(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 890342 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 890342

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 35/30
A61K 38/02
C07K 4/12
C07K 14/435

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **24.01.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **24.01.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **26.07.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

25.01.1988 US 147835

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**American Cyanamid Company,** One Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470-8426, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Bohlen, Peter,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Gautschi-Sova,** Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Hepariiniin sitoutuvat aivojen mitogeenit
Hjärnmitogener, som binds till heparin

Hepariiniin sitoutuvat aivojen mitogeenit

Tämä keksintö koskee ryhmää uusia proteiinikasvutekijöitä, joiden uskotaan edistävän angiogeneesiä ja joiden sen vuoksi pitäisi olla hyödyllisiä haavan paranemisessa, luun paranemisessa ja palohaavojen hoidossa. Proteiinit aiheuttavat ehdoteelisoluissa mitogeneesin ja sellaisina niiden voidaan katsoa olevan näiden solujen kasvutekijöitä. Niinikään proteiinien uskotaan edistävän kudoksen, erityisesti hermokudoksen, muodostusta, ylläpitoa ja korjausta.

Proteiinit eristetään aivosoluista ja kutakin niistä voidaan nimittää hepariiniin sitoutuvaksi aivojen mitogeeniksi (HBBM). Proteiinit ovat yksiketjuisia ja hyvin emäksisiä. Naudan aivoista on eristetty kolme tällaista proteiinia ja niille on annettu nimet HPPM-1, HBBM-2 ja HBBM-3, joiden molekyylipainot ovat vastaavasti 18, 16 ja 15 kd. Proteiineilla on yhteinen 19 aminohapon N-terminaalinen sekvenssi, joka poikkeaa muiden proteiinien vastaavasta.

Samanlaiset kolme proteiinia on myös eristetty ihmisen aivokudoksesta ja niillä on sama N-terminaalinen sekvenssi ja samantyyppinen mitogeeninen aktiivisuus kuin naudan HBBM:illä. Rotan ja kanan aivojen on myös havaittu sisältävän HBBM:iä.

Proteiinit eristetään ja puhdistetaan aivokudoksesta yhdistelmällä toimenpiteitä, joihin sisältyvät uuttaminen kudoksesta, hepariiniaffiniteettikromatografia ja kationinvaihtokromatografia. Puhdistuksen apumenetelmänä voidaan käyttää hydrofobista kromatografiaa (hydrophobic interaction chromatography).

Viime vuosina on eristetty ja karakterisoitu lukuisia proteiinikasvutekijöitä. Näihin kasvutekijöihin sisältyvät epidermaalinen kasvutekijä, fibroblastien kasvute-

kijät, insuliinin kaltaiset kasvutekijät, transformoivat kasvutekijät, verihiutaleperäinen kasvutekijä ja interleukiinit. Fibroblastien kasvutekijän (FGF) esimerkiksi puhdisti ensimmäisenä Gospodarowich vuonna 1975 naudan aivolisäkkeistä ja sen arvioitu molekyylipaino oli 13 000 daltonia (kirjallisuusviite 1).

FGF puhdistettiin myöhemmin naudan aivoista (2). FGF voidaan eristää joko happamana ("aFGF") tai emäksisenä ("bFGF") muotona käytetyistä eristysmenetelmistä riippuen (3, 4). Naudan aivolisäkkeen bFGF:n (5) sekä naudan ja ihmisen aivojen aFGF:n (6, 7) täydellinen aminohapposekvenssi on julkaistu, samoin kuin naudan ja ihmisen aivojen bFGF:n N-terminaaliset sekvenssit (5). Naudan aivolisäkkeen ja naudan aivojen bFGF:n N-terminaaliset sekvenssit ovat identtiset.

Nyt on havaittu, että puhdistettaessa FGF:iä aivokudoksesta käyttämällä hepariini-Sepharose-affiniteettikromatografiaa, mukana voi olla myös merkittävä määrä tuntemattomia proteiineja. Koska erityisen korkealla affiniteetilla hepariinin sitoutuva proteiinit ovat harvinaisia, ryhdyttiin näitä tuntemattomia proteiineja tutkimaan edelleen. Tämä tutkimus paljasti näiden proteiinien olevan HBBM:iä, jotka eroavat FGF:istä N-terminaalisen sekvenssinsä ja aminohappokoostumustensa puolesta.

Niinpä tämän tutkimuksen päämääränä onkin eristää, puhdistaa ja karakterisoida aivokudoksen HBBM:t. Tämän keksinnön lisäpäämääränä on näyttää toteen HBBM:ien fysiologinen aktiivisuus.

Kuvio 1 kuvaa fraktioinnin, jossa 400 ml kationinvaihtokromatografiasta peräisin olevaa 0,6 M NaCl-eluaattia fraktioidaan käyttämällä hepariini-Sepharose-affiniteettikromatografiaa. Vaakasuora palkki A osoittaa ne fraktiot, joissa HBBM:t olivat ja joille tämän jälkeen lisäpuhdistamiseksi tehtiin uusi kromatografia. Vaakasuora

palkki B osoittaa ne fraktiot, jotka käänteisfaasi-HPLC-analyysillä määritetynä sisälsivät aFGF:ää.

Kuvio 2 kuvaa tulokset mono-S-kationinvaihtokromatografiasta 20 ml:lla materiaalia, joka eluoitui hepariini-Sepharose-affiniteettikromatografiasta (kuten vaakasuoralla palkilla A kuviossa 1 on osoitettu). Nuolet osoittavat aFGF- ja bFGF-standardien eluutiokohdat. Numerot kromatogrammissa tarkoittavat HBBM-1:tä, -2:ta ja -3:a. Vaakasuora palkki osoittaa ne fraktiot, joissa HBBM:t olivat ja jotka yhdistettynä tai yksittäin käytettiin jatkopuhdistukseen/karakterisointiin.

Kuvio 3 kuvaa HBBM:ien käänteisfaasi-HPLC:n. Pieni erä mono-S:llä puhdistettujen HBBM:ien yhdistelmää (huiput 1-3, kuten vaakasuoralla palkilla kuviossa 2 on osoitettu) saatettiin käänteisfaasi-HPLC:hen. Yksittäiset huiput identifioitiin ja luettiin täsmällisesti määriteltyjen mono-S-fraktioiden tiliin analysoimalla pieniä eriä mono-S-kromatografian fraktioista (kuten kuviossa 2 on osoitettu vaakasuoran palkin lohkoilla) riippumattomissa käänteisfaasi-HPLC-ajoissa. Huiput 1-3 johtuvat vastaavasti HBBM-1 stä, HBBM-2:sta ja HBBM-3:sta.

Kuvio 4 kuvaa HBBM:ien analyysin SDS-PAGE:lla seuraavasti: Proteiinistandardit (lysotsyymi, 14,4 kd; trypsiiniinhibiittori, 21,5 kD; hiilihappoanhydraasi, 31 kD; ovalbumiini, 45 kD, seerumin albumiini, 66,2 kD; Kaista 2: HBBM-1; Kaista 3: HBBM-2; Kaista 4: HBBM-3.

Kuvio 5 kuvaa HBBM-3:n uudelleenkromatografian mono-S-kationinvaihtopylväällä. Kuviossa 2 kuvatusta kromatografiasta peräisin olevat HBBM-3:a sisältävät fraktiot yhdistettiin, laimennettiin kolminkertaisesti lähtöpuskurilla, ja laimennetuille näytteille tehtiin kromatografia mono-S-pylväällä kuviossa 2 esitettyjen olosuhteiden kanssa identtisissä olosuhteissa. Pienistä eristä reaktioita testattiin niiden kyky kiihdyttää naudan aortankaaren endoteelisolujen kasvua (histogrammi). aFGF:n ja bFGF:n

retentioajat on osoitettu nuolilla. Vaakasuora palkki on merkkinä niistä fraktioista, jotka jälkeenpäin käytettiin HBBM-3:n konsentroimiseen.

Kuvio 6 kuvaa annos-vaste-analyysillä saadun HBBM-3:n ja HBBM-1: biologisen aktiivisuuden sekä vertailun FGF-aktiivisuuteen. HBBM-3:n ja HBBM-1:n kyky kiihdyttää naudan aortankaaren endoteelisolujen kasvua testattiin. Ylempi kaavio: HBBM-3; Alempi kaavio: HBBM-1. Kummassakin kaaviossa, yhtenäinen viiva: HBBM; katkoviiva: aFGF; pisteviiva: bFGF.

Kuvio 7 kuvaa HBBM-3:n kromatografian hydrofobisen vuorovaikutuksen pylväästä. Pienelle erälle mono-S:llä konsentroitua HBBM-3:a tehtiin HIC:kromatografia. Nuolet osoittavat aFGF:n ja bFGF:n retentioajat identtisissä kromatografisissa olosuhteissa. Pienistä eristä pylvään fraktioita testattiin niiden kyky kiihdyttää naudan aortankaaren endoteelisolujen proliferaatioita. Tulokset ilmaistaan kussakin testikupassa kasvaneiden solujen lukumääränä.

Tämän keksinnön mukaset uudet kasvutekijät ovat yksiketjuisia, emäksisiä, hepariiniin sitoutuvia aivojen mitogeenejä. HBBM:iä on edentifioitu kaikkien testattujen lajien, mukaanlukien ihmisen, naudan, rotan ja kanan, aivokudoksista. Tähän jakautumiseen perustuen uskotaan, että myös muut lajit sisältävät HBBM:iä.

HBBM:ien N-terminaaliset sekvenssit eroavat merkittävästi julkaistuista naudan ja ihmisen aivojen aFGF:n ja bFGF:n N-terminaalisista sekvensseistä. Ihmisen ja naudan HBBM:ien ensimmäisten 19 N-terminaalisen aminohapon sekvenssien on havaittu olevan identtiset. N-terminaaliset sekvenssit ovat kuten seuraava: Gly-Lys-Lys-Glu-Lys-Pro-Glu-Lys-Lys-Val-Lys-Lys-Ser-Asp-Cys-Gly-Glu-Trp-Gln. Rotan sekvenssi on identtinen, lukuunottamatta kysteiinitähdettä asemassa 15, koska kysteiinin mukanaoloa tai puuttumista ei määritetty. Se tosiasia, että mitään muuta aminohappoa ei asemasta 15 identifioitu, on kutienkin yhtäpitävä kys-

teiinin oletetun läsnäolon kanssa. Tähän mennessä on sekvenssoitu kanan HBBM:ien kymmenen ensimmäistä N-terminaalista tähdettä; ne ovat identtiset ihmisen, naudan ja rotan vastaavien kanssa.

