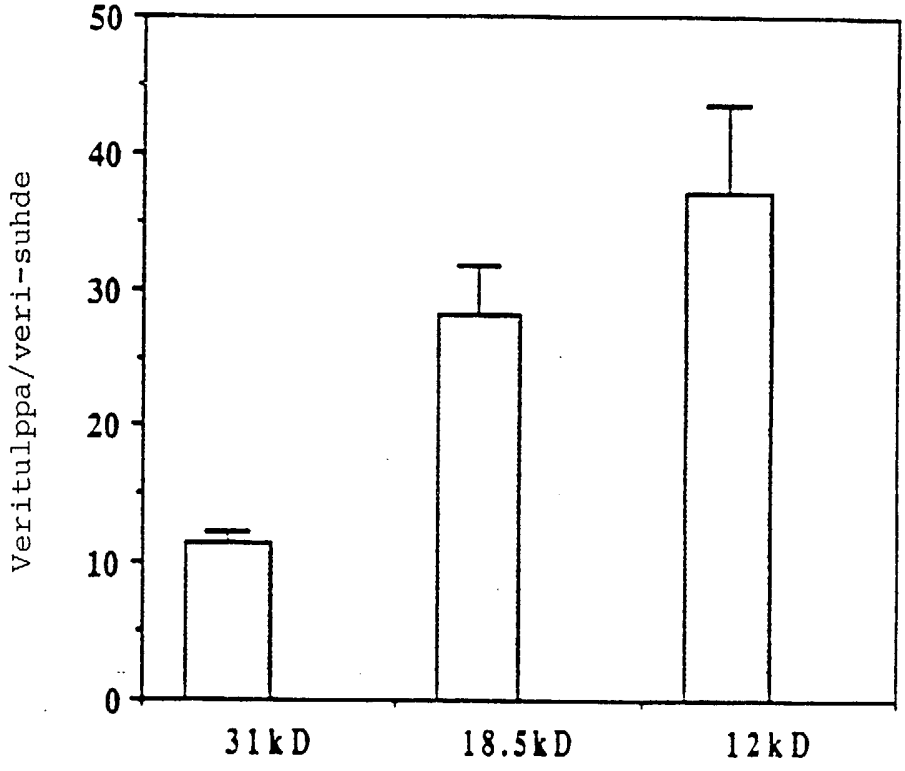


Figure 33

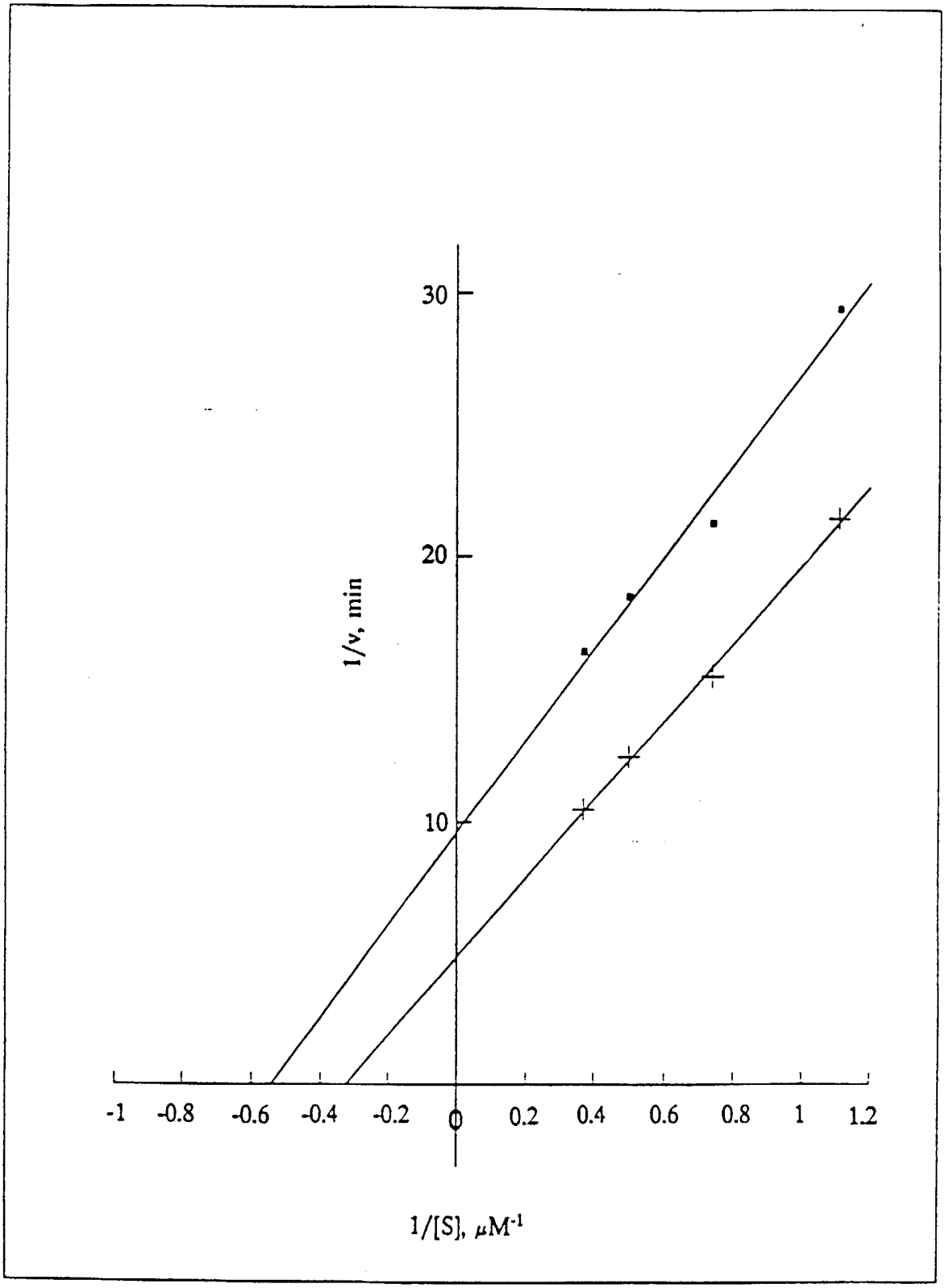