HBBM:t on löydetty kolmena muotona naudan aivojen kudoskesta. HBBM-1:n, HBBM-2:n ja HBBM-3:n molekyylipainot ovat vastaavasti 18, 16 ja 15 kD. Niiden aminohappokoostumukset (määritetty kuten tässä on jäljempänä kuvattu) on esitetty jäljempänä taulukossa I ja ne myös eroavat naudan aivojen FGF:ien aminohappokoostumuksista (5, 6, 7).

Molekyylipainoihin ja identtisiin N-terminaalisiin sekvensseihin perustuen päätellään, että kolme HBBM:ää ovat mahdollisesti erilaisia C-päistään. Olemassa oleva tulosaineisto viittaa vahvasti siihen, että HBBM-2 ja HBBM-3 ovat HBBM-1:n C-päästä lyhennettyjä muotoja, joista puuttuu vastaavasti noin 13 ja 29 aminohappoa.

Näiden kolmen muodon välisten suhteiden havaittiin vaihtelevan eri eristyserien välillä. Kvantitatiiviseen aminohappoanalyysiin perustuen arvioitiin kuitenkin HBBM:ien eristyksen keskimääräiseksi kokonaissaanoksi HBBM-1:lle, HBBM-2:lle ja hBBM-3:lle vastaavasti noin 30, 10 ja 40 µg/kg aivokudosta. Suhteet voivat olla riippuvaisia muuttuvista tekijöistä kudosta säilytettäessä ja uutettaessa, erityisesit proteolyyttistä. Proteolyysi kudoksen uuton aikana voi aiheuttaa HBBM-1:n, HBBM-2 muodoista suurimman, lyhentymistä karboksipäästä, mikä tuottaisi vaihtelevia määriä HBBM-2:ta ja HBBM-3:a.

Menetelmä tämän keksinnön mukaisten uusien HBBM:ien eristämiseksi olennaisesti puhtaassa muodossa lähteenä olevasta aivokudoksesta käsittää seuraavan toimenpiteiden sarjan:

(a) uuttaminen lähteenä olevasta kudoksesta;

(b) kationinvaihtokromatografia;

(c) hepariiniaffiniteettikromatografia;

(d) kationinvaihtokromatografia; ja, mahdollisesti,

(e) hydrofobinen kromatografia.

Uuttaminen toteutetaan käsittelemällä kudosta perättäisesti 0,15 M ammoniumsulfaatilla, pH:n säädöllä 4,5:een suolahapolla, sekoituksella ja sentrifugoinnilla, ammoniumsulfaattikäsittelyllä sen jälkeen kun pH on säädetty natriumhydroksilla arvoon 6-6,5, sekoituksella ja sentrifugoinnilla, mitä seuraa dialyysi ja sentrifugointi.

Ensimmäinen kationinvaihtokromatografiavaihe käsittää eräadsorption karboksimetyyli-Sephadex-pylvääseen, mitä seuraa pesu 100 mM natriumfosfaattipuskurilla pH:ssa 6 sekä eluutio puskurilla 100 mM natriumfosfaatti, pH 6,0/0,6 M NaCl.

Hepariiniaffiniteettikromatografia tehdään hepariini-Sepharose (Pharmacia) -pylväässä pesemällä puskurilla, jossa on 10 mM Tris-HCl, pH 7,0/0,6 M NaCl, mitä seuraa eluutio lineaarisella gradientilla pitoisuudesta 0,6 M pitoisuuteen 2k,0 m NaCl puskurissa 10 mM Tris-HCl, pH 7,0.

Toinen kationinvaihtokromatografiavaihe tehdään mono-S (Pharmacia) -pylväässä, jota tasapainotetaan jasen jälkeen kun näyte on ladattu sisään - pestään 50 mM natriumfosfaatilla, pH 6,8, mitä seuraa HBBM:ien eluutio lineaarisella gradientilla 0:sta pitoisuuteen 0,6 M NaCl 50 Mm natriumfosfaatissa, pH 6,8.

Hydrofobinen kromatografia -vaihe käsittää HIC-pylvään (LKB-Ultrapac-TSK-Phenyl-5PW) esitasapainotuksen puskurilla, jossa on 100 mM natriumfosfaatti, pH 7,0, ja 1,5 M natrijmsulfaatti, mitä seuraa eluutio lineaarisella gradientilla pitoisuudesta 1,5 M pitoisuuteen 0,6 M natriumsulfaatti.

Vaikka HBBM:t voidaankin helposti ja kvantitatiivisesti erottaa FGF:istä käänteisfaasi-HPLC:llä, tämä menettelytapa alentaa käänteisfaasi-HPLC:ssä käytettyjen olosuhteiden vuoksi FGF:ien biologista aktiivisuutta. Tä-

män vuoksi kehitettiin edellä esitetty menetelmä HBBM:ien ja FGF:ien erottamiseksi ja eristämiseksi biologisesti aktiivisessa muodossa vertailevaa testaamista varten. Käänteisfaasi-HPLC:n käyttö rajoittui hepariini-Sepharose-affiniteettikromatografiasta ja kationinvaihtokromatografiasta saaduista fraktioista otettujen pienten näytteiden testaukseen HBBM:ien ja FGF:ien läsnäolon toteamiseksi. Käänteisfaasi-HPLC-vaiheet tehtiin C4-pylväässä (The Separations Group), jota eluoitiin matalalla asetonitriiligradientilla 0,1 %:issessa trifluorietikkahapossa.

HBBM:ien biloginen aktiivisuus on varmistettu testeillä, jotka osoittavat endoteelisolujen mitogeneesin induktion. Vaikka HBBM-2:ta ei testattukaan, viittaa HBBM-1:lle ja HBBM-3:lle osoitettu aktiivisuus siihen, että myös HBBM-2:lla on tämä aktiivisuus. Testaus tehtiin naudan aortankaaren endoteelisoluilla.

Kolme erillistä testiä pantiin täytäntöön, jotta saatiin sekä varmistettua mitogeenisen aktiivisuuden olemassaolo että osoitettua aktiivisuuden johtuvan HBBM:istä eikä FGF:istä.

Ensin yhdistettiin mono-S-kromatografian HBBM-3:a sisältävät eluenttifraktiot, tehtiin niille uusi kromatografia mono-S-pylväässä ja testattiin sitten niiden kyky kiihdyttää naudan verisuonten endoteelisolujen kasvua. Vertailun vuoksi testattiin myös aFGF- ja bFGF-näytteet. Kuvio 5 esittää tämän testin tulokset.

Seuraavaksi käytettävissä oleville HBBM-3-fraktioille tehtiin näytteiden konsentroimiseksi uusia kromatografia mono-S-pylväässä käyttämällä jyrkempää gradienttia ja alempaa virtausnopeutta. HBBM-3:a verrattiin sitten aFGF:n ja bFGF:n kanssa annos-vasteanalyyseillä. Kuvion 6 ylempi kaavio esittää tämän testin tulokset. Tämä menettely toistettiin sitten HBBM-1:lle. Nämä tulokset on esitetty kuvion 6 alemmassa paneelissa.

Lopuksi Mono-S-kromatografialla konsentroidut HBBM-3-fraktiot laitettiin hydrofobisen vuorovaikutusken pylvääseen, jolla on erilaiset valikoivuudet kuin mono-S-pylväällä. Kuvio 7 esittää tämän testin tulokset.

Nämä testit todistavat, että HBBM:t kiihdyttävät viljeltyjen naudan verisuonten endoteelisolujen proliferaatiota annoksesta riippuvaisesti. ED_{50} oli noin 20 ng/ml HBBM-3:lle ja 180 ng/ml HBBM-1:lle. ED_{50} laskettiin seuraavasti: ED_{50} laskettiin seuraavasti: ED_{50} = kons. [solujen lukumäärä (annos = max)/2]. Nämä mitogeenit ovat verrattavissa FGF:iin ajateltaessa niiden biologista aktiivisuutta ja korkeaa affiniteettia hepariiniin. HBBM-1 ja HBBM-3 ovat yhtä tehokkaita kuin aFGF. ED_{50}-arvot ovat alueella 50-150 ng/ml.

Testitulokset osoittavat myös sen, että HBBM-3:een yhteydessä oleva biologinen aktiivisuus oli todellista eikä se johtunut FGF-kontaminaatiosta. Korkean erotuskyvyn mono-S-kromatografia erottaa HBBM-3:n ja FGF:t selvästi, kuten kuviossa 5 on esitetty, ja myös toinen, valikoivuuksiltaan erilainen korkean erotuskyvyn tekniikka, hydrofobinen kromagografia, erottaa ne selvästi, kuten kuviossa 7 on esitetty.

Lisäksi HBBM:t eivät kvantitatiivisella käänteisfaasi-HPLC:llä määritettynä sisältäneet mitattavissa olevia määriä aFGF:ää. Lisätoisteeksi sille, että aktiivisuus joutui HBBM:istä, HBBM:t eivät immunotäplämäärityksissä (immuno-dot assay) olleet ristiinreagoivia käytettäessä polyklonaalisia vasta-aineita, jotka oli tuotettu sellaisia synteettisiä peptidejä vastaan, jotka vastaavat aFGF:n 15 N-terminaalista tähdettä (1-15) ja bFGF:ää (50-50), jälkimmäisen antaessa aFGF:n kanssa ritiinreagoivan vasta-aineen (vasta-aineet oli antanut käyttöön A. Baird, Salk Institute; kasvutekijöiden nimistö kirjallisuusviitteiden 5 ja 7 mukainen). Lopuksi HBBM- ja aFGF-preparaattien konsentraatiot määritettiin huolellisesti kvantitatiivisella

aminohappoanalyysillä perustaksi tehokkuusvertailuille (kuvio 6). Näihin mittauksiin perustuen olisi luontaisesti inaktiivisen HBBM-3:n täytynyt olla kontaminoitunut samansuuruisella määrällä aFGF:ää, jotta se olisi aiheuttanut havaitun biologisen vasteen. Tulokset sulkevat pois tällaisen kontaminaation mahdollisuuden. Kaiken kaikkiaan näiden tutkimusten tulokset osoittavat selvästi, että HBBM-3:n aktiivisuus ei ole seurausta aFGF:n kontaminaatiosta.

Useat erilaiset todisteet osoittavat lisäksi, että HBBM-3:n aktiivisuus ei johdu bFGF-kontaminaatiosta. Teoriassa HBBM-3:n kontaminaatio muutamalla prosentilla bFGF:ää riittäisi aiheuttamaan havaitut aktiivisuudet. Tällaisesta kontaminaatiosta ei kuitenkaan ole viitteitä, koska HBBM:t ja bFGF erottuvat suureksi osaksi hepariini-Sepharose-kromatografiassa. Lisäksi HBBM-3 ja bFGF erottuvat hyvin myös mono-S-kromatografiassa (kuvio 5). Kun HBBM-3 lopuksi saatettiin kromatografiaan kolmannessa hyvin erottelukykyisessä systeemissä, hydrofobisessa kromatografiassa, oli ilemsitä, että biologinen aktiivisuus oli yhä yhteydessä HBBM-3:een eikä hyvin erottuneisiin bFGF:iin (kuvio 7). Ei ole olemassa mitään todisteita sille, että nämä kaksi itsenäistä yksikköä edes vähäisissä määrin puhdistuisivat yhdessä kolmessa suurelta osin eriluonteisessa ja erottelukykyisessä kromatografiasysteemissä.

Näihin tuloksiin perustuen päätellään, että HBBM-3:n aktiivisuus on todellista eikä tulosta kontaminaatiosta tunnetuilla hepariiniin sitoutuvilla FGF:illä.

HBBM:t voidaan lisäksi erottaa FGF:istä sillä, että näiden kahden proteiiniryhmän väliltä puuttuu aminohapposekvenssihomologia. Aikaisemmin kuvattujen N-terminaalisia sekvenssejä koskevien erojen lisäksi ei tällä hetkellä käytettävissä oleva sekvenssi-informaatio (noin 75 HBBM-

3:n 130 tähteestä) osoita minkäänlaista sekvenssihomologiaa julkaistun FGF:ien 146 tähteen sekvenssin (5) kanssa.

Ihmisten HBBM:ien mitogeenisen aktiivisuduen havaittiin yleensä olevan mahdoton erottaa naudan HBBM:n vastaavasta, vaikka ihmisen mitogeenit rajallisista käytettävissä olevista materiaalimääristä johtuen karakterisoitiinkin vähemmän laajasti. Tämä on sopusoinnussa muiden havaintojen kanssa: identtinen aminopään sekvenssi, kolmen muodon läsnäolo sekä retentiokäyttäytyminen ioninvaihto-, hepariini-Sepharose- ja käänteisfaasikromatografiassa.

N-terminaalisten sekvenssien identtisyys useiden eri HBBM-lähteiden kesken viittaa siihen, että evoluutiopaine on saattanut estää mutaatiot, ainakin evoluutiossa linnuista nisäkkäisin. Sekvenssin säilymistä evoluutiopaineen tuloksena uumoillaan vahvasti monien sellaisten hyvin tunnettujen, biologisesti aktiivisten proteiinien kohdalla, jotka ovat hyvin homologisia eri lajien välillä.

HBBM:t eivät olleet läsnä naudan munuaiskudoksessa, joka uutetiin käyttämällä samaa menettelyä kuin aivokudoksella. HBBM:t ovat siis uusia proteiineja, joilla saattaa myös olla tehtävä kudoksen, erityisesti hermokudoksen, muodostuksessa, ylläpidossa ja/tai korjauksessa.

Perusteet tälle väittämälle HBBM:ien tehtävästä ovat seuraavanlaiset: (1) HBBM:illä on samanlainen biologinen ja hepariiniin sitoutumisen aktiivisuus kuin aFGF:llä; (2) HBBM:t ovat ominaisia avioilla; (3) aivoista havaitaan suurempia määriä HBBM:iä kuin aFGF:ää; ja (4) aFGF:llä ja bFGF:llä tiedetään olevan hyvin huomattavia hermostoon liittyviä aktiivisuuksia, kuten esimerkiksi neurotrofista (neuronien hengissäpysyminen) aktiivisuutta in vivo ja in vitro, ne ovat mitogeenisiä neuroblasteille ja hermotukisoluille, ne edistävät neuriittien uloskasvua ja saavat aikaan aivoille ominaisten proteiinien synteesiä.

Vaikka HBBM:ien ja FGF:ien proteiinirakenteet ovatkin erilaisia, niiden samankaltaisuus hepariiniin sitoutumisen ja biologisen aktiivisuuden suhteen viittaa siihen, että molemmat mitogeenien ryhmät vaikuttavat samankaltaisella mekanismilla. Mitogeenit voisivat esimerkiksi sitoutua solun pintaan tai solunulkoisiin, matriisiin liittyneisiin hepariinin kaltaisiin rakenteisiin.

Tämän keksinnön mukaiset terapeuttiset koostumukset pitävät sisällään HBBM:t, joka yksittäin tai seoksina, dispergoituna tavanomaiseen farmaseuttisesti soveliaaseen nestemäiseen tai kiinteään kantajaan. Terapeuttiset koostumukset voidaan antaa paikallisesti voiteina, huuhteluesteinä ja niin edelleen, tai suun kautta sellaisissa muodoissa kuin esimerkiksi tabletteina, kapseleina, hajaantuvina jauheina (dispersible powder), granuloina tai suspensioina, tai parenteriaalisesti steriileinä injektoiliuoksina tai -suspensioina. Näitä terapeuttisia koostumuksia voidaan antaa ihmis- ja eläinpotilaille angiogeneesin sekä hermotulehduksen korjauksen ja ylläpidon edistämiseksi.

Esimerkki

Tässä esimerkissä esitetään yksityiskohtaisesti naudan HBBM:n eristys ja karakterisointi. Ihmismateriaalia käyttämällä saadut tulokset olivat hyvin samankaltaiset eikä niitä kuvata yksityiskohtaisesti ellei eroja naudan materiaaliin havaittu.

1) Kudoksen uuttaminen

Ihmisaivot saatiin alle 24 tunnin kuluttua kuolemasta Zurichin yliopiston patologian osastolta. Naudan aivot saatiin teurastamolta. Kudokset jäähdytettiin välittömästi niiden vastaanottamisen jälkeen, säilytettiin -80 °C:ssa ja käsiteltiin kahden viikon sisällä niiden vastaanottamisesta. Kerran uutetiin 3-5 kg:n eriä aivokudosta.

Aivokudos uutettiin noudattamalla Gospodarowicin ja hänen työtovereittena kehittämää menettelytapaa (2) kuvatulla tavalla (6,10): Jäähdytetyt aivot murskattiin vasaralla. Kuudensadan gramman kudoseriä homogenisoitiin 1,2 l:ssa 0,15 M ammoniumsulfaattia 3 minuuttia Waring Blender -homogenisaattorissa. Homogenaatin pH säädettiin väkevällä HCl:llä pH-arvoon 4,5 ja seosta homogenisoitiin edelleen käyttämällä Polyton-homogenisaattoria kunns kudos oli hajonnut hienojakoiseksi. Homogenaatti uutettiin sitten sekoittamalla suspensiota 2 tuntia 4 °C:ssa, mitä seurasi 60 minuutin sentrifugointi 4 °C:ssa nopeudella joko 11 500 rpm (GSA-roottori) tai 9 000 rpm (GS-3-roottori) solujen ja kudosjätösten poistamiseksi. Supernatantin pH säädettiin naOH:lla pH-arvoon 6-6,5, ammoniumsulfaattia (230 g/l) lisättiin hitaasti ja tuloskena olevaa suspensiota sekoitettiin vähintään 30 minuuttia 4 °C:ssa ja se sentrifugoitiin jälleen edellä kuvatulla tavalla. Sakka heitettiin pois. Supernatanttiin lisätiin hitaasti lisää ammoniumsulfaattia (300 g/l), suspensiota sekoitettiin vähintään 30 minuuttia 4 °C:ssa ja se sentrifugoitiin kuten edellä. Tuloksena oleva sakka liuotettiin kylmään veteen (100 ml lähtömateriaalin kg:aa kohti) ja dialysoitiin 4 °C:ssa 20 tuntia 20 l:aa vettä vastaan käyttämällä Spectrapor-kalvoa (molekyylipainon mukainen pidätysraja 6-8 kD, läpimitta 31,8 mm). Dialysoitu liuos sentrifugoitiin jälleen saostuneen materiaalin poistamiseksi ja supernatantti saatettiin sen johtokyvyn määrittämisen jälkeen kromatografiaseen puhdistukseen (katso alla).

2) Kationinvaihtokromatografia

Edellä olevasta menettelystä tuloksena oleva kudosuute (noin 150 ml kutakin aivokudoksen kg:aa kohti) saatettiin eräadsorptioon/eluutioon kationinvaihtokromatografialla seuraavasti: Näyte laimennettiin tarvittavalla määrällä vettä johtokyvyn saamiseksi puskuriliuoksen 0,1 M natriumfosfaatti (pH 6)/0,15 M NaCl johtokyvyn alapuolel-

la. Sitten näyte ladattiin karobksimetyyli-Sephadex-pylvääseen (5,5 x 3 cm), jota esitasapainotettiin liuoksella 100 mM natriumfosfaatti (pH 6)/0,15 M Cl. Pylvästä pestiin tasapainotuspuskurilla ja proteiinifraktio eluoitiin liuoksella 100 mM natriumfosfaatti, pH 6,0/0,6 M NaCl ja kerättiin talteen. Kaikki työvaiheet tehtiin huoneen lämpötilassa ja virtausnopeudella 500 ml/tunti.

3) Hepariini-Sepharose-affiniteettikromatografia

Kationinvaihtokromatografiasta saatu 0,6 M NaCl -eluaatti ladattiin hepariini-Sepharose-pylvääseen (Pharmacia, 5 x 1,5 cm) virtausnopeudella 125 ml/tunti. Pylväs pestiin 200 ml:lla puskuria, jossa oli 10 mM Tris-HCl, pH 7,0(0+,6 M NaCl, kunnes pylväseluaatin absorbanssi 280 nm:ssä tuli merkityksettömäksi. Pylvääseen sitoutunut proteiini eluoitiin 120 minuutin lineaarisella gradientilla pitoisuudesta 0,6 M pitoisuuteen 2 M NaCl puskurissa 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, virtausnopeudella 35 ml/h. Kromatografia tehtiin huoneen lämpötilassa käyttäen LKB:n peristalttista pumppua ja alhaisella paineella toimivaa LKB:n ohjelmoitavaa gradientinmuodostajaa. Kerättiin 1,4 ml:n fraktioita ja pienet erät saatettiin biomääritykseen.