Figure 34

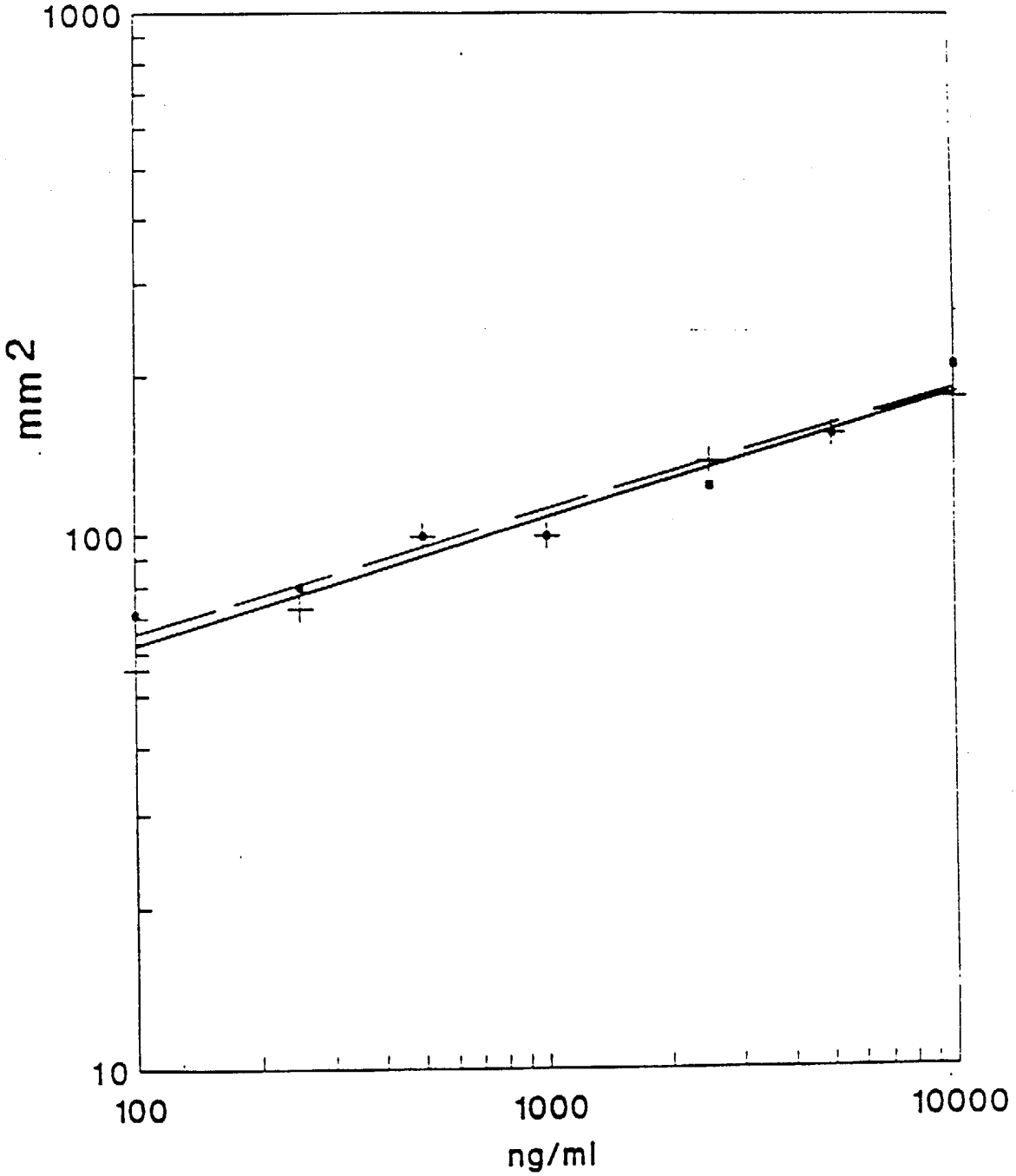


Figure 35