Tämän hepariini-Sepharose-kromatografian tulokset on esitetty kuviossa 1. Ne fraktiot, jotka saatettiin jatkopuhdistukseen jäljempänä kuvattuja toimenpiteitä käyttäen, on osoitettu vaakasuoralla palkilla A. Ne fraktiot, jotka sisälsivät aFGF:ää, eluoituivat välillä 1,1-1,3 M NaCl (hepariini-Sepharose-pylvään yksittäisten fraktioiden HPLC-analyysillä määritettynä; tuloksia ei ole esitetty) ja vastaavat 1-1,2 m NaCl:lla eluoituvan suuremman huipun olkapäätä sekä vaakasuoraa palkkia B. Käänteisfaasi-HPLC-analyysi tehtiin C4-pylväällä (25 x 0,46 cm, 5 µm:n partikkelikoko, 300 ångströmin huokoskoko, The Separations Group, Hesperia, CA). Proteiinit eluoitiin matalalla asetonitriiligradientilla (10 %/tunti) 0,1 %:isessa trifluo-

rietikkahapossa virtausnopeudella 0,7 ml/minuutti. Hepariini-Sepharose-kromatografia tehtiin honeen lämpötilassa.

4) Mono-S-kationinvaihtokromatografia

Jotta epäpuhtautena oleva aFGF saataisiin erotettua muusta proteiinimateriaalista, 1-1,2 M NaCl:ssa eluoituvat fraktiot yhdistettiin, niitä laimennettiin riittävästi puskurilla, joss aoli 50 mM natriumfosfaatti, pH 6,8, (niiden ioninväkevyyden alentamiseksi suunnilleen laimennusliuoksen ioniväkevyyteen) ja ne saatettiin kationinvaihtokromatografiaan mono-S-pylväässä (Pharmacia), joka oli tasapainotettu 50 mM natriumfosfaatilla, pH 6,8. Tämä materiaali pumpattiin mono-S-pylvääseen (Pharmacia), jota oli tasapainotettu 50 mM natriumfosfaatilla, pH 6,8. Kun pylvästä oli pesty samalla puskurilla niin kauan, että absorbanssi 210 nm:ssa saavutti vähimmäisarvon, proteiini eluoitiin gradientilla 0:sta pitoisuuteen 0,6 M NaCl 50 mM natriumfosfaatissa, pH 6,8.

Kuten kuviossa 2 on esitetty, näissä olosuhteissa mono-S-pylväästä eluoitui useita hyvin erottuvia huippuja. Kukin huippu analysoitiin käänteisfaasi-HPLC:llä käyttäen LKB:n HPLC-laitteistoa huoneen lämpötilassa virtausnopeudella 0,7 ml/minuutti.

Ensimmäinen ja kvantitatiivisesti vähäinen huippu, joka eluoitui mono-S-pylväästä 0,3 M NaCl:ssa, vastaa aFGF:ää, mitä todistaa yhteiseluoituminen vertailustandardina olleen autenttisen aFGF:n kanssa samassa systeemissä identtisissä olosuhteissa (katso nuoli kuviossa 2), kuten myös yhteiseluoituminen käänteisfaasi-HPLC:ssä aiemmin kuvatulla C4-pylväällä, jota eluoitiin hyvin erotteluky-kyisissä, matalan gradientin olosuhteissa (tuloksia ei ole esitetty). aFGF:n olemassaoloa tässä mono-S-pylvään fraktiossa odotettiin, koska lähtöfraktion hepariini-Sepharose-kromaotgrafiasta tiedetään sisältävän aFGF:ää. Valtaosa materiaalista eluoitui mono-S-pylväästä noin 0,45-0,65 M NaCl:ssa kolmena toisistaan suhteellisen hyvin

erottuneena huippuna. Koska näiden huippujen määritettiin sisältävän HBBM:ää, kuten tässä myöhemmin kuvataan, niille annettiin niiden eluutiojärjestyksessä nimet HBBM-3, HBBM-2 ja HBBM-1 (kuvio 2). Ihmisen HBBM:n eluutiokäyttäytyminen mono-S-pylväässä on yleispiirteiltään samanlainen, mutta sitä on tutkittu naudan HBBM:ää huonommin.

Kromatografisen retention suhteen HBBM:t olivat selvästi erotettavissa eivät ainoastaan aFGF:stä vaan myös bFGF:stä (kuvio 2).

Lisäksi, analysoitaessa käänteisfaasi-HPLC:llä (kuvio 3), HBBM:ien havaittiin myös eroavan selvästi FGF:istä retentioaikojen suhteen (tuloksia ei ole esitetty). Lopuksi, käänteisfaasi-HPLC erotti kaikki kolme HBBM:ää toisistaan (kuvio 3) ja antoi siten käyttöön keinon niiden preparoimiseksi hyvin puhtaina (kuten rakenteellista kuvaamista varten tarvitaan) sekä keinon niiden suhteellisen yksiselitteiseksi identifioimiseksi.

Ihmisaivot antoivat myös kolme HBBM-muotoa, joiden käänteisfaasi-HPLC-eluutiokaaviot olivat niiden naudasta peräisin olevien vastineiden eluutiokaavioiden kanssa identtiset.

5) Hydrofobinen kromatografia

Mielenkiintoisia näytteitä sisältävät fraktiot mono-S-kromatografiasta tehtiin 1,5 M:isiksi natriumsulfaatin suhteen ja laitettiin HIC-pylvääseen (LKB Ultropac TSK-Phenyl-5PW, 7,5 x 75 mm), jota esitasapainotettiin puskurilla 100 mM natriumfosfaatti, pH 7,0/1,5 M natriumsulfaatti. Proteiineille tehtiin kromatografia huoneen lämpötilassa käyttämällä 30 minuutin lineaarista gradienttia pitoisuudesta 1,5 M pitoisuuteen 0,6 M natriumsulfaatti virtausnopeudella 1,0 ml/min. Hydrofobinen kromatografia on erottelusysteemi, jonka valikoivuudet ovat varsin erilaisia kuin mono-S-kromatografialfla. Niin muodoin HBBM:ien erottumienn FGF:istä HIC:llä (kuten kuviossa 7 esitetään) vahvistaa sitä mono-S-kromatografian tulosta

(kuten kuviossa 5 esitetään), että HBBM:t ovat erilaisia kemiallisia yksiköitä kuin FGF:t.

6) N-terminaalisen aminohappojärjestyksen analyysi

Tavallisesti sekvenssianalyysit pantiin toimeen ilman proteiinien kemiallista muuttamista. Joitakin HBBM:ien N-terminaalisen aminohapposekvenssin analyysejä toimeen pantaessa HPLC-puhdistettujen proteiinien kysteiinitähteet kuitenkin valmistavana vaiheena käsiteltiin Gautschi-Sovan ym:iden menettelytavan (6) mukaisesti. Lyhyesti sanottuna kysteiinitähteet pelkistettiin viisinkertaisella molaarisella ylimäärällä ditiotreitolia ja alkyloitiin karboksimetylaatiolla käyttämällä kolminkertaista molaarista ylimäärää jodi-[2-$_{14}$C]-etikkahappoa.

Proteiinien (100-500 pmol) N-terminaalisen aminohapposekvenssin analyysit tehtiin Applied Biosystems (Foster City, CA) Model 470A -proteiinien kaasu/nestefaasimikrosekvenssointilaitteella kuten Esch ym ovat kuvanneet (5). Lisäksi aminohappojen fenyylitiohydantoiinijohdannaiset (PTH-johdannaiset) identifioitiin käänteisfaasi-HPLC:llä Applied Biosystems Model 120A On-line -PTH-aminohappoanalysaattorilla. Molemmat menettelyt toteutettiin laitteen valmistajan toimintaohjeiden mukaisesti käyttämällä Appolied Biuosystemsin toimittammia kemikaaleja.

Keikkien kolmen HBBM:n N-terminaalisten sekvenssien havaittiin olevan identtisiä toistensa kanssa ensimmäisiten 19 aminohapon osalta. Sekvenssiksi määritettiin Gly-Lys-Lys-Glu-Lys-Pro-Glu-Lys-Lys-Val-Lys-Lys-Ser-Asp-Gys-Gly-Glu-Trp-Gln. Ihmisen HBBM:illä (analysoituna mahdollisesti seoksena) havaittiin olevan sama N-terminaalinen sekvnessi kuin naudan HBBM:illä.

Samalla kun sekvenssointitiedot selvästi osoittavat, että naudan kolme HBBM-proteiinia ovat rakenteellisesti sukua toisilleen, antavat aminohappokoostumukset ja molekyyllipainot edelleen ymmärtää, että nämä proteiinit saattavat olla erilaisia karboksipään alueiltaan. Kaikki

tiedot ovat yhteen sopivia niiden vaihtoehtoisten tulkintojen kanssa, että sekä HBBM-2 että HBBM-3 ovat HBBM-1:n karboksiterminaalisesti lyhentyneitä muotoja, joiden karboksipäistä puuttuu vastaavasti 13 ja 29 aminohappoa.

7) HBBM:ien molekyylipainot

Proteiininäytteet analysoitiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla ("SDS-PAGE") kuten Gospodarowicz ytm. ovat kuvannett (9). Lyhyesti sanottuna molekyylipainomääritykset tehtiin SDS-PAGE:lla seuraavasti: 40-80 ng proteiinia sisältävät näytteet lisättiin näytepuskuriin, jonka koostumus oli 30 % (v/v) glyseroli, 0,2 M ditiotreitoli, 4 % (w/v) natriumdodekyylisulfaatti, 4 mM EDTA ja 75 mM Tris-HCl, pH 6,8. Näytteitä keitettiin 3 minuuttia ja sitten ne siirrettiin 20-%:iselle polyakryyliamidilevygeelille (1,5 mm), jossa oli 3 %:inen kokoava geeli. Elektroforeesi pekistämättömissä olosuhteissa tehtiin identtisellä tavalla, paitsi että ditiotreitoli jätettiin pois näytepuskurista. Kullekin geelille laitettiin myös proteiinistandardiseosta, joka sisälsi lysotsyymiä (14,4 kD), trypsiini-inhibiittoria (21,5 kD), hiilihappoanhydraasia (31 kD), ovalbumiinia (45 kD) ja seerumin albumiinia (66,2 kD). SDS-PAGE osoitti HBBM-1:n, -2:n ja -3:n molekyylipainon olevan vastaavasti 18, 16 ja 15 kD (kuvio 4). Molekyylipainot eivät olleet merkittävästi erilaisia tehtiinpä näytteille elektroforeesi sitten pelkistävän aineen läsnäollessa tai sen poissaollessa, minkä osoittaa proteiinien olevan yksiketjuisia polymeerejä. Ihmisen HBBM:ien molekyylipainoja ei vielä ole määritetty SDS-PAGE:lla.

8. Aminohappokoostumuksen analyysi

10-20 pmol:n proteiininäyte hydrolysoitiin Bohlenin ja Schroederin korkean herkkyyden metodologian (11) mukaisesti: Lyhyesti sanottuna proteiininäyte lisättiin hydrolyysiputkeen ja kuivattiin alipaineessa. 50 µl muuttumatta kiehuvaa HCl:aa, joka sisälsi 2 % (v/v) tioglykolihappoa,

lisättiin. Putkesta poistettiin sitten ilma suurella alipaineella (alle 50 mm Torr) ja jälkeen kun näyte oli jäädytetty nestemäisessä typessä. Siten näytteen annettiin sulaa sen ollessa vakuumin alaisena ja putki suljettiin liekittämällä.

Putkea hydrolysoitiin kuumentamalla 110 °C:ssa 20 tuntia. Hydrolyysin jälkeen putki avattiin, kuivattiin alipaineessa, ja jäännös liuotettiin 130 µl:aan sitraattipuskuria (0,067 natriumsitraatti, pH 2,20) ennen sen lataamista kationinvaihtokromatografiapylvääseen.

Proteiinihydrolysaateille tehtiin kromatografia Chromakon 500 -aminohappoanalysaattorilla (Kontron, Zurich, Sveitsi), joka oli varustettu polystyreeniperustaisella kationinvaihtopylväällä sekä korkean herkkyyden detektiota varten o-ftaalialdehydifluoresenssidetektiosysteemillä (11).

Aminohappojen kvantitointi tehtiin ulkoisen standardin menetelmällä käyttämällä aminohappostandardiseosta. Kvantitatiiviseen aminohappoanalyysiin perustuen HBBM:ien erityksen kokonaissaannoksi arvioitiin HBBM-1:lle, HBBM-2:lle ja HBBM-3:lle vastaavasti noin 30, 10 ja 40 µg/kg aivokudosta.

Näiden kolmen HPLC-puhdistetun proteiinin aminohappokoostumukset on esitetty taulukossa I.

TAULUKKO 1

Hepariiniin sitouvuvien aivojen mitogeenien aminohappokoostumukset

	HBBM-1	HBBM-2	HBBM-3
Molekyylipaino[1]	18000	16000	15000
Eluutiojärjestys			
- käänteisfaasi-HPLC	1	2	3
- mono-S	3	2	1
Aminohappo (tähteiden lukumäärä)			
Asparagiini & asparagiinihapppo	10	10	9
Treoniini	14	14	13
Seriini	9	9	6
Glutamiini & glutamiinihappo	23	20	17
Proliini	nd[2]	nd	nd
Glysiini	16	15	13
Alaniini	10	8	8
Kysteiini	nd	nd	nd
Valiini	4	4	4
Metioniini	1	1	1
Isoleusiini	2	2	2
Leusiini	8	7[3]	8
Tyrosiini	2	2	1
Fenyylialaniini	2	2	2
Histidiini	1	1	1
Lysiini	35	28	23
Tryptofaani	3	nd[3]	3
Arginiini	8	7[3]	8

[1]SDS-PAGE:lla määritettynä

[2]nd: ei määritetty

[3]sen hypoteesin mukaisesti, että C-pää on lyhentynyt, uskotaan seuraavien olevan oikeat arvot HBBM-2:lle: leusiini 8, tryptofaani 3, arginiin 8.

Aminohappokoostumukset on laskettu 3-5 määrityksestä.

Tulosaineisto aminohappokoostumuksista sopii yhteen sen kanssa, mikä on näiden kolmen proteiinin eluutiojärjestys mono-S:ssä vähiten emäksinen proteiini (HBBM-3) eluoituu ensimmäisenä, kun taas emäksisin proteiini (HBBM-1) eluoituu viimeisenä. Aminohappoanalyyseistä lasketut odotettavissa olevat molekyylipainot olivat jonkin verran alempia kuin ne, jotka oli määritetty SDS-PAGE:lla. Eroavuudet saattaa selittää proliini- ja kysteiinitähteet joita aminohappoanalyysissä ei kvantitoitu. N-terminaalisen sekvenssin analyysiin perustuen kuitenkin tiedetään, että proliinia ja kysteiiniä tosiasiassa on läsnä. Aminohappoanalyysejä ihmisen HBBM:istä ei vielä ole käytettävissä.

9) Biologinen aktiivisuus

Tiettyjen HBBM:ien kykyä aiheuttaa endoteelisolujen mitogeesi testattiin mittaamalla näiden proteiinien vaikutus Bohlenin ym:iden kuvaamalla tavalla viljeltyjen (2,10) naudan aorgankaaren endoteelisolujen proliferaatioon in vitro. Lyhyesti sanottuna alhaisessa tiheydessä (10000-20000 solua/35 mm:n malja) Dulbecco's modified Eagle's medium -kasvatusliuoksessa, joka sisälsi 10 % vasikan seerumia (Hyclone, Sterile Systems, Logan, UT), olevat naudan endoteelisolut ympättiin jäljempänä kuvatulla tavalla saaduilla pylväiden fraktioilla. Viljelmiä kasvatettiin 5 päivää siten, että läsnä oli eri pitoisuuksissa piniä eriä pylväiden fraktioista (lisättynä päivinä 0 ja 2), ja sitten solut laskettiin Coulter-partikkelilaskurissa. Testattujen proteiinien biologiset aktiivisuudet on kuvioissa 5-7 ilmaistu kullekin fraktiolle kussakin testikuopassa kasvaneiden verisuonten endoteelisolujen lukumääränä.

Erityisesti HBBM:ien aktiivisuutta verrattiin FGF:ien aktiivisuuteen. Julkaistuja menettelytapaoja (9, 12) käyttämällä eristettiin aFGF ja bFGF ja niiden autenttisuus varmistettiin N-terminaalisen sekvenssin analyysillä ja molekyylipainon määrityksellä (SDS-PAGE).

HBBM-3:n huippua vastaavat eluenttifraktiot mono-S-kromatografiasta, kuten kuviossa 2 on esitetty, yhdistettiin, laimennettiin kolminkertaisesti lähtöpuskurille ja niille tehtiin uusi kromatografia samassa syteemissä. Pienistä eristä näitä fraktioita testattiin niiden kyky kiihdyttää naudan verisuonten endoteelisolujen kasvua. Vertailutesti tehtiin aFGF:llä ja bFGF:llä. Tulokset, kuten kuviossa 5 on esitetty, osoittivat HBBM-3:n kiihdyttävän naudan endoteelisolujen mitogeenistä aktiivisuutta. Lisäksi HBBM-3 ja sen aktiivisuus oli erotettavissa FGF:istä.

Aktiivisuuden lisätestissä käytettävissä olevan HBBM-3-fraktiot konsentroitiin mono-S-pylväällä käyttämällä samaa puskurisysteemiä, kuin se, joka on kuvattu kuviolle 2, mutta jykempää gradienttia (0-1,0 M NaCl 20 minuutissa) ja alempaa virtausnopeutta (0,4 ml/minuutti). vertailevat annos-vaste-analyysit tehtiin aFGF:llä ja bFGF:llä.

Kuvion 6 ylempi kaavio osoittaa, että HBBM-3 kiihdytti naudan aortan endoteelisoluja annoksesta riippuvaisesti. ED_{50} oli suunnillen 20-50 ng/ml, minimaalisesti kiihdyttävän annoksen ollessa noin 3 ng/ml. HBBM-3:n ja aFGF:n annos-vaste-käyrät olivat käytetyissä määritysolosuhteissa sekä kvalitatiivisesti että kvantitatiivisesti mahdottomat erottaa. HBBM-3:n vaste näytti olevan erotettavissa bFGF:n vasteesta. Käytetyssä määrityssysteemissä bFGF:llä oli paljjon suurempi teho ja ilmeisesti korkeampi sisäinen aktiivisuus (intrinsci activity) kuin HBBM-3:lla. On kuitenkin varoitettava, että kysymykseen HBBM-3:n sisäisestä aktiivisuudesta ei tässä testissä voitu riittävästi paneutua, koska annoksia, jotka ovat kyllin korkeita mahdollistaakseen HBBM-3:n sisäisen aktiivisuuden arvioimisen, ei määrityksessä voitu käyttää johtuen rajoituksista siinä suolamäärässä, joka solujen joukkoon voitiin lisätä ilman haitallisia vaikutuksia solujen kasvulle. Alus-

tavat tulokset viittaavat kuitenkin siihen, että käytetyissä olosuhteissa HBBM-3:n sisäinen aktiviisuus on aFGF:n vastaavan kanssa identtinen.

Annos-vaste-analyysi toistettiin HBBM-1:lle. Tulokset, kuten kuvion 6 alemmassa kaaviossa on esitetty, osoittavat HBBM-1:n olevan myös biologisesti aktiivinen samassa testisysteemissä. Ihmisen HBBM, joka koostuu HBBM-1:n, -2:n ja -3:n seoksesta, testattiin samalla tavalla ja se oli samankalstaisesti aktiivinen (tulosaineistoa ei ole esitetty). Tuloksia ei kuitenkaan vielä ole saatu ihmisen HBBM:ien yksittäisille fraktioille. Lisäksi naudan HBBM:t testattiin myös ihmisen napanuoran endoteelisoluilla ja niiden havaittiin olevan aktiivisia (tulosaineistoa ei ole esitetty).

Lopuksi pienet näytteet mono-S-kromatografialla konsentroitua HBBM-3:a tehtiin 1,5 M:isiksi natriumsulfaatin suhteen ja laitettiin hydrofobisen vuorovaikutuksen pylvääseen. Tulokset, kuten kuviossa 7 on esitetty, osoittivat, että HBBM-3 oli aktiivinen ja hyvin erottunut sekä aFGF:stä että bFGF:stä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen oleellisesti puhdistetun hepariiniin sitoutuvan aivojen mitogeenin eristämiseksi, jonka N-päätteinen aminohapposekvenssi on H-Gly-Lys-Lys-Glu-Lys-Pro-Glu-Lys-Lys-Val-, jolloin mitogeeni on HBBM-1, HBBM-2 tai HBBM-3, jolloin HBBM-1:n molekyylipaino on noin 18 000 daltonia, HBBM-2:n molekyylipaino on noin 16 000 daltonia ja HBBM-3:n molekyylipaino on noin 15 000 daltonia määritettynä natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla joko pelkistävissä tai pelkistämättömissä olosuhteissa, t u n n e t t u siitä, että

(a) lähteenä oleva aivokudos uutetaan 0,15 M ammoniumsulfaattiin pH 4,5, minkä jälkeen pH nostetaan arvoon 6 - 6,5 ja ammoniumsulfaattia (230 g/l) lisätään ja lopuksi suoritetaan saostus jälleen lisäämällä ammoniumsulfaattia (300 g/l) ja sitten sakka liuotetaan uudelleen uutteen saamiseksi, joka sisältää hepariiniin sitoutuvan aivojen mitogeenin;

(b) vaiheesta (a) saatu uute saatetaan ensimmäiseen kationinvaihtokromatografiaan pH:ssa 6 adsorboimalla karboksimetyyli-Sephadex-pylvääseen ja eluoimalla siitä hepariiniin sitoutuvan aivojen mitogeenin sisältävän eluaatin saamiseksi;

(c) vaiheesta (b) saatu eluaatti saatetaan hepariiniaffiniteettikromatografiaan pH:ssa 7 adsorboimalla hepariini-Sepharose-pylvääseen, jolloin hepariiniin sitoutuva aivojen mitogeeni sitoutuu pylvääseen ja sitten se eluoidaan pylväästä; ja

(d) vaiheesta (c) saatu eluaatti saatetaan toiseen kationinvaihtajakromatografiaan pH:ssa 6,8 adsorboimalla Mono-S-pylvääseen ja eluoimalla siitä mahdollisen kontaminoivan happamen fibroblastikasvutekijän erottamiseksi hepariiniin sitoutuvasta aivojen mitogeenista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se vaiheen (d) jälkeen edelleen käsittää hydrofobiseen vuorovaikukseen perustuva kromatografiavaiheen.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheiden (c) ja (d) eluoidut fraktiot analysoidaan hepariiniin sitoutuvan aivojen mitogeeenin suhteen käänteisfaasi -korkean suorituskyvyn nestekromatografialla.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähteenä oleva kudos on naudan aivot.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan hepariiniin sitoutuva aivojen mitogeeni, jolla on N-terminaalinen aminohapposekvenssi H-Gly-Lys-Lys-Glu-Lys-Pro-Glu-Lys-Lys-Val-Lys-Lys-Ser-Asp-Cys-Gly-Glu-Trp-Gln-, olennaisesti puhtaassa muodossa.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eristetään HBBM-1, HBBM-2 tai HBBM-3, jolla on seuraavat aminohappokoostumukset:

Aminohappo (tähteiden lkm)	HBBM-1	HBBM-2	HBMM-3
Asparagiini & asparagiinihappo	10	10	9
Treosiini	14	14	13
Seriini	9	9	6
Glutamiini & glutamiinihappo	23	20	17
Glysiini	16	15	13
Alaniini	10	8	8
Valiini	4	4	4
Metioniini	1	1	1
Isoleusiini	2	2	2
Leusiini	8	8	8
Tyrosiini	2	2	1
Fenyylialaniini	2	2	2
Histidiini	1	1	1
Lysiini	35	28	23
Tryptofaani	3	3	3
Argiiniini	8	8	8

joissa proliinia ja kysteiiniä, N-terminaaliseen aminohappposekvenssin perusteella, oli mukana, mutta niiden osuutta ei määritetty.

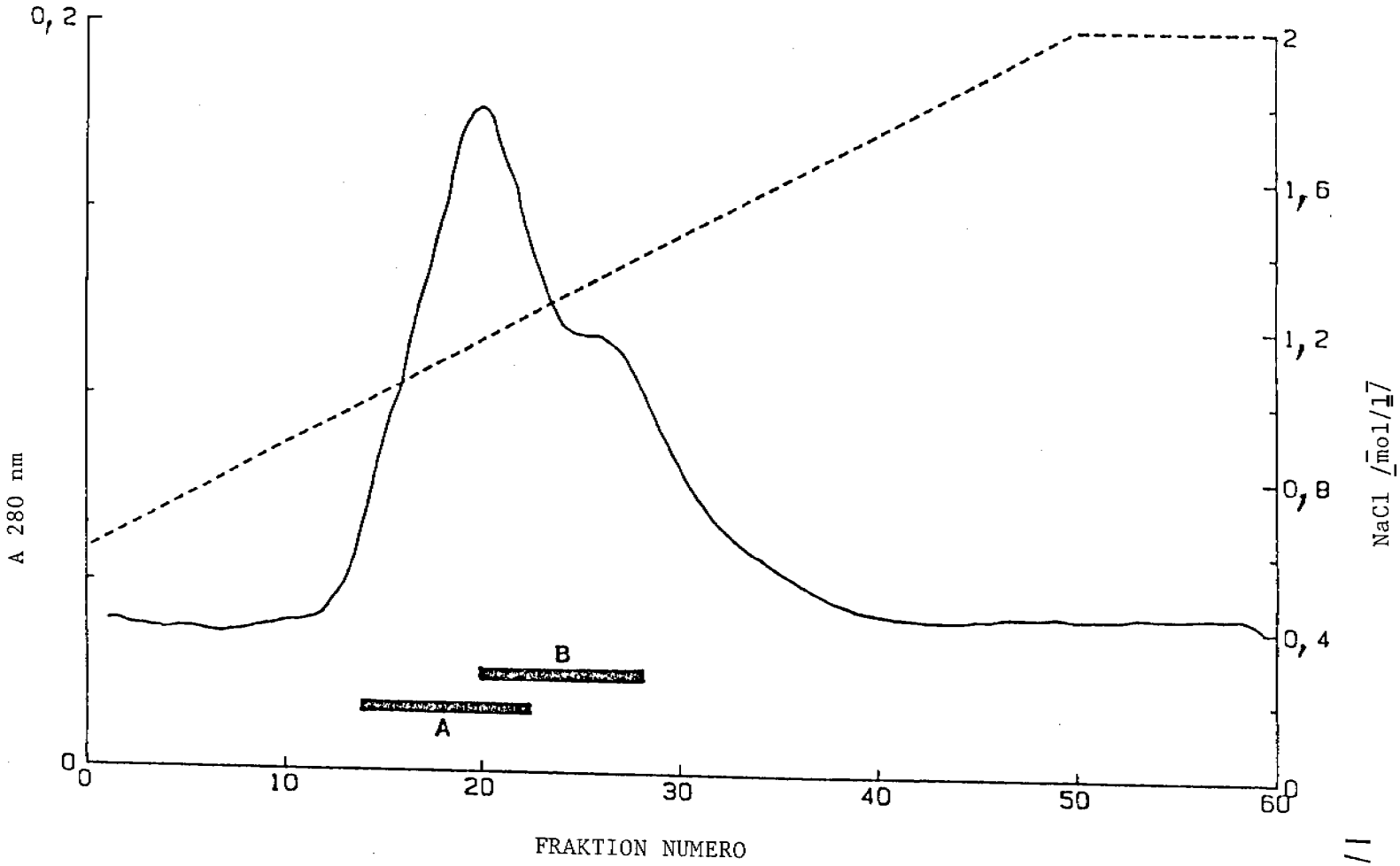
0,2
0
A 280 nm
2
1,6
1,2
0,8
0,4
0
NaCl [mol/l]
0
10
20
30
40
50
60
FRAKTION NUMERO
A
B

FIG. 1

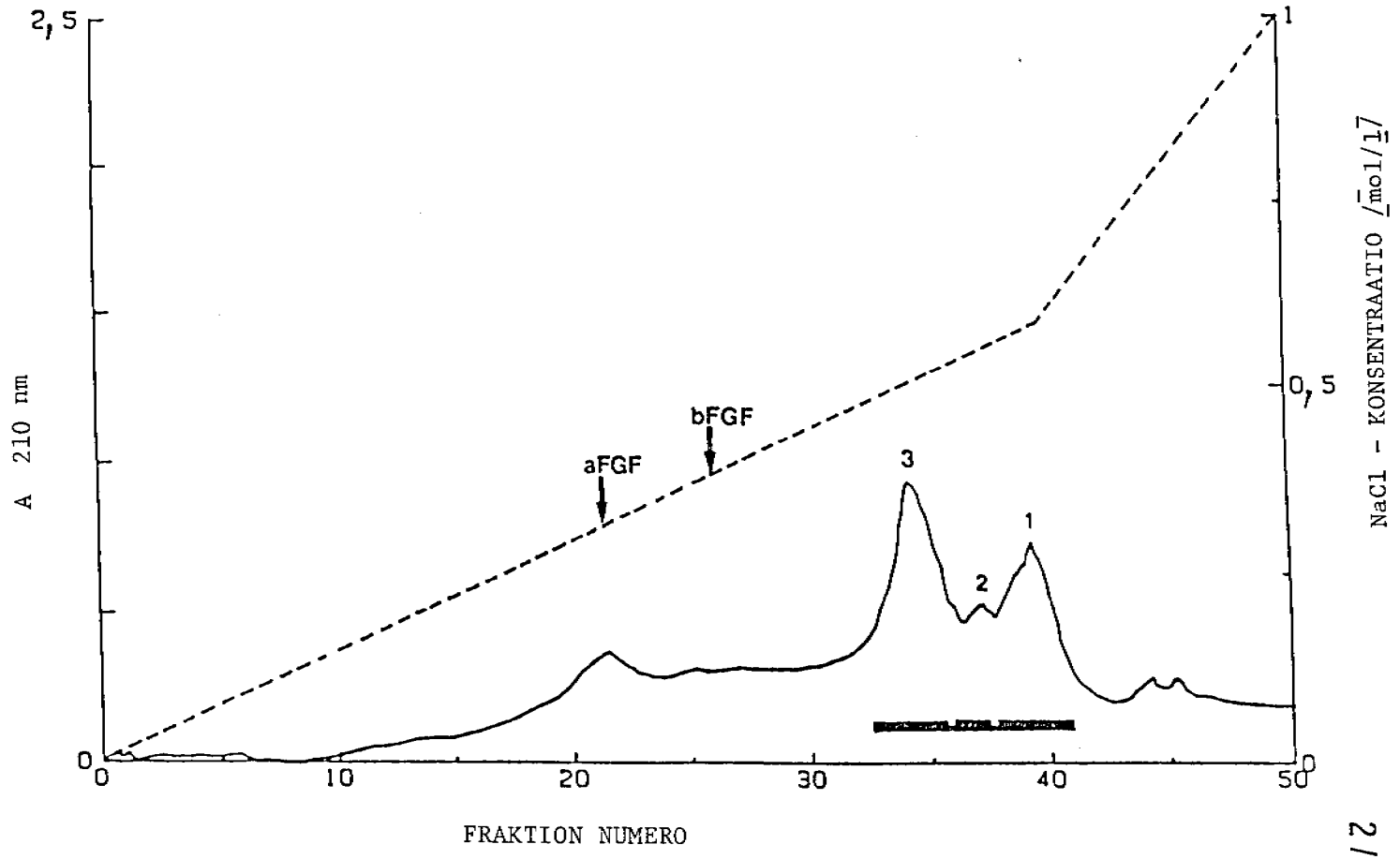
2,5
A 210 nm
0
0
10
20
30
40
50
FRAKTION NUMERO
1
0,5
0
NaCl - KONSENTRAATIO /mol/l/
aFGF
bFGF
1
2
3

FIG. 2

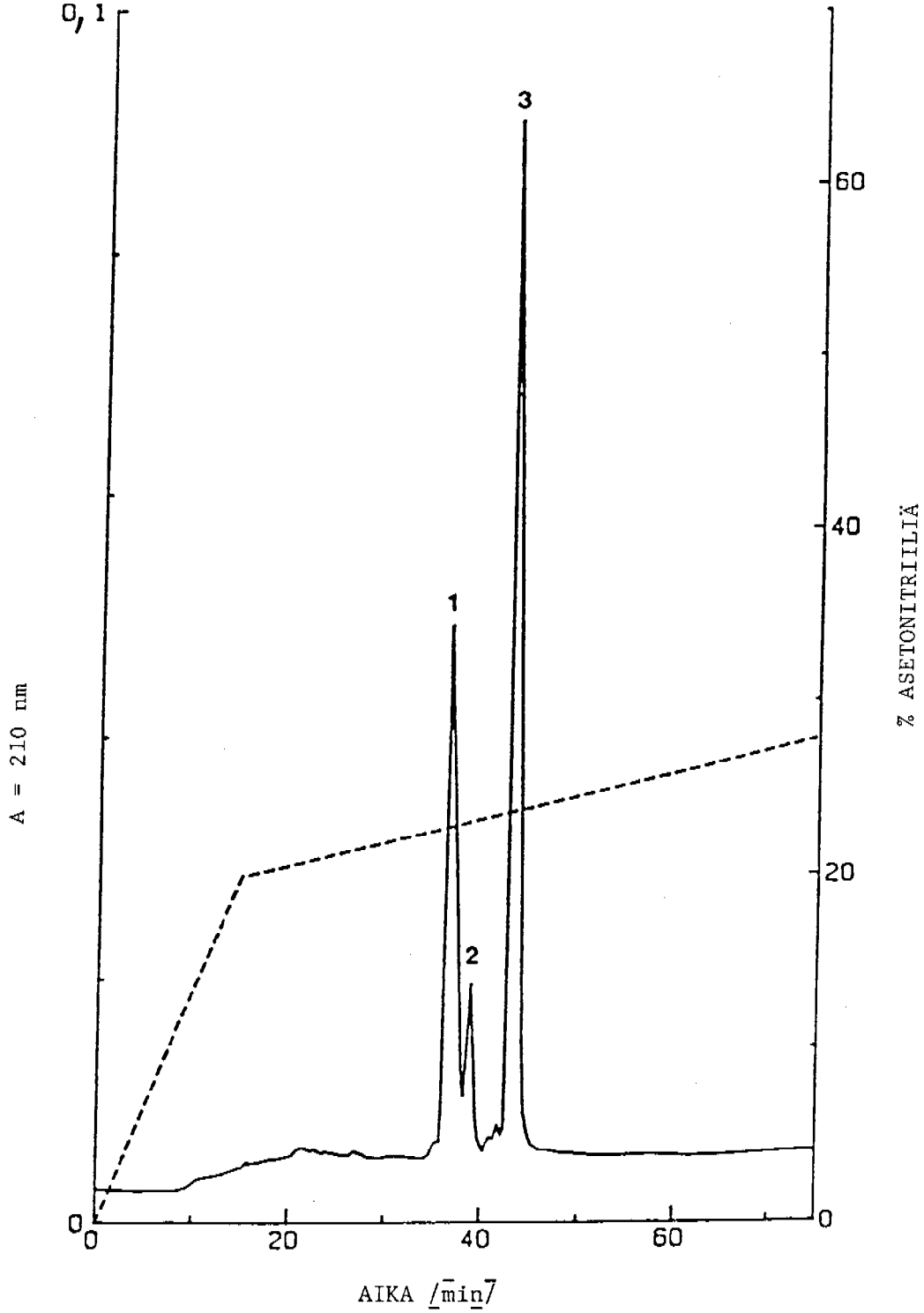

FIG. 3

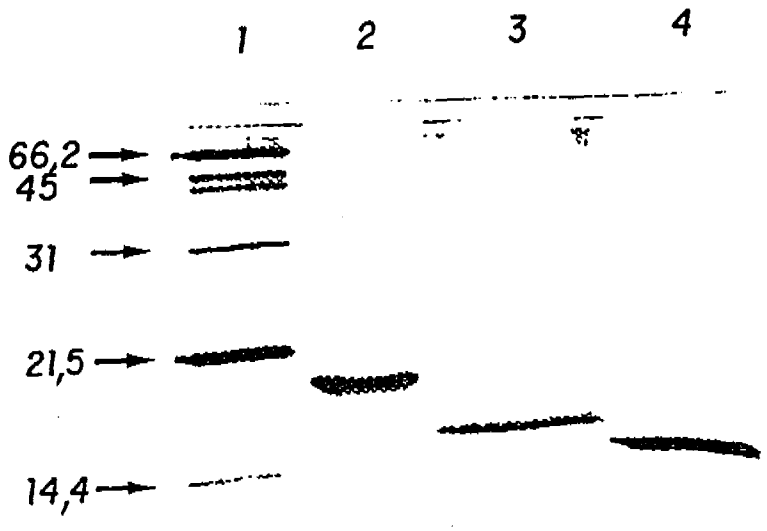

FIG. 4

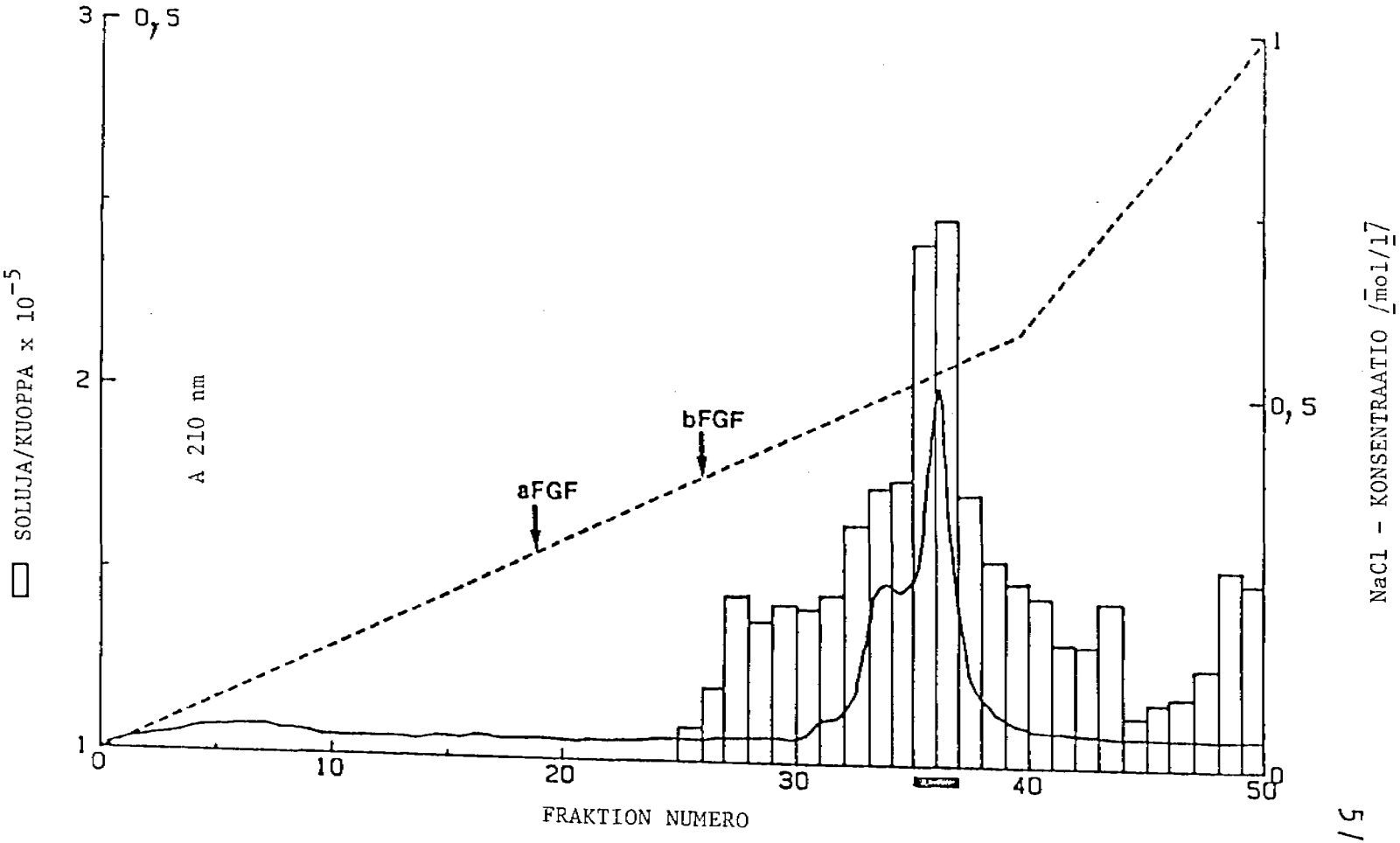
3
0,5
2
1
0
10
20
30
40
50
1
0,5
0
A 210 nm
aFGF
bFGF
SOLUJA/KUOPPA x 10^{-5}
NaCl - KONSENTRAATIO /mol/l/
FRAKTION NUMERO

FIG. 5

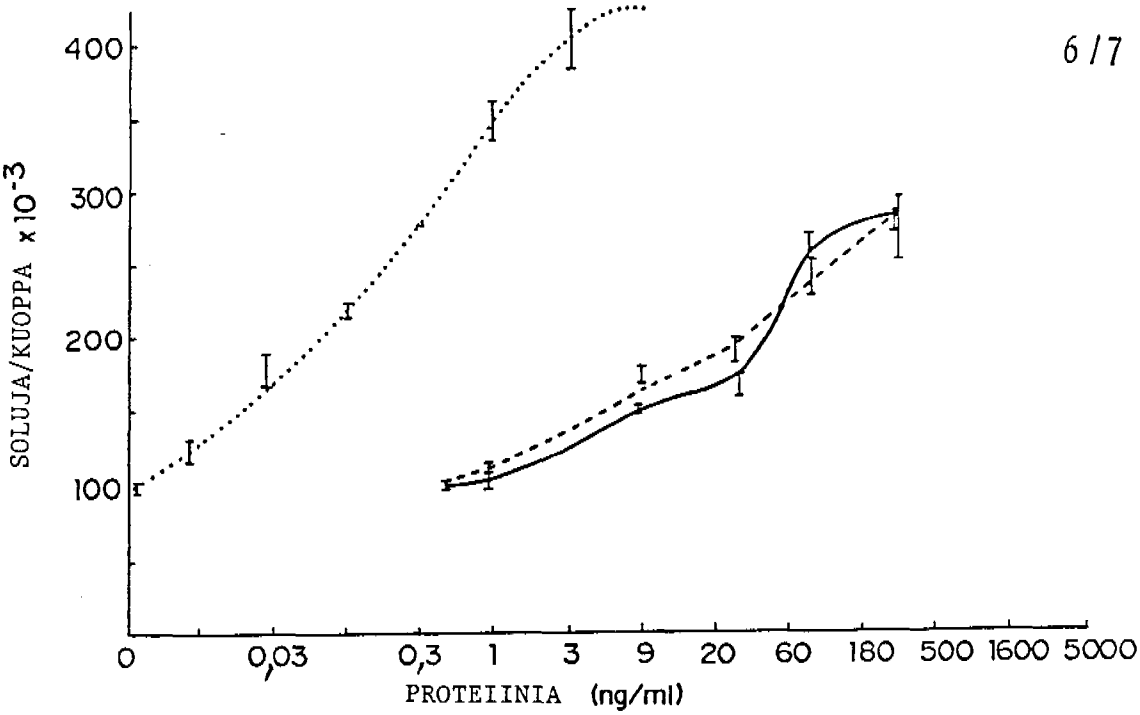
400
300
200
100
SOLUJA/KUOPPA x 10-3
0
0,03
0,3
1
3
9
20
60
180
500
1600
5000
PROTEIINIA (ng/ml)

FIG. 6

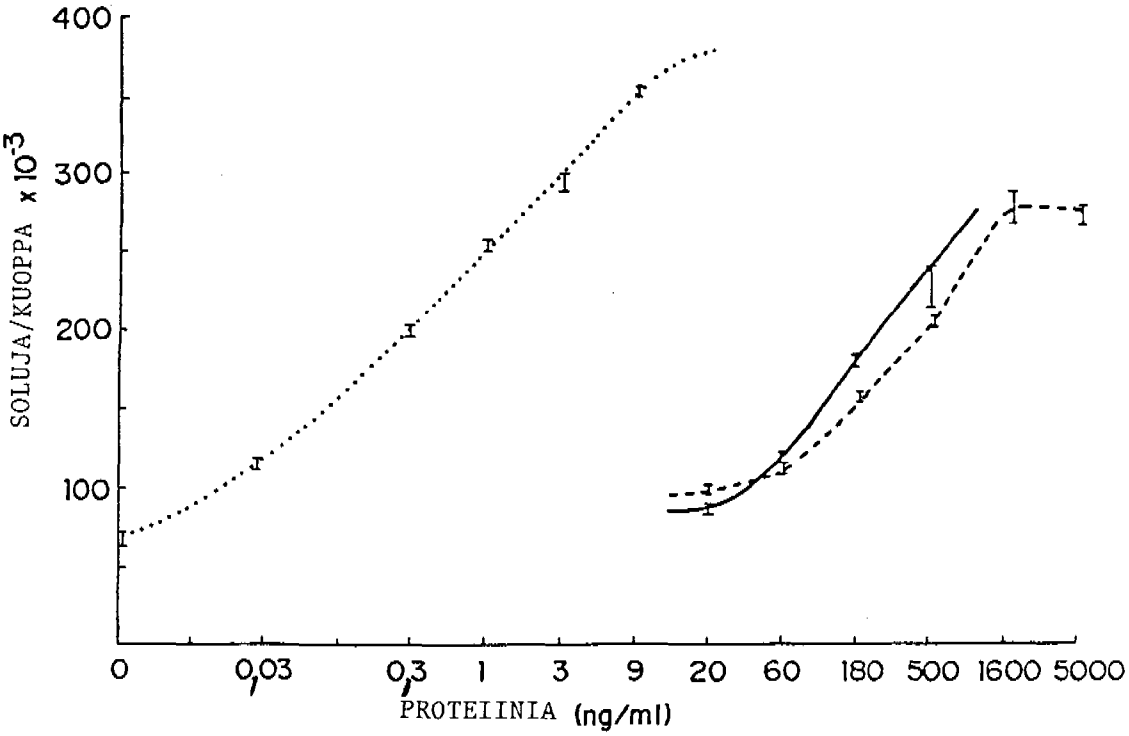
400
300
200
100
SOLUJA/KUOPPA x 10-3
0
0,03
0,3
1
3
9
20
60
180
500
1600
5000
PROTEIINIA (ng/ml)

FIG. 6

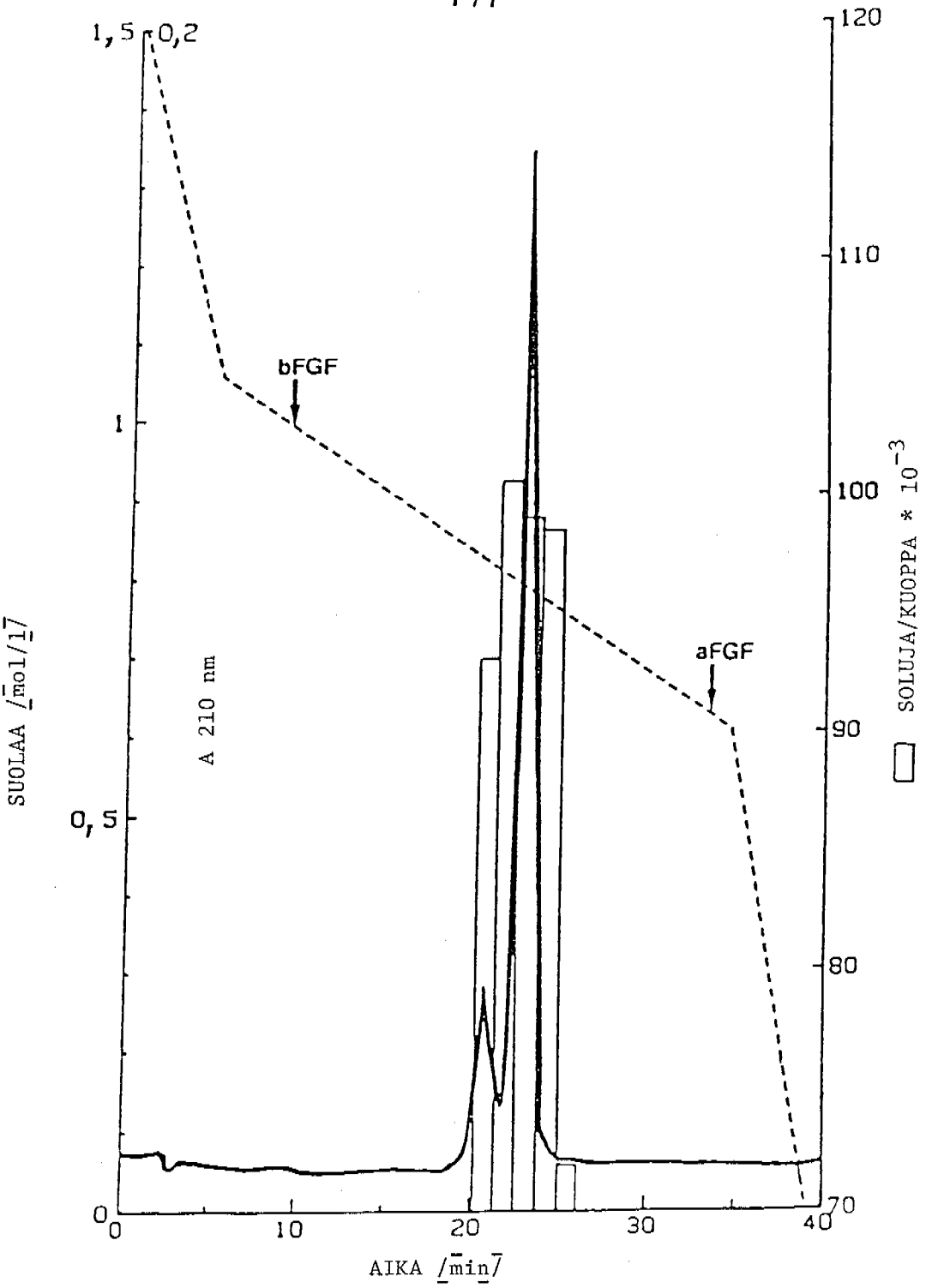
1,5
0,2
120
110
bFGF
1
100
aFGF
90
SUOLAA /mol/l/
A 210 nm
0,5
80
SOLUJA/KUOPPA * 10^-3
0
0
10
20
30
40
70
AIKA /min/

FIG. 7

PATENTTI-JA REKISTERIHALLITUS
PATENTTIOSASTO

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAK.NRO	LUOKKA	TUTKIJA	TUTKIMUSTUL. SAATU
890342	37/02		

TUTKITUT LUOKAT	TUTKITUT MAAT FI SE NO DK CH DE WO EP GB US	TUTK. KESK. *)

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
1) EP-A- 241 136	C07K 13/00	tekniikan taso
2)		
3)		
4)		
5)		
6)		
7)		
8)		
9)		

*) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTYMISEN TAKIA

KÄÄNNÄ!

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA, HAKUSANAT YM.)

HELSINKI _____ _____

PÄIVÄYS ALLEKIRJOITUS